



HAL
open science

Spectro-imagerie optique UV-Visible : approche multimodale et caractérisation de tissus biologiques in vivo appliquées au photodiagnostic en cancérologie

Walter Blondel

► **To cite this version:**

Walter Blondel. Spectro-imagerie optique UV-Visible : approche multimodale et caractérisation de tissus biologiques in vivo appliquées au photodiagnostic en cancérologie. Traitement du signal et de l'image [eess.SP]. Université Henri Poincaré - Nancy I, 2008. tel-00347421

HAL Id: tel-00347421

<https://theses.hal.science/tel-00347421>

Submitted on 15 Dec 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Spectro-imagerie optique UV-Visible : approche multimodale et caractérisation de tissus biologiques *in vivo* appliquées au photodiagnostic en cancérologie

Habilitation à Diriger des Recherches

Université Henri Poincaré – Nancy 1

présentée et soutenue publiquement le 5 décembre 2008

par

Walter C.P.M. Blondel

Composition du jury

<i>Président :</i>	Pr. Michel De Mathelin	ENSPS, LSIIT, Strasbourg
<i>Rapporteurs :</i>	Pr. Marcel Gindre Pr. Didier Vray Pr. Georges Wagnières	ECIME, IUT Cergy-Pontoise INSA, CREATIS, Lyon EPFL-SB-ISIC-GE, Lausanne, Suisse
<i>Examineurs :</i>	Dr. Geneviève Bourg-Heckly Pr. François Guillemin Pr. Jean-François Stoltz Pr. Didier Wolf	UPMC, BioMoCeTi, Paris 6 UHP, CRAN-CAV, Nancy UHP, LEMTA, Nancy INPL, CRAN, Nancy
<i>Invité :</i>	Dr. Jacques Didelon	CAV, INSERM, Nancy

Mis en page avec la classe thloria.

“Le Savoir, c'est le seul trésor qui peut nous permettre de sortir de l'obscurantisme. C'est tout ce qui reste des expériences, des douleurs, des erreurs et des inventions de nos ancêtres. Transmets le Savoir afin d'être sûr que nos descendants ne recommencent pas indéfiniment les mêmes erreurs.”
Bernard Werber, Le papillon des étoiles

Table des matières

Glossaire	1
Préambule	3
Partie A Curriculum vitæ et notice d'activités	5
Chapitre I Curriculum vitæ	9
I.1 Etat civil	9
I.2 Situation professionnelle actuelle	9
I.3 Formation universitaire et parcours professionnel	10
I.3.1 Diplômes, concours et titres	10
I.3.2 Principales étapes professionnelles	10
Chapitre II Notice d'activités	13
II.1 Enseignement	13
II.1.1 Activités pédagogiques	13
II.1.2 Responsabilités administratives et pédagogiques	16
II.2 Recherche	16
II.2.1 Travaux réalisés en thèse (1997-2000) et en post-doctorat (2000-2002) au LEMTA	16
II.2.2 Travaux réalisés depuis 2003 au CRAN et prospective	16
II.2.2.1 Objectifs du projet de recherche	16
II.2.2.2 Les actions de recherche du projet	17
II.2.2.3 Positionnement de mes activités (sections CNU 61 et 63)	23
II.3 Implications dans l'encadrement scientifique depuis 2003	27
II.3.1 Encadrement de stages de DEA/M2R	27
II.3.2 Encadrement de thèses	27
II.4 Activités de responsabilités	29
II.4.1 Fonctions d'intérêt collectif	29

II.4.2	Recherche de financements et gestion de contrats	30
II.4.2.1	Recherches de financement	30
II.4.2.2	Contrat de collaboration technologique	31
II.4.3	Participation à l'organisation de congrès et Rayonnement	31
II.4.4	Implications individuelles en recherche et mobilité internationale . . .	32
II.4.4.1	Délégation CNRS (1 année)	32
II.4.4.2	Séjour au Biomedical Optics Laboratory, Boston, USA . . .	32
Partie B	Mémoire de recherche	33
Chapitre I	Introduction	37
I.1	Photodiagnostic tissulaire	37
I.1.1	Contexte et enjeux médico-économiques en cancérologie	37
I.1.2	Problématiques et évolution des besoins cliniques	38
I.1.3	Intérêt et applications des méthodes de spectro-imagerie optique . . .	38
I.2	Positionnement et objectifs du projet de recherche	39
I.2.1	Objectifs du projet de recherche	39
I.2.2	Problématiques scientifiques et verrous à lever	40
Chapitre II	Imagerie endoscopique panoramique multispectrale : détection, localisation et représentation spatiales	43
II.1	Motivations, positionnement et originalités de l'approche	43
II.2	Représentation panoramique automatique : recalage et mosaïquage d'images	44
II.2.1	Situation du problème	44
II.2.2	Applications du mosaïquage et objectifs des travaux	45
II.2.3	Travaux réalisés et résultats obtenus	46
II.2.3.1	Méthode de recalage d'images utilisant l'information mutuelle	46
II.2.3.2	Correction des distorsions et étalonnage	49
II.2.3.3	Méthode de recalage d'images par composition inverse . . .	50
II.2.3.4	Caractérisation des paramètres de translation et sélection dynamique d'images	53
II.3	Endoscopie de fluorescence et imagerie panoramique bi-modale	54
II.3.1	Situation du problème et objectifs des travaux	54
II.3.2	Travaux réalisés et résultats obtenus	55
II.4	Conclusion et perspectives	55

Chapitre III Spectroscopies optiques <i>in vivo</i> : identification et caractérisation tissulaire	57
III.1 Motivations, positionnement et originalités de l’approche	57
III.2 Spectroscopie bimodale : instrumentation et validations expérimentales . . .	60
III.2.1 Situation du problème, applications et objectifs des travaux	60
III.2.2 Travaux réalisés et résultats obtenus	61
III.2.2.1 Développements et réalisations en instrumentation	61
III.2.2.2 Calibrages, validation métrologique et pré-traitements	63
III.2.3 Validations expérimentales : motivations et modèles	64
III.3 Modélisation des interactions lumière-tissus	66
III.3.1 Situation du problème	66
III.3.2 Applications de la méthode de Monte Carlo, Objectifs des travaux . .	68
III.3.3 Travaux réalisés et résultats obtenus	69
III.3.3.1 Algorithmes de Monte Carlo de base	69
III.3.3.2 Modèle développé pour la simulation de fluorescence multiple	70
III.3.3.3 Validation expérimentale sur fantômes	71
III.4 Extraction, sélection et classification de données	72
III.4.1 Situation du problème	72
III.4.2 Applications et objectifs des travaux	73
III.4.3 Travaux réalisés et résultats obtenus	74
III.4.3.1 Etude <i>in vivo</i> sur la vessie de rats après instillation tumorale	74
III.4.3.2 Etude <i>in vivo</i> sur la peau de souris UV-irradiées	76
III.5 Conclusion et perspectives	79
Chapitre IV Projet de recherche : Prospective	81
IV.1 Imagerie panoramique cystoscopique	82
IV.1.1 Orientations des travaux	82
IV.1.2 Organisation, collaborations et moyens	83
IV.2 Spectroscopie optique multi-modalités <i>in vivo</i>	84
IV.2.1 Orientations des travaux	84
IV.2.2 Organisation, collaborations et moyens	85
IV.3 Cadre de développement des activités et positionnement du projet de recherche	86
IV.3.1 Recherche en Cancérologie	86
IV.3.2 Recherche en Ingénierie Pour la Santé “orientée biophotonique”	87
IV.3.3 “Pluridisciplinarité”, “Interdisciplinarité”, “Transdisciplinarité”, Qui a dit	
facilité?	88

Chapitre V Références bibliographiques	91
Partie C Production scientifique et Sélection d'articles	101
Chapitre I Production scientifique	103
I.1 Indices quantitatifs	103
I.2 Liste des publications	104
I.2.1 Revues internationales à comité de lecture	104
I.2.2 Revues nationales à comité de lecture	105
I.2.3 Conférences internationales à comité de lecture	105
I.2.4 Conférences nationales	108
I.2.5 Ouvrages Scientifiques et divers	109
I.2.6 Brevets	110
I.2.7 Masters Recherche et Doctorats	110
Chapitre II Sélection d'articles publiés	113
II.1 IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2001, 48 :1–10	115
II.2 Traitement du Signal, 2006, 23 :213–233	127
II.3 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP), 2004, 5 :3383–3386	149
II.4 IFAC Modelling and Control in Biomedical Systems, 2006, 41–46	155
II.5 IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2008, 55 :541–553	163
Chapitre III Sélection d'articles les plus récents	177
III.1 Computerized Medical Imaging and Graphics, 2008, en révision	179
III.2 IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2008, accepté (révisions mi- neures)	197
III.3 Journal of Biomedical Optics, 2008, accepté pour publication	207
III.4 Journal of Biomedical Optics, 2008, en révision	223
III.5 European Journal of Physics – Applied Physics, 2008, accepté pour publication	235

Glossaire

IUP-IS	Institut Universitaire Professionnalis� en Ingénierie de la Santé
M2P	Master Professionnel 2 ^e année
M-SVS	Master - Sciences de la Vie et de la Santé
IS-IBR	spécialité Ingénierie de la Santé - parcours Ingénierie Biomédicale et Radiothérapie
EP IRTB	Equipe-Projet Interactions Rayonnements – Tissus Biologiques
GBM	Génie Biologique et Médical
GT IPS	Groupe Thématique Ingénierie Pour la Santé
ILT	projet Interactions Lumiere-Tissus
ED BioSE	Ecole Doctorale Biologie, Santé et Environnement
ED IAEM	Ecole Doctorale Informatique, Automatique, Electronique et Mathématiques
SpID	Action Spectro-Imagerie de Diagnostic
RI	Revue Internationale à comité de lecture
RN	Revue Nationale à comité de lecture
CI	Conférences Internationales à comité de lecture
CN	Conférences Nationales
SAF	Spectroscopie d'AutoFluorescence
SDE	Spectroscopie de Diffusion Elastique
RD	Réflectance Diffuse
IM	Information Mutuelle
TF	Transformée de Fourier
TFM	Transformée de Fourier-Mellin
SSD	<i>Sum of Squared Differences</i>
ETR	Equation de Transfert Radiatif
(N)UV	<i>(Near) UltraViolet</i>
(N)IR	<i>(Near) InfraRed</i>
ADL	Analyse Discriminante Linéaire
SVM	<i>Support Vector Machine</i>
k-NN	<i>k-Nearest Neighbors</i>
ACP	Analyse en Composantes Principales
Se	Sensibilité
Sp	Spécificité

Préambule

CE manuscrit se compose de trois grandes parties intitulées “Curriculum vitæ et notice d’activités”, “Mémoire de recherche” et “Production scientifique et Sélection d’articles”.

Après lecture de différents manuscrits d’HDR, et compte tenu du caractère transdisciplinaire de mes travaux de recherche en GBM (Génie Biologique et Médical), j’ai choisi d’organiser la présentation de mes activités actuelles autour des 2 principales actions de recherche où mon implication est majeure depuis 2003 : imagerie endoscopique (50%) et spectroscopies optiques *in vivo* (50%). Pour chacune de ces actions définies par la finalité applicative, j’ai tenté de mettre en évidence dans ce mémoire de recherche les apports techniques et les solutions méthodologiques développées pour résoudre les problématiques liées à l’instrumentation scientifique (imagerie et spectroscopie) et au traitement du signal (traitement d’images, simulation statistique, extraction de caractéristiques spectrales et classification).

La première partie présente d’une part, un CV rappelant les principales étapes de ma formation universitaire et de mon parcours professionnel (§A.I, page 9) et d’autre part, une notice exhaustive des activités pédagogiques, administratives et scientifiques (§A.II, page 13). La description synthétique des travaux menés en thèse et de ceux développés depuis 2003 dans le cadre des différentes actions du projet de recherche en cours est accompagnée des éléments détaillés relatifs à mon implication dans l’encadrement scientifique et aux responsabilités individuelles et collectives en terme de gestion du projet de recherche.

La deuxième partie, intitulée “Mémoire de recherche”, présente de façon plus complète les travaux réalisés et les résultats obtenus dans le cadre des thèses co-encadrées et co-dirigées de 2003 à 2008. Elle est organisée en 4 chapitres principaux : Cadre des travaux et objectifs du projet de recherche (§B.I, page 37), Imagerie endoscopique panoramique multispectrale (§B.II, page 43), Spectroscopies optiques *in vivo* (§B.III, page 57) et Prospective du projet de recherche (§B.IV, page 81). Les trois premiers chapitres reprennent la démarche d’ensemble du projet de recherche, les problématiques posées et les solutions apportées, en précisant les éléments essentiels des travaux publiés et en cours de publication. Le dernier chapitre remet ces résultats en perspective pour définir les axes principaux de recherche à poursuivre ou non ainsi que les objectifs et moyens pour y parvenir.

La troisième et dernière grande partie de ce manuscrit regroupe les éléments de production scientifique sur lesquels s’appuient les deux parties précédentes : la liste de la totalité des communications référencées (§C.I, page 103), les textes intégraux d’une sélection d’articles majeurs publiés (§C.II, page 113) et en révision (§C.III, page 177).

Première partie

Curriculum vitæ et notice d'activités

*“Je ne sais pas ce qu’est le temps, mais je sais que si rien ne se passait, il n’y aurait pas de temps
passé.”*
Saint Augustin.

*“Laminée entre le souvenir du passé et la crainte ou l’espoir du futur, notre existence réelle est
évanescence ; essayer de saisir l’instant présent est aussi vain que de chercher à rattraper un photon.”*
Albert Jacquard.

Chapitre I

Curriculum vitæ

I.1 Etat civil

Nom patronymique : BLONDEL

Prénom : Walter, Charles, Pierre, Michael

Date et lieu de naissance : 29 décembre 1968 (39 ans), Nancy

Situation de famille : marié, 2 enfants

Adresse personnelle : 4 rue d'alsace, 54425 Pulnoy, France

I.2 Situation professionnelle actuelle

Maître de conférences 61^e section à l'Université Henri Poincaré

Recruté/titularisé le 1^{er} septembre 2002/2003 sur l'emploi N° 1433 (Classe Normale, échelon 6).
Bénéficiaire de la Prime d'Encadrement Doctoral et Recherche (PEDR) depuis 2003 (renouvelé en 2007).

Enseignement : Faculté de médecine de Nancy

Master Sciences de la Vie et de la Santé (SVS)

Spécialité Professionnelle (P) Ingénierie de la Santé (IS) - option Ingénierie Biomédicale et Radiothérapie (IBR)

Avenue de la forêt de Haye, BP184, 54500 Vandoeuvre-Lès-Nancy

Tel : +33(0)3.83.68.36.82, Fax : +33(0)3.83.68.34.59

Email : walter.blondel@medecine.uhp-nancy.fr

Responsable M2P-IS option IBR

Porteur du projet de Master mention Ingénierie de la Santé et Sciences du Médicament (ISSM)

Matières/disciplines enseignées : instrumentation biomédicale, chaînes d'acquisition analogiques et numériques, traitement du signal, imagerie et traitement d'images biomédicales.

Recherche : Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN)

UMR 7039 Nancy Université - CNRS

Groupe Thématique Ingénierie Pour la Santé (IPS)

Equipe-Projet Interactions Rayonnement - Tissus Biologiques (IRTB)

CRAN/INPL, 2 avenue de la forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

Tel : +33(0)3.83.59.56.38, Fax : +33(0)3.83.59.56.33

Email : walter.blondel@ensem.inpl-nancy.fr

Responsable Equipe-Projet IRTB

Domaines de recherche actuels : spectroscopie et imagerie optique UV-Vis-NIR (développement en instrumentation, transfert clinique), modélisation des interactions lumière-tissus (autofluorescence et diffusion multiple), extraction et classification de données spectroscopiques, recalage et mosaïquage d'images endoscopiques.

I.3 Formation universitaire et parcours professionnel

I.3.1 Diplômes, concours et titres

2006 Diplôme Universitaire (UHP, Nancy) en Expérimentation Animale : Niveau 1

2000 Doctorat en Sciences de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1

- Spécialité : Génie Biologique et Médical
- *Mention* : Très honorable avec les félicitations
- *Durée de la thèse* : 2 ans et 10 mois (1^{er} octobre 1997 - 11 juillet 2000)
- Laboratoire : LEMTA UMR 7563 (CNRS-INPL-UHP)
- Equipe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire (MICT)
- Titre : Etude expérimentale des propriétés mécaniques des artères : Développement d'un banc électro-mécanique de tests *in vitro*, rhéologie pariétale d'artères normales, athéromateuses et cryoconservées, et applications cliniques
- Jury : Pr. G. Maurice (LEMTA-INPL, co-directeur), Pr. J-F. Stoltz (LEMTA-UHP, directeur), Rapporteurs : Pr. J-P. Lhuillier (LPMI-ENSAM, Angers), Pr. P. Riha (Académie des Sciences de République Tchèque), Examineurs : Pr. G. Krzakala (CRAN-UHP), Pr. M. Nadi (LIEN-UHP), Dr. X. Wang (LEMTA, CR1 CNRS)

1998 Agrégation de Génie Electrique

- Option : Electronique, Automatique et Informatique Industrielle
- *Classement au concours externe* 14^e/35

1994 CAPET de Génie Electrique

- Option : Electronique, Automatique et Informatique Industrielle
- *Classement au concours externe* 13^e/150

1992 Master of Science (MSc) in Electronics

- Options : Optoelectronics, real time systems, digital image processing
- University of Hertfordshire, Division of Electrical and Electronic Engineering College Lane, Hatfield Herts - AL10 9AB, England
- *Prix universitaire 1992 (20 £) du meilleur stage en optoélectronique*
- *Admis comme équivalence au titre d'une dispense de DEA en 1997*

1991 Ingénieur en Génie Electrique

- Spécialité : Télécommunications et réseaux informatiques
- ESIGEELEC (Ecole Supérieure d'Ingénieurs en Génie Electrique), Rouen
- *Classements* : 11^e/149 (1A), 2^e/60 (2A), 4^e/30 (3A)

I.3.2 Principales étapes professionnelles

2006-2007 Délégation CNRS (1 an)

- Laboratoire de Biophysique Moléculaire Cellulaire et Tissulaire (BioMoCeTi) UMR 7033 CNRS - UPMC Paris VI
- Groupe Photoactivation moléculaire - applications biomédicales
- *Activités de recherche détaillées dans les parties ci-après.*

2002-2008 MCU (section 61) à l'Université Henri Poincaré, Faculté de médecine de Nancy

- Enseignement : Master Professionnel SVS-IS, responsable du M2P option IBR
- Recherche : CRAN, GT IPS, responsable action SpID, co-responsable EP IRTB
- *Activités administratives, d'enseignement et de recherche détaillées dans les parties ci-après.*

mars 2001 Qualifié aux fonctions de Maître de Conférences des Universités en sections 61 et 63

1997-2002 PRAG (Professeur Agrégé - électronique, automatique, informatique industrielle) à l'Université Henri Poincaré, Faculté de Médecine de Nancy

- Enseignement : IUP Ingénierie de la Santé, directeur des études de la Spécialité Génie Biologique et Médical - Electronique Médicale
- Recherche (thèse et post-doctorat) : LEMTA, Equipe MICT
- *Activités administratives, d'enseignement et de recherche détaillées dans les parties ci-après.*

1995-1997 Professeur Certifié au Lycée Henri Loritz à Nancy

- Sections de Techniciens Supérieurs (STS) en électronique et en informatique industrielle
- *Enseignements : Electronique analogique et numérique, simulation (SPICE), chaînes d'acquisition, programmation en C et système temps réel (OS9)*

1993-1994 Service national (12 mois) : Scientifique du Contingent

- Etat Major de la FATAC, Base Aérienne de METZ-FRESCATY
- *Sujet : Etude et développement d'une application de gestion de bases de données sous Dbase III+ pour les pièces détachées des avions mirages*

1992 Stage de MSc en recherche (6 mois)

- PTT-Telecom Nederland, Laboratoire de recherche Dr Neher, Département Systèmes de Communication, La Haye, Pays-Bas
- *Sujet : Multiplexage temporel d'impulsions optiques brèves à l'aide d'un LASER à gain commuté. Etude et expérimentation du fonctionnement transitoire d'un laser à semi-conducteur, dans le cadre d'un projet européen de transmission de données à très haut débit par fibres optiques.*

Chapitre II

Notice d'activités

II.1 Enseignement

II.1.1 Activités pédagogiques

Mon expérience comme enseignant titulaire en Génie Electrique (électronique et informatique industrielle) a débuté en 1995 au Lycée Henri Loritz à Nancy, en Sections de Techniciens Supérieurs (STS) en électronique et en informatique industrielle. Durant 2 ans, mes enseignements ont porté sur :

- la simulation analogique et logique (4 heures/semaine),
- la conception et la réalisation de prototypes électroniques (4 heures/semaine),
- les chaînes d'acquisitions analogiques et numériques (2 heures/semaine),
- les transmissions de données numériques (2 heures/semaine),
- la programmation en assembleur 68000 et temps réel sous OS9 (6 heures/semaine).

En 1997, j'ai été recruté sur un poste de PRAG à l'Université Henri Poincaré - Nancy 1, affecté à la faculté de médecine de Nancy au sein de l'IUP Ingénierie de la Santé (directeur : Pr. Jean-François Stoltz) dans la spécialité Génie Biologique et Médical - Electronique Médicale. Il s'agissait de la création d'un des trois IUP IS en France visant à former des cadres techniques du domaine de l'ingénierie biomédicale. Les contenus de formations couvraient donc les différents champs pluridisciplinaires du domaine mais fortement orientés vers le génie électrique et l'automatique compte tenu de son origine historique (MST "biotique" de 1993 à 1997).

Seul enseignant titulaire de 1997 à 2002, j'ai été chargé de la direction des études pour les années de Licence et Maîtrise (2×30 étudiants) de la spécialité, c'est-à-dire de sa gestion administrative et pédagogique complète :

- définition et rédaction de la maquette pédagogique (objectifs et contenus de formation de chaque module),
- mise en place de la semestrialisation (Unités d'Enseignements, modules, coefficients),
- préparation et gestion journalière des emplois du temps (cours, TD, TP, examens),
- coordination des intervenants extérieurs,
- gestion des projets de Maîtrise,
- suivi des stages hospitaliers et industriels,
- mise en place d'un "double diplôme" dans le cadre d'échanges d'étudiants avec la Fachhochschule de Giessen en Allemagne (2 étudiants français par an en moyenne).

De plus, j'ai **développé la filière** au travers de la mise en place d'actions et de moyens spécifiques tels que :

- la participation, avec les étudiants, à divers forums (science en fête, information des étudiants (DEMAIN), forum franco-allemand),
- la contribution à des actions de promotion locales et nationales (création d'une plaquette de présentation de la spécialité, articles dans des revues spécialisées GBM info, RBM. . .),
- le choix et la commande d'équipements pour la mise en place, l'utilisation et la maintenance d'une salle de Travaux Pratiques :
 - en instrumentation électronique (oscilloscopes, multimètres et générateur numériques, GP-IB, cartes d'acquisition, platines d'essais, composants. . .),
 - en informatique industrielle (ordinateurs PC en réseau, C/C++, HPVee, AutoCad. . .),
 - en imagerie et traitement d'images (PhotoShop, PaintShop, Matlab).
- la création d'un parc d'appareils biomédicaux obtenus auprès des professionnels (intervenant extérieurs, partenaires des stages professionnels, anciens étudiants, collaborateurs des hôpitaux de Nancy) et utilisés comme supports pour les enseignements : pompes à perfusion, pousse-seringue, appareils de PNI, moniteurs multiparamétriques, incubateur pour nouveau-né, osmomètre, colorimètres, échographe, respirateurs, testeur de sécurités électriques, testeurs de respirateurs.

Durant ces 5 années (1997-2002), j'ai effectué mes enseignements (384 heures ETD / an statutaire) en deuxième année de DEUG, Licence et Maîtrise, selon la répartition détaillée dans le tableau II.1, ce **en parallèle de mes travaux de recherche en thèse et en post-doctorat**. Pour la majorité de ces enseignements, j'ai mis en œuvre des cours et des travaux dirigés adaptés aux objectifs pédagogiques de la spécialité GBM, et surtout de nouveaux travaux pratiques ayant pour supports d'étude et d'application les systèmes et les appareillages biomédicaux, avec comme objectifs :

- l'analyse fonctionnelle et structurelle de dispositifs médicaux (systèmes de perfusion automatique, mesure des paramètres physiologiques, assistance ventilatoire, imagerie échographique),
- le recueil et le traitement analogique et numérique des signaux (ECG et EMG notamment),
- la mise en œuvre de systèmes d'instrumentation et de traitement de signaux numériques (cartes d'acquisition, bus GPIB, HPVee, Labview).

Recruté en 2002 sur un poste de Maître de Conférences affecté en recherche au CRAN et en enseignement à l'IUP Ingénierie de la Santé, j'ai de ce fait poursuivi mes activités d'enseignement de 2002 à 2005 en IUP, puis de 2005 à 2008 au sein de la spécialité Ingénierie de la Santé du Master SVS. L'application de la réforme LMD a entraîné la disparition de l'IUP et la création d'une Licence Sciences de la Santé et d'un Master Professionnel avec un parcours Ingénierie Biomédicale. Nous avons ainsi procédé à une re-définition partielle des contenus de la filière avec 2 années de transitions (2004-2006) et un **renforcement des enseignements en traitement des signaux 1D/2D appliqué au domaine biomédical**. Le tableau II.2 récapitule mes enseignements en IUP puis en Master en tant que MCU (192 heures ETD / an statutaire) ainsi que la répartition des volumes horaires (CM, TD, TP) et quelques éléments indicatifs des contenus correspondants.

TABLE II.1 – Tableau récapitulatif des activités d’enseignement dispensées en IUP-IS en tant que PRAG (heures/étudiant). L = Licence, M = Maîtrise.

Intitulés des enseignements	Années Universitaires					Niveaux
	1997 1998	1998 1999	1999 2000	2000 2001	2001 2002	
Mathématiques		40				DEUG2
Electronique analogique et numérique appliquée aux appareils biomédicaux	190	190	190	190	190	DEUG2
Informatique industrielle (algorithmique, C++)					30	L
Transmissions de données numériques	20	20		20	20	L, M
Chaînes d’acquisition	30			30	30	L, M
Electronique des appareils biomédicaux			50	70	70	M
Projets Tutorés			30	30	30	M
Instrumentation électronique et médicale	20		20	20	20	M
Traitement du signal	40				20	M
Automatique linéaire (asservissement, régulation)	40		20	20		M

TABLE II.2 – Tableau récapitulatif des activités d’enseignement dispensées en tant que MCU (heures/étudiant) au sein de l’IUP-IS (2002-2005) puis en M2P-SVS-IS (2005-2008). L = Licence, M = Maîtrise, M1 = Master 1, M2 = Master 2.

Intitulés et contenu des enseignements	Années Universitaires					Niveaux
	2002 2003	2003 2004	2004 2005	2005 2006	2007 2008	
Projets Tutorés et Travaux Encadrés	36	36	36	30	40	M,M2
Imagerie Biomédicale et Traitement d’Images (38CM, 28TD x 2 groupes) : Capteurs et métrologie, Bases colorimétriques, Transformée de Fourier et convolution, Propriétés statistiques des images, Filtrage, Opérations de morphologie mathématique, Modèles de projection, Transformations et Recalage géométriques d’images (primitives, critères de similarités, méthodes d’optimisation), Transformation de Radon					66	M2
Traitements de Signaux Biomédicaux (20CM, 16TD x 2 groupes) : Echantillonnage-Blocage, CNA-CAN, Classes de signaux, Analyse spectrale (représentations fréquentielle (Fourier), temps-fréquence (TFG), temps-échelle (ondelettes))					36	M1
Acquisition de signaux et instrumentation (30CM, 20TD x 2 groupes, 20TP x 2 groupes) : Chaînes d’acquisition (multiplexage, capteurs et conditionneurs, amplification d’instrumentation), Echantillonnage-Blocage, CNA-CAN, Classes de signaux, Analyse spectrale (représentation fréquentielle, représentation temps-fréquence, représentation temps-échelle), Bus d’instrumentation et programmation visuelle				70		M1
Traitements des Signaux et Images (26CM, 12TD x 2 groupes) : Echantillonnage-Blocage, Classes de signaux, Analyse spectrale 1D (représentations fréquentielle (Fourier), temps-fréquence (TFG), temps-échelle (ondelettes)), Transformée de Fourier et convolution 2D, Propriétés statistiques des images, Filtrage, Opérations de morphologie mathématique, Transformations spatiales, Transformation de Radon				38		M2
Electronique des Appareils Médicaux (20/15CM, 30TP x 1 ou 2 groupes) : Analyse systémique et technique de dispositifs médicaux (pousse-seringue, pompe à perfusion, respirateurs, sécurités électriques), opérations de contrôle et de maintenance	80	50	45	45		M,M1
Acquisition de signaux et instrumentation (30CM, 20TD x 2 groupes, 10TP x 2 groupes) : Echantillonnage-Blocage, CNA-CAN, Interfaces de données numériques, Bus d’instrumentation			60			M
Bus, Interfaces et Instrumentation (10CM, 20TD x 2 groupes) : Interfaces de données numériques, Bus d’instrumentation	30	30				M
Capteurs et chaînes d’acquisition (30CM, 16TP x 2 groupes) : Capteurs et conditionneurs, Multiplexage, Filtrages, Amplification d’instrumentation, Echantillonnage-Blocage, CNA-CAN,	46	46	46			L
Imagerie et Traitement d’Images (16CM, 12TD x 2 groupes) : Imagerie biomédicale, Capteurs et métrologie, Bases colorimétriques, Transformée de Fourier et convolution, Propriétés statistiques des images, Filtrage		28				L

II.1.2 Responsabilités administratives et pédagogiques

2009-2012 Porteur et responsable du Master mention Ingénierie de la Santé et Sciences du Médicament (ISSM)

2005-2008 Responsable du M2P parcours Ingénierie Biomédicale

- Master Sciences de la Vie et de la Santé, faculté de médecine de Nancy
- Spécialité Ingénierie de la Santé - Option Ingénierie Biomédicale et Radiothérapie

2002-2005 Responsable de la Maîtrise G.B.M. - électronique médicale

- IUP Ingénierie de la Santé, faculté de médecine de Nancy

1997-2002 Directeur des Etudes

- IUP Ingénierie de la Santé, faculté de médecine de Nancy
- Spécialité G.B.M. - électronique médicale (Licence et Maîtrise)

II.2 Recherche

II.2.1 Travaux réalisés en thèse (1997-2000) et en post-doctorat (2000-2002) au LEMTA

Mes travaux de recherche en thèse (octobre 1997 à juillet 2000) puis en post-doctorat (septembre 2000 à août 2002) au sein de l'équipe MICT du LEMTA ont concerné l'étude et la caractérisation expérimentale des propriétés rhéologiques d'artères, en collaboration avec le laboratoire de chirurgie expérimentale (faculté de médecine), la Banque des Tissus de Nancy et des chirurgiens du CHU de Nancy. Les **apports scientifiques, techniques et méthodologiques** de ces travaux ont porté notamment sur :

- la conception, le développement et la réalisation d'un banc de tests dédié aux mesures de contraintes-déformations de segments entiers de vaisseaux *in vitro*,
- la modélisation des processus rhéologiques fondamentaux par une approche 3D en grandes déformations (tenseur des contraintes de Cauchy et tenseur des déformations de Green-Lagrange) basée sur un modèle exponentiel de la fonction de densité d'énergie de déformation et une optimisation paramétrique selon un algorithme de type Levenberg-Marquardt.

Nous avons obtenu des résultats originaux pour 3 types d'artères humaines (normales, athéromateuses et cryoconservées), associés à la considération de plusieurs états de référence initiaux (non chargé, zéro contrainte) publiés dans 4 articles en revues internationales avec comité de lecture [RI4, RI6, RI7, RI8] (dont 1 article consultable en intégralité en page 115), 1 contribution dans un ouvrage scientifique [Ou1] et 8 communications en conférences internationales avec comité de lecture et actes (dont 3 orales) [CI2, CI3, CI5, CI6, CI10, CI9, CI1, CI7]. Au cours de ma période de post-doctorat, j'ai encadré les stages de fin d'étude (6 mois) de 2 étudiants de Maîtrise et d'école d'ingénieur. En 2001, j'ai fait partie du comité d'organisation du congrès international Euromech 420 à Nancy.

II.2.2 Travaux réalisés depuis 2003 au CRAN et prospective

II.2.2.1 Objectifs du projet de recherche

Les actions de recherche présentées dans cette section font partie du Groupe Thématique Ingénierie Pour la Santé (GT IPS) qui développe, au sein du CRAN, de nouveaux moyens, concepts ou méthodologies pour augmenter l'efficacité des diagnostics et des soins en médecine.

Pilotés par la **finalité médicale**, les sujets de recherche s’inscrivent dans une démarche interdisciplinaire et entrent clairement dans les objectifs scientifiques du département ST2I (Sciences et technologies de l’information et de l’ingénierie) du CNRS (Ingénierie pour le vivant) et dans sa politique volontariste de mise en synergie des disciplines (cf. compte-rendu d’activités du CRAN 2004-2007). L’un des deux principaux axes développés au sein du GT IPS au cours du dernier contrat quadriennal, concerne le diagnostic et le traitement du cancer dans le cadre du **projet “Interactions Lumière-Tissus”**, dont j’assure la co-responsabilité (instrumentation et traitement du signal) avec Lina Bolotine (biologie). Ce projet, mené en étroite collaboration avec le centre régional de lutte contre le cancer Alexis Vautrin (CAV, Nancy), est structuré en deux axes qui portent respectivement sur les aspects photobiologiques et sur les développements et applications en spectro-imagerie optique.

L’objectif général de ce dernier axe intitulé **“Spectro-Imagerie de Diagnostic”** (SpID) que j’anime, est de concevoir, développer, caractériser et évaluer de nouvelles modalités de diagnostic par méthodes spectroscopiques atraumatiques (“biopsie optique”) pour la détection, la localisation et l’identification de cellules ou tissus pathologiques (états pré-cancéreux et cancéreux précoces en particulier) caractérisés notamment par des modifications de leurs propriétés photophysiques. Notre stratégie originale (cf. article en intégralité page 127 [RN3]) est de développer en particulier une **approche “multi-modale et multi-dimensionnelle” en spectroscopie** point par point (autofluorescence, diffusion élastique et gap-FRAP, actions 2 et 3 ci-après) et **en imagerie** (endoscopie de fluorescence multibandes, action 1 ci-après).

Les problématiques scientifiques à résoudre concernent :

- l’instrumentation : développement de techniques de mesures physiques *in vivo* particulières exploitant la fluorescence intrinsèque/extrinsèque, l’absorption et la diffusion multiple de la lumière dans les tissus (spectroscopies fibrées, imagerie endoscopique multi-bandes) et tenant compte des contraintes d’utilisation en clinique,
- l’analyse de données et la modélisation :
 - à partir de données spectrales (caractérisation des propriétés optiques, modélisation des interactions lumière-tissus, couplage diffusion-fluorescence, identification de paramètres discriminants pour le diagnostic, classification),
 - et à partir de données spatiales (recalage et mosaïquage d’images en endoscopie en lumière blanche et en fluorescence, représentation 2D/3D),
- la mise en oeuvre complémentaire des méthodes (résolutions spectrale, spatiale, temporelle) et leur validation expérimentale pré-clinique et clinique.

II.2.2.2 Les actions de recherche du projet

Les principaux objectifs et résultats obtenus depuis 2003 pour chacune des 3 actions de recherche qui composent l’axe SpID sont donnés dans les paragraphes suivants, ce pour les aspects “instrumentation” comme pour les aspects “signal” liés à chacune d’elles.

II.2.2.2.1 Action 1 : Imagerie endoscopique multispectrale et mosaïquage d’images

Nos travaux en imagerie endoscopique concernent principalement la vessie. Le diagnostic clinique des cancers urothéliaux s’effectue par l’observation cystoscopique en lumière blanche de la paroi interne de l’organe. Néanmoins, certaines lésions pré-cancéreuses ou multifocales restent difficiles à déceler et des techniques exploitant la fluorescence des tissus sont développées pour améliorer la sensibilité et la spécificité cliniques. L’examen cystoscopique permet au clinicien d’ausculter la vessie dans sa totalité mais avec un champ de vue limité. Nous développons une

approche diagnostique originale visant à exploiter des informations spectrales (fluorescence) et des informations spatiales (lumière blanche) obtenues par mosaïquage d'images. Cette technique de traitement d'images permet d'augmenter le champ de vision en recalant et en collant des images successives d'une séquence vidéo-endoscopique. Dans le domaine médical, les quelques algorithmes de mosaïquage proposés (mammographie, ophtalmologie, microscopie et angiographie X) sont peu automatisés et nécessitent soit des connaissances *a priori* (différences de points vues connues entre images à cartographier) soit l'intervention d'opérateurs pour guider le mosaïquage. Aucune méthode de mosaïquage n'a été publiée dans le cas de la vessie. Pour pouvoir construire des images panoramiques bimodales superposables, nous devons également développer une instrumentation spécifique permettant l'acquisition alternative automatique des images dans ces deux modalités. L'image panoramique calculée permettra au clinicien d'observer des zones de tissus plus étendues, facilitant ainsi le repérage de lésions satellitaires, la comparaison, le suivi et le guidage d'examen ultérieurs voire l'archivage des données.

Ma contribution a concerné **l'instrumentation** (développement, calibrage, validations expérimentales) et **le traitement d'images** (algorithmes de recalage, mosaïquage, optimisation, calcul d'erreurs...). Les résultats plus complets sont présentés en partie B.II page 43.

Participants (CRAN) : 1 PU-PH, 1 PU (61) et 2 MCU (61)

Partenaires : 1 MCU-HDR (BioMoCeTi, UPMC-Paris6)

Encadrement doctoral : 2 thèses soutenues en mars 2005 (Rosebet Miranda, co-encadrement 40%, ED IAEM) et en octobre 2007 (Yahir Hernandez, co-direction 40%, ED IAEM), 1 thèse en cours depuis 2007 (Achraf BenHamadou, co-encadrement 20%, ED IAEM)

Objectifs des travaux :

- Améliorer la qualité de l'identification diagnostique *in vivo* par voie endoscopique (approche multi-modalités, visualisation simultanée et en temps réel des images endoscopiques en lumière blanche et d'images de fluorescence superposables spatialement)
- Optimiser l'efficacité de la localisation *in situ* (résolution spatiale avec information spectrale, recalage d'images et création d'images panoramique 2D, visualisation/reconstruction 3D)
- Transférer la technique pour des essais en clinique

Verrous à lever :

- Techniques : instrumentation utilisable en conditions cliniques (calibrage automatique, commutations des sources et vitesse d'acquisition vidéo, sensibilité pour l'acquisition d'images d'autofluorescence)
- Traitement d'images : robustesse et temps de construction d'images panoramiques tenant compte des contraintes réelles (type d'images, durée d'un examen)
- Validations expérimentales : quantitatives (fantômes réalistes, mesure d'erreurs de mosaïquage) et qualitatives (séquences réelles), superposition des images panoramiques en fluorescence et en lumière blanche

Principaux résultats obtenus, points forts et originalités :

- Réalisation d'un prototype de qualification permettant l'acquisition d'images dans 3 bandes spectrales : visualisation simultanée et superposable des images en lumière blanche et de fluorescence, validation métrologique sur fantômes (mires, photographies de vessie) [RI11, RN3, CI13, CI17]
- Réalisation d'un prototype de dimension réduite : contrat de collaboration CRAN-LETI-BioMoCeTi (cf. §A.II.4.2)
- Correction des défauts inhérents aux images endoscopiques (distortion radiale, shading, pattern de fibres optiques dans le cas des fibroscopes)

- Développement d’un algorithme robuste de recalage des paires d’images cystoscopiques et mosaïquage automatique [Th7] : mesure de similarité basée sur l’Information Mutuelle des niveaux de gris des paires d’images consécutives, optimisation des paramètres de transformation utilisant un gradient stochastique, ajustement global et simultané des matrices issues du recalage d’images, évaluation quantitative sur fantômes (vessies de porc) de l’erreur de mosaïquage [CI12, CI17], étalonnage simple et rapide d’endoscope (ni mire, ni dispositif précis de positionnement) [CI13, RI11]
- Développement d’un algorithme rapide de construction automatique d’images panoramiques 2D (compatible avec la durée de l’examen cystoscopique et suffisamment robuste) [Th9] : recalage basé sur une méthode composite de calcul des paramètres de transformation perspective comprenant une initialisation rapide des paramètres de translation par un calcul de corrélation, suivi d’une optimisation rapide de l’ensemble des paramètres en utilisant un algorithme de recalage par composition inverse (calcul unique du Hessien et gain significatif en temps de calcul), validations quantitative sur fantômes (calcul d’erreur, limites de convergence) et qualitatives sur séquences réelles (variabilité des sites, instruments, patients) pour caractériser la robustesse, la vitesse et la précision de construction des images panoramiques [CI16, CN5, CI19, CN9], analyse de la distribution des valeurs de translation existant entre les images de séquences cystoscopiques classiques et exploitation de ces informations pour l’implémentation d’une sélection dynamique et automatique des paires d’images à recalcr (gain de temps) [RI17].
- Faisabilité de la superposition spatiale de l’information de fluorescence : validation sur fantômes synthétiques simples et première approche de visualisation 3D de vessie [CI24, CN17]

Poursuite des travaux (en cours et perspectives) :

- Finalisation de l’instrumentation en cours [CI24] et premier essai en clinique prévu en 2008
- Construction d’images panoramiques de vessie quasi-entière et réduction du temps de construction en utilisant des techniques de prédiction de trajectoires/positions à partir des informations de translation entre les images précédentes
- Recherche de solutions de représentation voire de recalage 3D en cours (visualisation, acquisition)

Production scientifique :

- 2 articles en revues internationale et 1 article en revue nationale à comité de lecture [RI11, RI17, RN3] (consultables en intégralité en partie C, pages 163, 179 et II.2)
- 6 conférences internationales à comité de lecture [CI12, CI13, CI17, CI24, CI16, CI19]
- 3 conférences nationales [CN17, CN5, CN9]

Mots clés : calibrage d’endoscope, mosaïquage, information mutuelle, corrélation de phase, recalage d’images par composition inverse, endoscopie de fluorescence, cancer de la vessie

II.2.2.2.2 Action 2 : Microspectrofluorimétrie de gap-FRAP

La diminution du nombre et de la fonctionnalité des jonctions communicantes cellulaires (gap-jonctions) intervient de façon précoce dans le processus de cancérisation. La technique de gap-FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) peut mettre en évidence des modifications spécifiques de l’activité de ces jonctions et ainsi optimiser la qualité de l’identification diagnostique de cancers par une information supplémentaire de nature fonctionnelle. Le principe consiste à utiliser un fluorophore exogène qui va pénétrer par diffusion passive au sein des cellules et va ensuite (après hydrolyse) circuler entre les cellules par ces gap-jonctions. Le photoblanchi-

ment d'une ou plusieurs cellules est alors réalisé par irradiation LASER et la cinétique du retour de fluorescence est mesurée sur cette zone. Les travaux menés au cours des dernières années dans le domaine concernent principalement l'application de la technique de gap-FRAP en imagerie microscopique sur cultures cellulaires. Appliquée à la biopsie optique, nos travaux visent le transfert de la technique à l'échelle tissulaire *in vivo*. Compte tenu des importantes problématiques en biologie et en instrumentation, le travail de thèse de M. Abacci [Th10] a été co-dirigé par les Dr. M. Barberi-Heyob (biologiste, CRAN, CAV) et J. Didelon (IR, INSERM, CAV).

Ma contribution a donc concerné les aspects scientifiques et techniques liés à l'instrumentation, à la modélisation des réponses temporelles de recouvrement de fluorescence ainsi qu'au traitement des images en microscopie de fluorescence.

Participants (CRAN) : 1 PU-PH, 1 chercheur (biologie) et 1 MCU

Partenaires : 1 ingénieur de recherche INSERM, CAV

Encadrement doctoral : 1 thèse soutenue le 21 octobre 2008 (Muriel Abbaci, co-encadrement 30%, ED BioSE)

Objectifs des travaux :

- Photobiologie : expliquer les phénomènes associés au recouvrement de fluorescence pour des types cellulaires différents et des échelles différentes (vers l'échelle tissulaire)
- Optimiser la qualité de l'identification diagnostique de cancers (approche fonctionnelle).
- Valider l'application de la technique de gap-FRAP à l'échelle tissulaire et le transférer de la microscopie vers la spectroscopie fibrée.
- Associer une modélisation des cinétiques de gap-FRAP en 3D (méthodes théoriques et expérimentales)
- Valider les méthodes sur modèles de complexité croissante.

Verrous à lever :

- Photobiologie : mesure quantitative des connexines (nombre et activité), choix d'une sonde fluorescente utilisable sur tissu *in vivo*
- Validation expérimentale : application 3D (souches saines et cancéreuses, tissus *in vivo*)
- Instrumentation : microspectrofluorimétrie fibrée de gap-FRAP associée à une référence image

Principaux résultats obtenus, points forts et originalités :

- Etude de 3 lignées cellulaires saine et cancéreuses en monocouche : développement de modules d'adaptation imagerie microscopique - spectrofluorimétrie, obtention de réponses spécifiques en microscopie confocale et à épifluorescence [RN2, CI11, CN7, CN4]
- Validation des sondes fluorescentes choisies en 2D et 3D (calcéine AM), et application d'un modèle mathématique simple (mono- et multi-exponentielle) des cinétiques de retour de fluorescence [RI10, CI18, CN10]
- Etude à l'échelle multi-cellulaire (3D) sur sphéroïdes : résultats obtenus pour 2 lignées de cellules cancéreuses montrant des cinétiques de recouvrement d'amplitudes modifiées en comparaison de celles *in vitro* [RI12, CI26]
- Etude sur tissus *ex vivo* (vessie de rongeur) : comparaison originale de la communication intercellulaire dans les modèle 2D et 3D en fonction des zones adjacentes et de la région photoblanchie (imagerie confocale).

Poursuite des travaux (en cours et perspectives) :

- Modélisation du comportement de la diffusion intercellulaire du marqueur et en absorption/diffusion de la lumière, permettant de mettre en relation les phénomènes biologiques et/ou biophysiques et certains paramètres tels que la photodégradation de la sonde, le

nombre de jonctions communicantes, la surface de contact intercellulaire, la mobilité cellulaire, voire leur capacité métastatique...

- Développement d’un outil portatif de spectroscopie fibrée de gap-FRAP et couplage avec l’imagerie cystoscopique en fluorescence induite

Production scientifique :

- 2 articles en revues internationale et 1 en revue nationale à comité de lecture [RI10, RI12, RN2]
- 3 conférences internationales à comité de lecture [CI11, CI18, CI26]
- 4 conférences nationales [CN2, CN7, CN4, CN10]

Mots clés : diffusion intercellulaire, FRAP, modélisation de cinétiques de fluorescence, imagerie confocale, spectroscopie fibrée

II.2.2.2.3 Action 3 : Spectroscopie bimodale, modélisation en autofluorescence et diffusion élastique et classification pour le diagnostic

Le principe des méthodes de caractérisation spectroscopiques de tissus biologiques *in vivo* (biopsie optique) consiste à analyser les spectres d’intensité émis par ces tissus suite à une excitation lumineuse appropriée. Les constituants des tissus biologiques (organites, cellules, matrices extra-cellulaires) sont autant d’éléments absorbants, diffusants et fluorescents qui jouent un rôle dans la manière dont la lumière se propage et ressort de ces tissus. On cherche ainsi à détecter les modifications des caractéristiques photo-physiques associées aux modifications structurelles et fonctionnelles de ces constituants tissulaires, et qui caractérisent certaines évolutions pathologiques (en particulier cancéreuses). Les travaux menés au cours des 15 dernières années dans le domaine montrent que l’exploitation d’informations spectrales en autofluorescence et en diffusion de photons (élastique et inélastique) permet d’augmenter significativement la sensibilité et la spécificité de détection de différents stades de développement de cancers. Néanmoins, dans beaucoup de cas, le nombre de faux-positifs reste encore trop élevé en particulier lorsqu’il s’agit de discriminer les états inflammatoires d’états pré-cancéreux. Pour tenter de résoudre ces problèmes une approche “multi-modalité” (travaux de quelques équipes au niveau international) consiste à combiner ces techniques pour disposer de données complémentaires à fusionner.

Au sein de cette action dont j’ai assuré la gestion et le développement depuis 2003, ma contribution a concerné **l’instrumentation** (développement, réalisation, calibrage, *etc.*), **la modélisation des interactions lumière-tissus** (simulation statistique, identification de paramètres optiques des tissus) et **le traitement des données spectroscopiques** (traitements des spectres, extraction/sélection de caractéristiques, classification).

Participants (CRAN) : 1 PU-PH et 1 MCU (61)

Partenaires : 1 MCU-HDR (BioMoCeTi, UPMC–Paris 6), 1 Ingénieur de Recherche (INSERM, CAV, Nancy)

Encadrement doctoral : 1 thèse soutenue en octobre 2007 (Emilie Pery, co-direction 80%, ED IAEM), 1 thèse soutenue en octobre 2008 (Marine Amouroux, co-encadrement 40%, ED BioSE) et 1 thèse à soutenir début 2009 (Giberto Diaz-Ayil, co-direction 60%, ED IAEM)

Objectifs des travaux :

- Combiner spatialement les mesures d’auto fluorescence (sensibles aux modifications biochimiques et structurales du tissu) et de diffusion élastique (sensibles aux modifications anatomiques et architecturales)

- Optimiser la qualité de l'identification diagnostique (approche multi-modalités, résolutions spatiale et spectrale)
- Améliorer le réalisme de la modélisation du comportement des tissus biologiques (méthodes théoriques et expérimentales) pour identifier les propriétés optiques spectrales des tissus (absorption, diffusion et fluorescence intrinsèque)
- Améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic (extraction de caractéristiques, classification)
- Valider les méthodes (instruments et traitement des données) sur modèles précliniques en se rapprochant de l'étiologie tumorale humaine pour permettre un transfert clinique optimal

Verrous à lever :

- Techniques : développement et validation métrologique d'une instrumentation de spectroscopie multi-modalité résolue spatialement, utilisable *in vivo* puis en clinique.
- Traitement de données : extraction de caractéristiques spectrales discriminantes pour la classification affinée d'états hyperplasiques et dysplasiques.
- Modélisation des interactions lumière-tissus en fluorescence et diffusion multiple pour les milieux multi-couches

Principaux résultats obtenus, points forts et originalités :

- Etude sur tissus artériels sous contraintes, frais et issus de cryoconservation : validation de la technique associant un spectrofluorimètre et une maquette de spectroscopie de diffusion élastique, identification des paramètres optiques d'absorption et de diffusion en fonction des déformations mécaniques [RI9, RI14, CI14, CI15, CN3, CN6, CN8].
- Développement d'un algorithme de simulation statistique pour la modélisation multi-couches en diffusion et fluorescence multiples et validation sur fantômes synthétiques [RI15, CN11]
- Etude sur tumeurs orthotopiques instillée dans la vessie de rat : mise en oeuvre d'un système d'excitation unique d'autofluorescence et de diffusion élastique à 13 distances inter-fibres, extraction de caractéristiques, classification supervisée de 3 stades histologiques, amélioration de la sensibilité et de la spécificité grâce aux données multi-modales et après sélection de paramètres spectroscopiques particuliers [CI21, CI22, CI27] (1 article en revue internationale en cours de rédaction)
- Etude sur tumeurs spontanées UV-induites sur la peau de souris : mise au point du modèle pré-clinique, développement d'un système d'excitation multiple d'autofluorescence et de diffusion élastique, classification histologique d'états intermédiaires hyperplasiques et dysplasiques, extraction et sélection de caractéristiques spectrales en fonction des distances inter-fibres et des modalités d'excitation, classification supervisée et évaluation des performances diagnostiques à l'aide de différentes méthodes de classification (modèles linéaires, ACP, k-NN, AFD, SVM) [RI16, RI18, CI23, CI25, CI27, CN15, CN16, CN12, CN13, CN14].

Poursuite des travaux (en cours et perspectives) :

- Développement de méthodes de classification des données spectroscopiques en collaboration avec l'équipe Biostatistiques de l'IECN (S. Tindel), rédaction en cours d'un article de revue en commun
- Optimisation de l'instrumentation (réduction du temps de mesure, amélioration du RSB) et packaging pour le transfert en clinique (sous-traitance industrielle, société Kaluti)
- Analyse de corrélations temporelles des données spectrales (étude sur souris UV-irradiées) en collaboration avec le GT IRIS (D. Brie)

- Extraction et classification à l'aide de modèles non linéaires (Information Mutuelle, SVM)
- Stage de M2R en cours (H. Liu) et financement de thèse obtenu pour 2008-2011

Production scientifique :

- 6 articles en revue internationale à comité de lecture [RI9, RI13, RI14, RI16, RI15, RI18] (dont les 4 derniers consultables en intégralité en pages 197, 207, 223 et 235)
- 8 conférences internationales à comité de lecture [CI14, CI15, CI20, CI21, CI22, CI27, CI25, CI23]
- 9 conférences nationales [CN3, CN6, CN8, CN11, CN15, CN16, CN12, CN13, CN14] dont 1 communication orale invitée [CN11]

Mots clés : mesures physiques, spectroscopie *in vivo*, autofluorescence, diffusion multiple, simulation statistique, identification des propriétés optiques, extraction de caractéristiques spectrales, classification supervisée

II.2.2.3 Positionnement de mes activités (sections CNU 61 et 63)

Mes travaux de recherche concernent **le développement et l'application de concepts, de méthodes, de moyens et d'outils pour la caractérisation de tissus biologiques par spectro-imagerie *in vivo***. L'objectif final de détection et de caractérisation de lésions précancéreuses et cancéreuses précoces passe par :

- la localisation de lésions en imagerie endoscopique qui nécessite l'acquisition et le traitement d'images en lumière blanche et en fluorescence et la construction d'images panoramiques 2D superposant les deux modalités,
- la caractérisation tissulaire par spectroscopie optique point par point qui nécessite l'acquisition et le traitement de signaux multidimensionnels (dimensions spectrale, spatiale et temporelle), l'identification de paramètres optiques des tissus à partir de mesures globales de surface (nécessitant la mise en œuvre d'une modélisation des interactions lumière – tissus appropriée), l'extraction et la sélection de caractéristiques spectrales menant à une classification diagnostique optimale.

II.2.2.3.1 Instrumentation

Le développement, la réalisation et la validation métrologique et expérimentale de systèmes d'acquisition de données en spectroscopie multimodale et en imagerie endoscopique de fluorescence sont rendus nécessaires de par leurs spécificités et leurs contraintes d'application en situation *in vivo* voire clinique. Le regroupement de ces équipements de spectro-imagerie UV-Vis-NIR constitue l'une des plateformes d'expérimentation du CRAN.

La spectroscopie multimodale couplant les mesures en excitation d'AutoFluorescence (AF) et en Réflectance Diffuse (RD) est développée par seulement quelques équipes au niveau international. Elle nécessite la conception et la réalisation d'une instrumentation spécifique, en particulier dans le cas d'une utilisation *in vivo*. Depuis 2005, nous avons développé et mis au point un système automatisé de spectroscopie UV-Vis-NIR fibrée résolue spatialement c'est-à-dire permettant l'acquisition simultanée de spectres tissulaires à plusieurs distances inter-fibres. Notre système de source de lumière configurable repose sur un ensemble de filtres optiques linéairement variable, passe-haut et passe-bas, permettant de fournir une succession de pics d'excitations pour l'auto-fluorescence (bandes étroites et longueurs d'onde centrales entre 360 et 450 nm) et de bandes d'illumination plus larges pour la réflectance diffuse (360 à 750 nm). Des procédures spécifiques de calibrage et de corrections de la réponse spectrale du système et des variations de puissance en fonction du temps, adaptées aux protocoles expérimentaux précliniques menés sur plusieurs

semaines, ont été établies. L'ensemble de ces éléments est détaillé dans les références suivantes : [RI18, CI23, CI27, CN12, CN13, CN14]. Finalement, l'optimisation et le packaging de cette instrumentation pour le transfert en clinique sont en cours (réduction du temps de mesure, amélioration du RSB, sous-traitance industrielle) avec un objectif d'utilisation en clinique en 2009 (dermatologie).

L'originalité du système d'imagerie endoscopique développé au laboratoire concerne la visualisation simultanée et en temps réel des images en lumière blanche et d'images de fluorescence avec excitation dans la bande 390-450nm. Le principe, détaillé dans [RN3], consiste à acquérir ces différentes images successivement dans le temps, au rythme d'une acquisition vidéo et en synchronisation avec un système de commutation rapide entre une source d'illumination en lumière blanche et une source d'excitation d'autofluorescence. Cette approche permet d'obtenir des séquences d'images en lumière blanche et en fluorescence superposables spatialement, que nous pouvons alors utiliser pour construire des images panoramiques bimodales à l'aide de techniques de mosaïquage [RI11, CI19]. L'ensemble est utilisable sur tout type d'endoscope rigide ou souple. Le dernier prototype réalisé dans le cadre d'un projet de collaboration technologique multi-laboratoires (cf. §II.4.2.2, page 31) permet de disposer d'un système de dimension réduite avec lequel un premier essai clinique est envisagé en 2008 [CI24, Th9, Th7].

II.2.2.3.2 Modélisation des interactions lumière – tissus biologiques

En spectroscopie point par point, la forme et l'amplitude des spectres d'intensité mesurés dépendent des propriétés optiques du tissu analysé, elles-mêmes liées à la présence des éléments constitutifs du tissu (organites cellulaires, cellules, matrices, vaisseaux. . .). La nature, la fonctionnalité, le nombre, la densité, la dimension, l'orientation et l'organisation de ces différents constituants varient en fonction du type de tissu et selon son état (sain ou pathologique par exemple). Du point de vue optique, ces constituants font des tissus biologiques des milieux absorbants, très diffusants et multi-fluorescents (plusieurs fluorophores excités à différentes longueurs d'onde). Compte tenu de cette grande complexité, la modélisation des interactions entre la lumière et les tissus biologiques afin de déterminer les propriétés optiques locales de ceux-ci constitue un axe de développement important. Parmi les principales approches existantes (résolutions numériques par méthode des flux de l'Equation de Transfert Radiatif, modèle par approximations de Kubelka-Munk, simulation statistique, cf thèse d'E. Pery [Th8]), la simulation statistique de la propagation de photons par méthode de Monte Carlo est actuellement la seule à pouvoir prendre en compte la complexité des tissus biologiques. En contre-partie, son principal inconvénient réside dans le temps de calcul nécessaire pour converger vers la solution. Le principe consiste à déplacer dans un modèle multi-couches du tissu un très grand nombre de photons dans des directions et sur des distances tirées au sort suivant des fonctions de distribution de probabilités caractéristiques du milieu c'est-à-dire fonction des coefficients optiques de chaque couche (notamment μ_a , μ_s et g les coefficients d'absorption, de diffusion et d'anisotropie respectivement). Peu de travaux existent en fluorescence et aucun en fluorescence multiple ou tenant compte des spectres entiers d'absorption et d'émission de fluorophores. Or, ces propriétés sont d'importance majeure dans le cas de notre approche en spectroscopie bimodale UV-Vis-NIR. Nous avons donc développé un algorithme de simulation de propagation de la lumière dans un milieu multi-couches absorbant et diffusant, prenant en compte l'excitation et l'émission multiple de fluorescence sur la base d'un échantillonnage des spectres d'absorption de chaque fluorophore suivi d'une sélection de la longueur d'onde d'émission selon une densité de probabilité fonction du spectre d'émission. Une validation expérimentale rigoureuse sur fantômes a permis de confirmer le bon fonctionnement de l'algorithme développé. La description détaillée de l'algorithme et sa validation sur fantômes

sont publiés dans [RI15, CI15]. Cet algorithme (modèle) a été appliqué pour identifier les coefficients optiques (μ_a , μ_s et g , paramètres du modèle) de tissus artériels multi-couches (absorbants, diffusants et fluorescents) et leurs variations en fonction de modifications structurales (variations d'épaisseurs) obtenues par déformations mécaniques; les artères constituant un excellent modèle expérimental pour cela. Compte tenu des temps très longs de simulation, une analyse exhaustive de l'espace de variation des paramètres n'est pas envisageable et la recherche de valeurs optimales pour ces paramètres a été effectuée en utilisant une méthode d'optimisation de type simplex de Nelder-Mead, ne nécessitant pas de calcul de dérivée(s). Les valeurs initiales des paramètres à optimiser ont été extraites ou interpolées à partir des quelques valeurs disponibles dans la littérature. L'ensemble des résultats de ces travaux est publiée dans [CI20, CI15, CI22] et [CI20, RI14] en intégralité pages 155 et 223.

II.2.2.3.3 Extraction/sélection de caractéristiques et classification

Les spectroscopies d'AutoFluorescence (AF) et de Réflectance Diffuse (RD) résolues spatialement génèrent, pour un point de mesure sur un tissu, des spectres d'intensité échantillonnés en longueur d'onde λ , pour plusieurs excitations de fluorescence, dans plusieurs bandes de RD et pour plusieurs distances entre la fibre d'excitation et les fibres d'émission. C'est à partir de ces jeux de données extrêmement volumineux que l'on cherche à effectuer une classification diagnostique la plus efficace possible c'est-à-dire avec les Sensibilité (Se) et Spécificité (Sp) les plus élevées en référence à la classification histologique ("*gold standard*"). La première difficulté réside dans l'extraction de paramètres spectraux particuliers caractérisant les variations d'amplitude et de forme des spectres et potentiellement discriminants pour la classification. Cette étape permet une première réduction de la dimension du jeu de données à l'aide de caractéristiques également plus "interprétables" : aires sous courbe, intensités à des longueurs d'onde d'intérêt (pics d'absorption de l'hémoglobine par exemple), ratios, pentes... La deuxième étape consiste à analyser la normalité des distributions des valeurs des caractéristiques extraites (tests de type shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Lilliefors) puis à sélectionner les plus discriminantes vis-à-vis des classes histologiques à différencier. Nous avons proposé et testé différents sous-ensembles de caractéristiques originales à partir de données de la littérature et de nos propres observations des spectres acquis dans le cadre de deux études *in vivo* pré-cliniques (modèles tumoraux sur animaux). Le cas échéant, une troisième étape de diminution de la dimension du jeu de données est réalisée sur la base d'une analyse des corrélations. Nous avons par exemple montré que les valeurs de Se et Sp varient sensiblement en fonction du nombre de Composantes Principales (CP) retenues à partir d'une Analyse en Composante Principales (ACP), les valeurs optimales de Se et Sp étant obtenues pour un nombre de CP représentant plus de 90% de l'information contenue dans le jeu de données initial [RI16, RI18] (en intégralité pages 207 et 235. La dernière étape consiste à effectuer une classification supervisée (analyse qualitative) à partir du jeu de données spectrales le plus réduit (ou des CP) en référence à la classification obtenue par l'expertise histologique des lames des échantillons tissulaires biopsiés (propriété de référence). Nous avons évalué l'efficacité de différentes méthodes linéaires hiérarchiques (divisions successives du jeu pour aboutir à la formation d'agrégats -clusters- représentés sous forme de dendrogrammes par exemple) et non-hiérarchiques (méthodes itératives), plus ou moins sensibles au caractère gaussien des distributions de nos jeux de données : classification hiérarchique avec distance de Ward [CI22, CI27], méthode des k plus proches voisins (k -NN), Analyse Discriminante Linéaire (ADL) et *Support Vector Machines* (SVM) [CI23, RI18, RI16]. Les solutions méthodologiques développées (extraction et sélection de caractéristiques spectrales, réduction de dimension) et les résultats de classification obtenus dans le cadre de deux études *in vivo* menées sur modèles de

cancers de vessie de rats et de pré-cancers de la peau de souris sont publiées respectivement dans [CI21, CI22, CI27] et [CI23, RI18, RI16]. Pour la vessie, nous avons montré que la combinaison des modalités spectroscopiques AF et RD augmente les performances de classification diagnostique sain *vs* inflammatoire *vs* cancer (Se et Sp $\geq 90\%$). Pour la peau, nous avons montré que la combinaison des modalités avec multiple excitation de fluorescence associée à l'exploitation des caractéristiques spectrales obtenues à plusieurs distances inter-fibres (excitation-émission) améliore significativement les performances diagnostiques sain *vs* hyperplasie/dysplasie et hyperplasie compensatoire *vs* hyperplasie atypique/dysplasie (Se et Sp = 100%). La classification des états hyperplasiques atypiques *vs* dysplasiques reste un axe de recherche à poursuivre (Se $\leq 70\%$ et Sp $\leq 80\%$).

II.2.2.3.4 Recalage et mosaïquage d'images en endoscopie

Durant la période 2003 - 2005, un premier algorithme robuste de recalage et de mosaïquage automatique a été développé [Th7]. Cette méthode comprend à la fois l'algorithme de recalage des paires d'images consécutives d'une séquence et la résolution de problèmes spécifiques liés aux images endoscopiques (correction des distortions radiales, du shading et filtrage du motif de fibres optiques visible dans le cas des fibroscopes). L'algorithme de recalage utilise une mesure de similarité basée sur l'Information Mutuelle (IM) des niveaux de gris entre chaque paire d'images consécutives et une méthode d'optimisation des paramètres de transformation utilisant un gradient stochastique. Un ajustement global et simultané des matrices issues du recalage d'images a conduit à des cartes visuellement justes. Une évaluation quantitative de l'erreur de mosaïquage (quelques pixels) a été réalisée à l'aide d'un fantôme de vessie de porc [CI12, CI17]. Une méthode d'étalonnage d'endoscope dont le principal avantage est d'être aussi précise que les meilleures de la littérature tout en étant plus flexible que ces dernières, a également été validée [CI13, RI11]. Cet étalonnage, qui ne nécessite ni une mire particulière, ni dispositif précis de positionnement, est applicable en milieu clinique. Globalement, l'algorithme de recalage proposé [CI24, CI17] est le premier qui autorise un mosaïquage automatique et suffisamment robuste pour prendre en compte la variabilité inter-patients ainsi que celle due aux différents endoscopes. Une seconde étude menée de 2004 à 2007 nous a permis de poursuivre ces travaux en évoluant vers un algorithme rapide de mosaïquage automatique compatible avec la durée de l'examen clinique et suffisamment robuste [Th9]. Après avoir évalué une première approche basée sur la transformée de Fourier-Mellin [CI16], nous avons mis en oeuvre une méthode composite de calcul des paramètres de transformation perspective pour le recalage des images. Les valeurs des paramètres de translation obtenues par un calcul de corrélation servent d'initialisation rapide à un algorithme d'optimisation itératif court de l'ensemble des paramètres. Ce dernier est basé sur une méthode de minimisation d'erreur (Gauss-Newton) par composition inverse permettant un calcul unique du Hessien et donc un gain significatif de temps de calcul. Des validations de la solution développée sur fantômes (application de transformations connues, calcul d'erreur, limites de convergence) et sur séquences réelles (variabilité des sites, instruments, patients) nous ont permis de caractériser quantitativement et qualitativement la robustesse, la vitesse et la précision de construction des images panoramiques [CI16, CN5, CI19, CN9]. L'approche développée nous a permis d'analyser les distributions des valeurs de translation existant entre les images de séquences cystoscopiques classiques et nous avons exploité ces informations pour mettre en oeuvre une étape algorithmique de sélection dynamique et automatique des paires d'images à recaler nous permettant ainsi de diminuer d'un facteur 2 à 4 le temps global de construction d'une image panoramique complète [RI17] (en intégralité page 179). Par ailleurs, nous avons validé la faisabilité de la superposition spatiale sur une image panoramique construite, d'informations de fluorescence à l'aide de fan-

tômes synthétiques simples ainsi qu'une première approche de visualisation 3D sur une forme générique de vessie [CI24, CN17].

II.3 Implications dans l'encadrement scientifique depuis 2003

Depuis ma titularisation au CRAN en 2003, j'ai encadré ou co-encadré 5 stages de Master Recherche et 6 thèses dont 3 déjà soutenues. Je co-encadre également 1 thèse débutée en 2007 et je co-dirigerai 1 nouvelle thèse à partir de la rentrée 2008.

Je suis bénéficiaire de la **PEDR** (Prime d'Encadrement Doctoral et de Recherche) depuis le 01/10/2003, renouvelée le 01/10/2007.

II.3.1 Encadrement de stages de DEA/M2R

J'ai encadré et co-encadré respectivement 3 et 2 stages pour un taux d'encadrement total de 400% sur 500%.

2004 Muriel Abbaci [Th1]

- DEA Bioingénierie-Biomatériaux, Ecole Doctorale BioSE, UHP Nancy 1
- Encadrement : W. Blondel 50%, J. Didelon (CAV) 50%
- Rattachée à l'action 2 (microspectrofluorimétrie de gap-FRAP)

2004 DEA Bioingénierie-Biomatériaux, Jean-Christophe Goebel [Th2]

- Ecole Doctorale BioSE, UHP Nancy 1
- Encadrement : W. Blondel 100%
- Rattaché à l'action 1 (spectroscopie bimodale)

2005 Yannick Burdin [Th5]

- DEA Contrôle, Signaux et Communication, Ecole Doctorale IAEM-Lorraine, INPL
- Encadrement : W. Blondel 100%
- Rattaché à l'action 3 (imagerie endoscopique et mosaïquage)

2005 Annabelle Monnier [Th4]

- DEA Bioingénierie-Biomatériaux, Ecole Doctorale BioSE, UHP Nancy 1
- Encadrements : W. Blondel 50%, J. Didelon (CAV) 50%
- Rattachée à l'action 2 (microspectrofluorimétrie de gap-FRAP)

2008 Honghui Liu [Th3]

- M2R Ingénierie des Systèmes option Automatique, Diagnostic, Signal et Bio-imagerie, Ecole Doctorale IAEM-Lorraine, INPL
- Encadrement : W. Blondel 100%
- Rattaché à l'action 1 (spectroscopie bimodale)

II.3.2 Encadrement de thèses

Depuis 2003, j'ai co-encadré 3 thèses soutenues (dont 2 en tant que co-directeur) et 3 autres thèses (dont 1 en tant que co-directeur) qui seront soutenues en octobre 2008 (2) et en février 2009, pour un taux d'encadrement total de 290% sur 600%. Je co-encadre une nouvelle thèse depuis 2007 et j'en co-dirigerai une autre à partir de la rentrée 2008.

2003-2005 Rosebet Miranda [Th7]

- Ecole Doctorale IAEM-Lorraine, Doctorat de l'INPL, 29 mars 2005
- Bourse CONACYT (étudiant mexicain)
- Encadrement : W. Blondel 40%, C. Daul 40% (co-directeur), D. Wolf 20% (directeur)

- Titre : Contribution au mosaïquage d'images endoscopiques d'organes creux pour l'aide au diagnostic du cancer en phase précoce
- Rapporteurs : Pr. Hirsch (section 61, LSIT, Strasbourg), Dr. O. Haeberle (section 61, MIPS, Mulhouse)
- Position après la thèse : enseignant-chercheur à l'Université Technologique de Mixteca, Oaxaca, Mexique
- Production scientifique : 1 RI [RI11], 3CI [CI12, CI13, CI17], 1 CN [CN5].

2003-2007 Emilie Pery [Th8]

- Ecole Doctorale IAEM-Lorraine, Doctorat de l'INPL, 31 octobre 2007
- Bourse co-financée Région Lorraine - Centre Alexis Vautrin
- Encadrement : W. Blondel 80% (co-directeur), F. Guillemin 20% (directeur)
- Titre : Spectroscopie bi-modale en diffusion élastique et autofluorescence résolue spatialement : instrumentation, modélisation des interactions lumière-tissus et application à la caractérisation des tissus biologiques *ex vivo* et *in vivo* pour la détection de cancers
- Rapporteurs : Pr. H. Saint-Jalmes (section 63, CREATIS-LRMN, Lyon), Dr. A. Humeau (section 61, LISA, Angers)
- Position après la thèse : ATER à l'UHP puis en post-doctorat depuis septembre 2008 au CREATIS-LRMN à Lyon et au CEA-LETI à Grenoble (sujet intitulé "Reconstruction en tomographie optique de fluorescence : régularisation par apport d'informations fournies par l'imagerie ultrasonore")
- Production scientifique : 3 RI [RI9, RI14, RI15], 6 CI [CI14, CI15, CI20, CI21, CI22, CI27], 3 CN [CN3, CN6, CN8]

2003-2007 Yahir Hernandez-Mier [Th9]

- Ecole Doctorale IAEM-Lorraine, Doctorat de l'INPL, 22 octobre 2007
- Bourse CONACYT (étudiant mexicain)
- Encadrement : W. Blondel 40% (co-directeur), C. Daul 40%, D. Wolf 20% (directeur)
- Titre : Construction rapide d'images panoramiques applicables à l'exploration cystoscopique et à l'endoscopie de fluorescence en cancérologie
- Jury : Pr. J.-G. Postaire (section 61, LAGIS, Lille), Pr M. Paindavoine (section 61, LE2I, Dijon), Dr. A. Humeau (section 61, LISA, Angers)
- Position après la thèse : enseignant-chercheur à l'Université Polytechnique de Victoria, Tamaulipas, Mexique
- Production scientifique : 2 RI [RI11, RI17], 1 RN [RN3], 2 CI [CI16, CI19], 2 CN [CN5, CN9]

2004-2008 Muriel Abbaci [Th10]

- Ecole Doctorale BioSE, Doctorat de l'UHP, soutenance prévue fin septembre 2008
- Bourse ministérielle
- Encadrement : W. Blondel 30%, J. Didelon 30% (co-directeur), M. Barberi 30% (co-directrice), F. Guillemin 10% (directeur)
- Titre : Suivi de la fonctionnalité des jonctions communicantes par la technique de gap-FRAP sur des modèles *in vitro* (2-D, 3-D) et *ex vivo* : Intérêt pour le diagnostic du cancer
- Jury : Pr. G. Wagnières (EPFL, Suisse), Dr. M.-L. Zaidan Dagli (Sao Paulo, Brésil)
- Position après la thèse : post-doctorat à l'Institut Gustave Roussy (IGR, département ORL, plate-forme d'imagerie cellulaire)
- Production scientifique : 2 RI [RI10, RI12], 2 CI [CI18, CI26], 2 CN [CN4, CN10]

2005-2008 Marine Amouroux [Th11]

- Ecole Doctorale BioSE, Doctorat de l’UHP, soutenance prévue fin septembre 2008
- Bourse ministérielle
- Encadrement : W. Blondel 40%, G. Bourg-Heckly 50% (co-directrice), F. Guillemain 10% (directeur)
- Titre : Classification spectroscopique *in vivo* de stades histologiques de peau UV-irradiée de souris par spectroscopie bimodale (multiple excitation d’autofluorescence et réflectance diffuse)
- Jury : Pr. Jean-Claude Béani (CHU de Grenoble), Dr. Bernard Querleux (laboratoire de recherche avancée, L’Oréal, Paris)
- Position après la thèse : post-doctorat au laboratoire d’Imagerie et de Neurosciences Cognitives (LINC, Institut de Physique Biologique) à Strasbourg (sujet intitulé “Spectroscopie Proche Infra Rouge par Imagerie Temporelle : SPIRIT”)
- Production scientifique : 3 RI [RI16, RI13, RI18], 3 CI [CI25, CI23, CI27], 5 CN [CN15, CN16, CN12, CN13, CN14]

2005-2008 Gilberto Diaz [Th12]

- Ecole Doctorale IAEM-Lorraine, Doctorat de l’INPL, soutenance prévue début 2009
- Bourse du programme ALBAN (étudiant mexicain)
- Encadrement : W. Blondel 60% (co-directeur), G. Bourg-Heckly 30%, Y. Granjon 10% (directeur)
- Titre : Spectroscopie fibrée *in vivo* multi-modalités (autofluorescence, diffusion élastique, Raman) : instrumentation, extraction de caractéristiques et classification
- Production scientifique : 2 RI [RI18, RI16], 3 CI [CI23, CI25, CI27], 4 CN [CN12, CN13, CN14, CN15]

2007-2010 Achraf Ben Hamadou

- Ecole Doctorale IAEM-Lorraine, Doctorat de l’INPL, thèse débutée en 2007
- Bourse ministérielle
- Encadrement : W. Blondel 20%, C. Soussen 40%, C. Daul 40% (directeur)
- Titre : Reconstruction et visualisation 3D de la surface d’un organe creux à partir d’images endoscopiques : application au diagnostic de tumeurs vésicales par fluorescence

2008-2011 Honghui Liu

- Ecole Doctorale IAEM-Lorraine, Doctorat de l’UHP, thèse débutée en 2008
- Bourse co-financée Région Lorraine - Centre Alexis Vautrin
- Encadrement : W. Blondel 60% (co-directeur), G. Bourg-Heckly 30%, F. Guillemain 10% (directeur)
- Titre : Caractérisation de tissus biologiques *in vivo* par spectroscopie multi-modalités : instrumentation, modélisation expérimentale des propriétés optiques et application à la détection/classification de lésions cutanées en clinique

II.4 Activités de responsabilités

II.4.1 Fonctions d’intérêt collectif

2009-2012 Co-responsable (instrumentation et traitement du signal) avec le Dr. Lina Bolotine (biologie) de l’Equipe – Projet “Interactions Rayonnements-Tissus Biologiques” du CRAN

2005-2008 Co-responsable avec L. Bolotine du projet Interactions Lumière-Tissus (ILT) du CRAN

- Responsable de l’action “Spectro-Imagerie de Diagnostic”

- Membre invité du conseil de laboratoire
- Membre de la commission “Information Scientifique et Technique” du laboratoire

2006-2009 Membre élu du Conseil Scientifique de la faculté de médecine de Nancy

- Membre élu du bureau

2005-2008 Membre élu du Conseil d'Administration de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1

2004-2008 Membre de la Commission de Spécialiste section 61 de l'INPL à Nancy

2000-2004 Membre élu du Conseil de Gestion de la faculté de médecine de Nancy

II.4.2 Recherche de financements et gestion de contrats

II.4.2.1 Recherches de financement

La structuration des actions de recherche présentées en II.2.2 a nécessité l'acquisition de nombreux équipements de laboratoire pour le développement d'une plate-forme d'expérimentation en imagerie et spectroscopie optiques NUV-VIS-NIR : système d'acquisition d'images en endoscopie de fluorescence, système de positionnement multi-axes motorisé, sources de lumière large bande Deutérium/halogène et Xenon, diode laser fibrée 410 nm, spectromètres miniatures, capteurs à multi-fibres optiques, spectromètre imageur multi-voies Jobin Yvon, stations de travail (mosaïquage d'images, simulation statistique), équipements de laboratoire pour les expérimentations, etc. Encouragé et soutenu dans cette démarche par les responsables du CRAN, j'ai rédigé de nombreux dossiers de demande de financement à destination de la ligue contre le cancer, du ministère de la recherche et du CNRS. La liste des subventions recherche obtenues depuis 2004 représentant une **enveloppe globale de 182k€** est donnée dans le tableau II.3. J'ai assuré la **gestion** de l'ensemble de ces projets et la **rédaction** des compte-rendus aux organismes financeurs (achats et travaux réalisés, résultats scientifiques obtenus).

TABLE II.3 – Tableau récapitulatif des demandes de financement obtenues.

Année (durée)	Appel A Projet Source de financement	Titre du projet	Montant demandé	Montant obtenu
2004 (12 mois)	Financement Recherche 2004 – Ligue Régionale de Lutte Contre le Cancer	Nouvelles Méthodes Optiques en Spectro-Imagerie de Diagnostic du Cancer	39k€	28k€
2005 (12 mois)	ATIP Jeunes Chercheurs 2005 – Département STIC du CNRS	Développements et applications en Spectro-Imagerie de Diagnostic <i>in vivo</i> du Cancer	15k€	15k€
2005 (12 mois)	Financement Recherche 2005 – Ligue Régionale de Lutte Contre le Cancer	Nouvelles Méthodes Optiques en Spectro-Imagerie de Diagnostic du Cancer	36.5k€	36.5k€
2006 (12 mois)	Financement Recherche 2006 – Ligue Régionale de Lutte Contre le Cancer	Nouvelles Méthodes Optiques en Spectro-Imagerie de Diagnostic du Cancer	21.8k€	21.8k€
2006 (12 mois)	BQR Projets émergents, jeunes enseignants-chercheurs – UHP et Région Lorraine	Miniaturisation du système d’acquisition d’images pour l’endoscopie de fluorescence multi-bandes	18k€	18k€
2007	Financement Recherche 2007 – Ligue Régionale de Lutte Contre le Cancer	Spectroscopie d’auto fluorescence et de diffusion élastique pour la détection de stades précoces de développement de carcinomes cutanés	55.5k€	32.8k€
2007	Equipement Recherche 2007 – CNRS	Equipement pour une plate-forme de spectroscopie	20k€	10k€
2008	Financement Recherche 2008 – Ligue Régionale de Lutte Contre le Cancer	Spectroscopie d’auto fluorescence et de diffusion élastique pour la détection de stades précoces de développement de carcinomes cutanés	20.6k€	20k€

II.4.2.2 Contrat de collaboration technologique

Contrat de collaboration CRAN (Nancy) – BioMoCeTi (Paris) – CEA-LETI (Grenoble)

- Durée : 8 mois (2006-2007)
- Objet : réalisation d’un nouveau prototype de dimension réduite du système d’acquisition d’images pour l’endoscopie de fluorescence à multiples bandes spectrales (cf. action 1 §II.2.2.2.1, page 17)
- Montant total : 68k€
 - Financement d’équipement (CRAN) : 18k€ (BQR UHP – Région Lorraine)
 - Financement de fonctionnement et d’équipement (LETI) : 50k€ (Recherche Technologique de Base)

II.4.3 Participation à l’organisation de congrès et Rayonnement

- 2005** Congrès national JSTIM (Sciences, Technologie et Imagerie en Médecine), Nancy
 - Membre du comité d’organisation
- 2006** Congrès international 6th IFAC Symposium on Modelling and Control in Biomedical Systems (MCBMS’06), Reims
 - Responsable de l’organisation d’une session spéciale “Optical methods for *in vivo* diagnosis”
- 2006** Journée Imagerie et Analyse Spectrale en Microscopie, Paris
 - Présentation orale [CN11], invité par l’Association Française de Cytologie
- 2007** Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation (C2I), Nancy
 - Membre du comité scientifique

- Responsable de l'organisation d'une session spéciale "Applications en santé".

2007 1st Jordanian International Biomedical Engineering Conference (JIBEC), Amman, Jordanie

- Membre du comité scientifique

2008 6th IEEE Mediterranean Conference on Control and Automation (MED08), Ajaccio

- Responsable de l'organisation d'une session invitée "Méthodes optiques pour la caractérisation de tissus biologiques"

2001-2008 Relecteur pour les revues :

- Biomedical Engineering Online
- Clinical Haemorheology and Micro-circulation
- IEEE Transactions on Biomedical Engineering

2008-2009 Co-rédacteur pour la revue I2M (Instrumentation Mesure Métrologie, Ed. Lavoisier)

- Numéro spécial "applications biomédicales" à paraître début 2009
- 10 articles de 20-30 pages chacun

2008 Membre examinateur du jury de thèse de M. Kervella, Centre d'Etudes et de Recherche pour l'Aide à la Décision (CERADE), Groupe ESAIP (Ecole Supérieure Angevine d'Informatique et de Productique), Angers

- Thèse intitulée "Contribution à la modélisation et à la simulation numérique de la spectroscopie optique des tissus biologiques : application à l'imagerie moléculaire de fluorescence résolue en temps"

II.4.4 Implications individuelles en recherche et mobilité internationale

II.4.4.1 Délégation CNRS (1 année)

En 2006, j'ai demandé et obtenu 1 année de délégation en recherche au Laboratoire de Biophysique Moléculaire Cellulaire et Tissulaire (BioMoCeTi - UMR CNRS 7033), Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. Au sein du thème C "Photoactivation moléculaire, Applications biomédicales", j'ai pu renforcer la collaboration existant avec l'équipe de Geneviève Bourg-Heckly dans le cadre de nos travaux communs en spectroscopie multi-modalités (action 1), concrétisés par le co-encadrement de 2 thèses et la publication en commun de plusieurs articles dans des revues [RI16, RI18, RN3] et conférences internationales [CI23, CI27].

II.4.4.2 Séjour au Biomedical Optics Laboratory, Boston, USA

Profitant de ma délégation CNRS en 2006-2007, j'ai pris l'initiative d'effectuer un séjour de 6 semaines (juillet-août 2006) au Biomedical Optics Laboratory (BOL), Boston, USA. Cette courte mobilité, rendue possible grâce au soutien financier du CRAN, m'a permis de visiter plusieurs laboratoires de renommée internationale dans le domaine du photodiagnostic et m'a donné l'occasion d'échanger scientifiquement avec les chercheurs de l'équipe du Prof. I. Bigio, spécialiste de spectroscopie de diffusion élastique. Suite à cette mobilité, je suis resté en contact avec plusieurs chercheurs du BOL : nous avons publié 2 papiers en conférences associant l'un d'entre eux [CI23, CN14] et le Pr. I. Bigio a fait partie du jury de thèse de Mademoiselle E. Pery [Th8]. Une convention de collaboration vient d'être signée avec comme objectif premier le renforcement durable de notre collaboration notamment par l'échange de doctorants et/ou de post-doctorants.

Deuxième partie

Mémoire de recherche

*"L'expérience ne se trompe jamais, ce sont nos jugements qui se trompent."
Léonard de Vinci.*

*"Celui qui ne comprend pas, et qui le dit, est celui qui fait le plus évidemment preuve d'intelligence, car il a compris qu'il n'a pas compris et c'est ce qui est le plus difficile à comprendre. Remercions-le, car il fait un cadeau à tous ceux qui, autour de lui, croyaient, à tort, avoir compris."
Albert Jacquard.*

Chapitre I

Introduction

I.1 Photodiagnostic tissulaire

I.1.1 Contexte et enjeux médico-économiques en cancérologie

Nos travaux s'appliquent en priorité à la **caractérisation tissulaire *in vivo*** et au diagnostic en cancérologie.

L'ensemble des cancers représente la deuxième cause de mortalité dans les pays industrialisés. Plus de 85% des cancers prennent naissance dans les couches superficielles (épithélium) des organes du corps humain dont 35% dans la peau et 50% au sein des muqueuses des organes creux [5, 105]. Dans ce cas, l'endoscopie est le moyen indiqué pour l'examen visuel et la détection des lésions sur les parois des voies aériennes (trachée, bronches), digestives supérieures (oesophage, estomac, duodénum) et basses (intestin, côlon), ainsi que des voies uro-génitales (urètre, vessie, utérus).

La détection de lésions tissulaires à un **stade précoce** est un enjeu majeur car elle permet une augmentation importante des chances de guérison tout en utilisant des traitements moins agressifs et aux coûts réduits.

Si l'observation des tissus par endoscopie conventionnelle en lumière blanche ou par d'autres procédures cliniques similaires permet d'identifier les cancers suffisamment avancés (modification significative de l'aspect macroscopique de la muqueuse), la détection et le diagnostic *in situ* de tissus précancéreux et cancéreux précoces i.e. "invisibles" est de fait plus difficile.

Actuellement, les stratégies courantes de surveillance et de détection de ce type de lésion préconisent par exemple, des endoscopies périodiques (1 à 3 ans). Ainsi, l'examen visuel de l'aspect macroscopique de la surface de la muqueuse permet de repérer des zones suspectes visibles qui seront alors biopsiées pour déterminer la nature histopathologique exacte du tissu.

En l'absence d'anomalie remarquable, un certain nombre de biopsies est réalisé de façon plus ou moins aléatoire. Pour certaines pathologies, un quadrillage biopsique systématique est recommandé sur l'ensemble de la muqueuse (exemple : protocole Seattle, tous les 2 cm pour l'oesophage) [58]. Mais cette procédure lourde possède une sensibilité médiocre du point de vue clinique. Par ailleurs, certaines lésions (tumeurs de la vessie par exemple) sont par nature multifocales, ce qui rend les résections délicates car d'autres tumeurs peuvent être présentes à des endroits où elles ne sont pas encore visibles [31].

I.1.2 Problématiques et évolution des besoins cliniques

Un des enjeux important de la **recherche biomédicale** [13, 111] est l'identification et la caractérisation d'états tissulaires *in vivo* localisés pour :

- le diagnostic de pathologies (états précancéreux par exemple) en limitant le besoin de prélèvements chirurgicaux d'échantillons tissulaires,
- le guidage biopsique (amélioration de la sensibilité de la méthode) et chirurgicale (ciblage spatial et aide au contournage c'est-à-dire à la recherche de marges de résection "optimales"),
- le suivi individualisé et en temps réel de l'application et de la réponse à un traitement chimique (dosimétrie en Thérapie PhotoDynamique -PDT-, pharmacocinétique et -dynamique) ou chirurgical (remodelage tissulaire, récidives).

Parallèlement, les évolutions des techniques et technologies médicales visent à fournir des outils et des méthodes diagnostiques de plus en plus **précis**, de plus en plus "**temps réel**", de moins en moins **opérateur-dépendant** et de moins en moins **invasifs** et **traumatiques**. Ce dernier aspect est à prendre au sens de la pénétration mécanique ou chimique dans les tissus et les cellules qui ouvre potentiellement la voie aux risques d'infection ou aux effets secondaires respectivement.

I.1.3 Intérêt et applications des méthodes de spectro-imagerie optique

L'application de l'optique-photonique aux sciences de la vie (biophotonique), en particulier dans le domaine du spectre électromagnétique allant de l'UltraViolet (UV) à l'InfraRouge (IR), vise à exploiter les interactions de la lumière avec les tissus biologiques à des fins thérapeutiques (chirurgie laser, PDT, photothérapie), d'analyses biologiques (microscopies optiques, micromanipulation laser, biopuces) et diagnostiques (caractérisation des tissus sains et pathologiques). Les **méthodes de diagnostic optique** (photodiagnostic) présentent des avantages par rapport aux méthodes classiques de diagnostic (rayons X, IRM...), liés à leur grande sensibilité, à la nature non ionisante de la lumière et au caractère atraumatique (non invasif) de la mesure.

Les **propriétés optiques** des tissus biologiques sont fonction de leur structure et organisation cellulaire et tissulaire ainsi que de leur composition ou activité biochimique. Les mesures optiques ont ainsi un fort potentiel de développement d'outils non invasifs de **diagnostic médical *in vivo in situ*** (biopsie optique) [111, 99].

Différents types de propriétés optiques peuvent être mesurés en exploitant les phénomènes de **fluorescence**, d'**absorption**, de **diffusions** élastique et inélastique, qui fournissent des informations complémentaires [14]. Au cours des dix dernières années, la sensibilité et la spécificité en terme de détection *in vivo* de néoplasies précoces ont été évaluées pour plusieurs nouvelles techniques endoscopiques de diagnostic, les plus répandues étant l'imagerie de fluorescence et d'autofluorescence et les Spectroscopies d'AutoFluorescence (SAF) et de diffusions [12, 31, 48]. Les différentes méthodes de spectroscopie optique actuellement en cours d'évaluation utilisent la fluorescence, la diffusion élastique et/ou la diffusion Raman. Historiquement la première à être utilisée à des fins diagnostiques, la fluorescence reste aujourd'hui le phénomène le plus exploité et donne lieu à la majorité des travaux de recherche en photodiagnostic, tant fondamentaux que cliniques [97]. L'**approche spectroscopique**, de par sa grande résolution spectrale, constitue également une étape primordiale de caractérisation spectrale de l'émission d'autofluorescence des tissus humains aux différents stades du développement tumoral. Elle permet notamment de préciser et d'optimiser le seuillage des images de rapports de bandes spectrales dans le cas du développement de **systèmes d'imagerie** (endoscopique) possédant une plus grande résolution spatiale (surface observée de l'ordre du cm^2) et une résolution spectrale réduite (quelques bandes de longueurs d'ondes choisies) [48, 52].

En envisageant la procédure dans son ensemble, nous pouvons définir **3 principales étapes** ou axes d'action de recherche complémentaires et compatibles avec les atouts des méthodes de spectro-imagerie optique :

- la **détection** et la **localisation** à l'échelle macroscopique du tissu : “il y a une anomalie et elle se trouve à tel endroit dans l'organe”. En endoscopie, les travaux actuels dans ce domaine concernent principalement le développement et le transfert clinique de systèmes d'endoscopie de fluorescence dont un état de l'art est fourni dans notre article publié dans la revue *Traitement du Signal* [RN3] (en intégralité page 127) et dans les mémoires de thèse de R. Miranda-Luna [Th7] et Y. Hernandez-Mier [Th9].
- l'**identification** de l'appartenance d'une zone localisée de tissu ($\approx mm^2$) à une classe histologique définie : “cette lésion est bénigne ou maligne, il s'agit d'un tissu sain, inflammatoire, hyperplasique, dysplasique . . .”. Depuis une vingtaine d'année, les travaux dans ce domaine concernent le développement et l'évaluation de l'efficacité de méthodes de spectroscopie ponctuelle fibrée (*point to point spectroscopy*) dont un état de l'art est disponible dans notre article publié dans la revue *Traitement du Signal* [RN3] et dans le mémoire de thèse d'E. Pery [Th8].
- la **caractérisation** optique tissulaire (biopsie optique¹) : “à cet endroit, le tissu possède une couche de tel type cellulaire de telle épaisseur, une concentration de tel chromophore ou fluorophore à telle profondeur. . .”. Ces travaux concernent les développements récents d'une part, de systèmes d'imagerie microscopique de fluorescence confocale fibrée et d'autre part, de systèmes de spectroscopie fibrée couplés à des méthodes de modélisation des interactions lumière - tissus adaptées, dont un état de l'art est également donné dans le mémoire de thèse d'E. Pery [Th8].

I.2 Positionnement et objectifs du projet de recherche

I.2.1 Objectifs du projet de recherche

Pilotés par la finalité médicale, nos travaux de recherche s'appliquent en priorité à la localisation et à l'identification *in vivo* des tissus pathologiques (états pré-cancéreux et cancéreux précoces en particulier) caractérisés notamment par des modifications de leurs propriétés photophysiques. Ils s'inscrivent dans une **démarche interdisciplinaire** dont l'objectif général est de **développer et appliquer des concepts, des méthodes, des moyens et des outils** pour la localisation et la **caractérisation de tissus biologiques** par des méthodes atraumatiques de **spectro-imagerie optique *in vivo***.

Notre stratégie, présentée dans les objectifs du contrat 2008-2011 du CRAN, est de développer en particulier une approche :

- “**multi-dimensionnelle**”, en menant parallèlement des travaux de recherche sur la représentation panoramique et la localisation macroscopique en imagerie cystoscopique (cf. A.II.2.2.2 Action 1, page 17) et sur l'identification et la caractérisation tissulaire en spectroscopie fibrée (cf. A.II.2.2.2 Actions 2 et 3, pages 19 et 21)
- et “**multi-modale**”, en associant la fluorescence à l'imagerie endoscopique en lumière blanche (cf. A.II.2.2.2.1 Action 1, page 17), en explorant l'application *in vivo* de méthodes dynamiques telles que la spectro-imagerie de gap-FRAP (cf. A.II.2.2.2.2 Action 2, page

1. Bien que le mot “biopsie” fasse référence au prélèvement mécanique (invasif) d'un échantillon tissulaire, il s'agit d'une expression largement utilisée pour définir l'application des méthodes optiques (non invasives) menant à une “histologie *in vivo*”.

19), et enfin, en couplant les spectroscopies d'autofluorescence et de diffusion élastique voire inélastique (cf. A.II.2.2.2.3 Action 3, page 21).

I.2.2 Problématiques scientifiques et verrous à lever

Les problématiques scientifiques à résoudre concernent :

L'instrumentation et l'acquisition des signaux :

Pour pouvoir exploiter *in vivo* la fluorescence intrinsèque/extrinsèque, l'absorption et la diffusion multiple de la lumière dans les tissus tout en tenant compte des contraintes d'utilisation/d'application en clinique (endoscopie), il est nécessaire de développer des techniques et des méthodes de mesures physiques spécifiquement adaptées.

En endoscopie multi-bandes, les verrous à lever sont notamment la visualisation en temps réel et simultanée des séquences d'images acquises en lumière blanche et en fluorescence, la réalisation d'un système instrumental de dimension compatible avec une utilisation en clinique, ou encore l'optimisation de la puissance d'excitation lumineuse délivrée au tissu pour l'imagerie d'autofluorescence compte tenu de la sensibilité du système d'acquisition d'images, de la résolution et du RSB recherchés.

En spectroscopies fibrées, les verrous techniques et méthodologiques concernent l'acquisition en un temps très court (idéalement moins d'une seconde pour un point de mesure sur le tissu) de grandes quantités de spectres d'intensité rétro-diffusée (plusieurs fibres optiques de mesures en résolution spatiale, plusieurs excitations de fluorescence...), le couplage de plusieurs modes d'excitation en autofluorescence et diffusion sur un même outils, l'établissement et la validation de procédures de calibrage simples et fiables, ou encore le transfert en clinique de la méthode compte tenu des caractéristiques techniques et métrologiques des systèmes d'excitation et d'acquisition, des résolutions (spatiales et spectrales) et du RSB recherchés.

Le traitement des signaux multi-dimensionnels :

- Traitement d'images endoscopiques : pour la construction "temps réel" d'images panoramiques de vessie, les verrous à lever concernent notamment le développement et la validation de méthodes de recalage et de mosaïquage automatiques suffisamment rapides et robustes, l'évaluation qualitative et quantitative de leur performance en terme de précision, la faisabilité de superposer les modalités d'acquisition en lumière blanche et en fluorescence, ainsi que la représentation 2D/3D du volume vésical.
- Traitement des signaux spectroscopiques multi-dimensionnels (dimensions spectrale, spatiale et temporelle) : la première difficulté est la recherche et la validation de méthodes totalement automatiques de pré-traitement des spectres (filtrage, débruitage, normalisation) permettant d'obtenir des signaux exploitables en valeurs relatives mais surtout absolues. Ensuite les principaux verrous concernent la mise au point de méthodes d'extraction/sélection de caractéristiques spectrales et de classification (supervisée et non-supervisée, modèles linéaires et non-linéaires), le développement de méthodes d'identification de paramètres optiques des tissus à partir des mesures globales de surface (problème inverse) nécessitant la mise en œuvre de méthodes de modélisation des interactions lumière – tissus appropriées (simulations en fluorescence et diffusion), et enfin l'adaptation de ces méthodes à l'identification de paramètres discriminants (et interprétables du point de vue biologique) pour le diagnostic *in vivo* sur l'humain.

la mise en oeuvre complémentaire des méthodes et leur validation expérimentale :

La validation expérimentale des différentes méthodes développées (spectroscopie et image-

rie) nécessite l'emploi de modèles pré-cliniques adaptés. Les principaux verrous concernent d'une part, l'utilisation de modèles animaux et tumoraux compatibles avec cette validation en termes de complexité d'obtention des modèles (coût, temps, manipulations, expérience) et d'étiologie tumorale et d'autre part, le transfert clinique de ces méthodes.

Chapitre II

Imagerie endoscopique panoramique multispectrale : détection, localisation et représentation spatiales

Ce chapitre présente les solutions développées et les résultats obtenus dans le cadre des thèses de Rosebet Miranda-Luna (2000-2005) et de Yahir Hernandez-Mier (2003-2007) dont j'ai assuré, de 2003 à 2007, le co-encadrement et la co-direction respectivement.

Production scientifique du projet (2003-2008) :

- 2 RI [RI11, RI17], en intégralité pages 163 et 179
- 1 RN [RN3], en intégralité page 127
- 5 CI [CI16, CI19, CI12, CI17] et [CI13] en intégralité page 149
- 2 CN [CN5, CN9]

II.1 Motivations, positionnement et originalités de l'approche

Pour plus de détails, se référer aux parties I des articles [RI11, RI17, RN3], et celles des mémoires de thèses [Th7] et [Th9].

L'endoscopie classique (en lumière blanche) est l'examen exploratoire de référence pour rechercher la présence de lésions macroscopiques ou autres anomalies tissulaires visibles sur la paroi interne d'un organe creux. Elle permet également de réaliser des résections ou des biopsies tissulaires.

Dans le cadre de notre collaboration étroite avec les cliniciens du CAV, l'organe creux visé est la vessie et nous nous intéressons donc plus particulièrement à l'exploitation de la **cystoscopie** pour la détection et la localisation de lésions cancéreuses urothéliales.

Comme rappelé en partie I de [Th9], les tumeurs vésicales superficielles posent des problèmes importants de récurrence et de progression. Une grande partie des dysplasies et des CIS² peuvent rapidement progresser et devenir des tumeurs invasives en envahissant la couche musculaire. Pour les CIS, ce risque de progression varie fortement suivant le nombre et la taille des foyers tumoraux.

De ce fait, une **détection précoce** et une **caractérisation spatiale** précise des lésions tumorales dans la vessie sont capitales pour pouvoir individualiser et potentialiser les thérapies,

2. Les Carcinomes *In Situ* (CIS) de la vessie sont des tumeurs planes non invasives c'est-à-dire limitées à l'épithélium sans invasion du tissu conjonctif au travers de la membrane basale

ainsi que pour effectuer un suivi efficace aidant à limiter les récurrences après traitement.

La difficulté est donc, au cours de l'examen cystoscopique (qui permet au clinicien d'ausculter la vessie dans sa totalité mais avec un **champ de vue limité**), à la fois de **détecter** et de **localiser** ces lésions pour pouvoir évaluer de façon effective leur taille et leur distribution spatiale (positions relatives) dans le volume vésical.

Pour résoudre ce problème, l'originalité de **notre approche** consiste à chercher d'une part à réaliser des **images panoramiques** des surfaces vésicales de façon automatique au cours de l'examen cystoscopique par mosaïquage d'images des séquences vidéo classiques et d'autre part, à superposer des **informations spectrales co-localisées** spatialement sur ces images panoramiques et liées au contraste exploitable entre les intensités de fluorescence émis par les tissus sains et tumoraux.

Objectifs des travaux :

- Améliorer la qualité de l'identification diagnostique *in vivo* par voie endoscopique (approche multi-modalités, visualisation simultanée et en temps réel d'images endoscopiques en lumière blanche et d'images de fluorescence superposables spatialement)
- Optimiser l'efficacité de la localisation *in situ* (résolution spatiale avec information spectrale, recalage d'images et création d'images panoramique 2D, visualisation/reconstruction 3D)
- Transférer la technique pour des essais en clinique

Verrous à lever :

- Aspects métrologiques et technologiques : instrumentation utilisable en conditions cliniques (calibrage automatique, commutations des sources et vitesse d'acquisition vidéo, sensibilité pour l'acquisition d'images d'autofluorescence)
- Méthodes de traitement d'images : robustesse et temps de construction d'images panoramiques tenant compte des contraintes réelles (type d'images, durée d'un examen)
- Validations expérimentales : quantitatives (fantômes réalistes, mesure d'erreurs de mosaïquage) et qualitatives (séquences réelles), superposition des images panoramiques en fluorescence et en lumière blanche

II.2 Représentation panoramique automatique : recalage et mosaïquage d'images

II.2.1 Situation du problème

Habituellement, au cours de l'examen cystoscopique, le praticien enregistre une ou plusieurs séquences vidéo et imprime quelques clichés (images de petites zones d'intérêt). Le support photographique, simple à utiliser et à manipuler, permet de conserver une représentation précise de la zone d'intérêt, d'effectuer des comparaisons dans le temps et de disposer d'un document objectif médico-légal [42].

Lors de cet examen, le médecin relève le nombre, le siège et l'aspect des sites suspects ou des lésions observées dont il note la localisation et celle des biopsies effectuées en les re-dessinant sur un croquis à main levée de l'organe, en l'occurrence deux hémisphères "projetés" à plat sur lesquels sont également repérés les trois orifices de la vessie et la position de la bulle d'air³. Par ailleurs, le champ de vision limité du cystoscope (de l'ordre du cm^2) ne permet pas d'estimer facilement l'extension d'une lésion cancéreuse ni la distribution spatiale des éventuelles lésions

3. La vessie étant remplie de sérum physiologique pour les besoins de l'exploration, la bulle d'air qui se forme en haut du volume constitue un repère physique d'orientation spatiale pour le clinicien.

multi-focales. La localisation des lésions sur un croquis réalisé par le clinicien est hautement dépendante de son expérience.

Pour autant, ces supports papiers constituent les principaux éléments de référence pour le compte-rendu opératoire et dans le cas d'examen répétés pour un même patient (suivi de l'évolution de la maladie et/ou du traitement). Le support vidéo (des séquences de plusieurs minutes) est peu exploité en post-opératoire car il reste coûteux (nécessité de stocker un très grand volume d'information, besoin de moyens de visualisation...) et implique surtout une recherche fastidieuse pour trouver chaque séquence ou image d'intérêt.

La nécessité d'un support plus adapté pour localiser, évaluer et comparer des zones suspectes ainsi que pour préparer et guider des examens postérieurs a été exprimée **par les urologues**. Du point de vue du diagnostic, le fait de pouvoir observer de façon globale une zone d'intérêt doit permettre de **mieux localiser** des petites lésions satellites (multi-focales) potentiellement à l'origine de récives.

Une représentation globale permettant ce genre d'observation peut être obtenue en utilisant le **mosaïquage d'images**. En recalant les images successives qui composent les séquences vidéo acquises lors du déplacement de l'endoscope dans la vessie, il est possible de construire des images panoramiques offrant un champ de vision étendu de zones entières de la vessie ce, de façon quasi-automatique. Cette approche permet en outre un gain de temps et d'efficacité substantiels, ainsi qu'une réduction drastique des besoins de volumes de stockage (élimination des données redondantes).

II.2.2 Applications du mosaïquage et objectifs des travaux

Plusieurs états de l'art complets peuvent être trouvés dans les thèses et articles [Th7, Th9] et [RI11, RI17] (en intégralité pages 163 et 179).

Le mosaïquage d'images est le processus par lequel une image panoramique d'une scène est construite en superposant des vues partielles de cette dernière. Le mosaïquage repose sur un processus de **recalage d'images** pour déterminer les transformations géométriques $T_{i,i+1}$ entre des paires d'images I_i et I_{i+1} , prises successivement à des points de vue différents. Ces transformations locales sont utilisées pour calculer une transformation globale T_{i+1} , permettant de placer la dernière image transformée I_{i+1} (comme les précédentes) dans un repère commun de coordonnées (par exemple celui de la première image).

Le mosaïquage d'images est actuellement utilisé dans un grand nombre d'applications telles que la photographie grand public [18, 11, 106], la stabilisation vidéo des caméras mobiles [64, 73], la construction d'environnements virtuels [108, 109, 34], l'exploration sous-marine [101, 50] ou la construction d'images super-résolues [128, 22, 21].

Dans le domaine médical, quelques travaux sont menés sur l'agrandissement du champ de vision en imagerie ultrasonographique, en recalant les images acquises au cours de déplacements manuels [44]. Les auteurs réalisent un recalage d'image en utilisant l'Information Mutuelle (IM) comme mesure de similarité et une transformation perspective à 8 degrés de liberté. Malgré des images très bruitées, aucun pré-traitement n'est mis en oeuvre. En radiologie conventionnelle, Yaniv and Joskowicz [120] construisent des images panoramiques d'os longs à partir de plusieurs radiographies. Pour le recalage, ils considèrent que les transformations entre les images se limitent à des déplacements parallèles à l'axe de projection (pas de rotations) effectués au moyen d'un alignement manuel et d'une règle graduée. Mais, la principale application du mosaïquage d'images dans le domaine médical concerne l'ophtalmologie où la construction d'images panoramiques permet un diagnostic plus facile et plus efficace. Les méthodes de recalage développées utilisent, en général, des mesures de similarité basées sur la comparaison des niveaux de gris des pixels dans

les images et des modèles de transformation jusqu'à 6 degrés de liberté (affine). Par exemple, Zhou *et al.* [125, 126] effectuent le mosaïquage d'angiogrammes rétiniens successifs en utilisant un algorithme de recalage par composition inverse modifiée [7, 8, 9]. D'autres approches moins robustes, comme celle de Can *et al.* [20], cherchent à exploiter des primitives images telles que les points d'intersection après segmentation des vaisseaux sanguins de la rétine pour effectuer le recalage des images. Ils utilisent un modèle de transformation à 12 degrés de liberté (non linéaire) pour représenter la déformation entre les images et la courbure de la rétine.

Le processus générique de recalage d'images successives I_i et I_{i+1} d'une séquence vidéo cystoscopique vise à superposer au mieux les parties communes de ces images et peut être décrit mathématiquement par l'équation II.1. Le principe consiste à maximiser une mesure de similarité entre les caractéristiques extraites de l'image cible (target) $I^t = I_i$ et celles homologues de l'image source $I^s = I_{i+1}$ à laquelle une transformation géométrique $T_{i,i+1}$ est appliquée (\circ). f^t et f^s désignent les algorithmes d'extraction de caractéristiques (coins, lignes, courbes...) appliqués à ces images respectivement. Les valeurs des paramètres de transformation $T_{i,i+1}$ sont obtenues dans un espace de recherche \mathbf{T} au moyen d'un algorithme d'optimisation *opt* pour finalement trouver la transformation optimale $\tilde{T}_{i,i+1}$ lorsque $f^t(I_i) \approx f^s(I_{i+1} \circ T_{i,i+1})$ (images recalées).

$$\tilde{T}_{i,i+1} = \arg \underset{T_{i,i+1} \in \mathbf{T}}{\text{opt}} S\{f^t(I_i), f^s(I_{i+1} \circ T_{i,i+1})\} \quad (\text{II.1})$$

Le type de transformation T , la mesure de similarité S , les algorithmes d'extraction de caractéristiques f^t et f^s , et la méthode d'optimisation *opt* doivent être déterminés en tenant compte des contraintes de l'application et notamment le type de capteur, la modalité d'acquisition d'images, la fonction de transfert de l'instrument ou le temps de calcul et la précision du recalage souhaités.

Les objectifs des travaux de traitement d'images menés dans le cadre des thèses soutenues de R. Miranda (2000-2005) et de Y. Hernandez (2003-2007) étaient donc :

- d'analyser les caractéristiques des images cystoscopiques pour définir le type de prétraitement à réaliser et la nature des primitives images à utiliser ou à extraire pour le recalage.
- de développer des outils et méthodes de recalage et de mosaïquage automatiques suffisamment précis, robustes et rapides pour pouvoir tenir compte des contraintes réelles (variabilité intra- et inter-individuelle, durée de l'examen clinique)
- valider la mise en oeuvre des solutions développées par une évaluation qualitative et surtout quantitative des performances et de la qualité des résultats obtenus

II.2.3 Travaux réalisés et résultats obtenus

II.2.3.1 Méthode de recalage d'images utilisant l'information mutuelle

Durant la période 2000–2005 (thèse de R. Miranda), un premier algorithme robuste de recalage et de mosaïquage automatique a été développé [Th7]. Cette méthode comprend à la fois l'algorithme de recalage des paires d'images consécutives d'une séquence et la résolution de problèmes spécifiques liés aux images endoscopiques (correction des distortions radiales, du shading, et filtrage du pattern de fibres optiques visible dans le cas des fibroscopes).

II.2.3.1.1 Algorithme de recalage développé

Comme rappelé entre autre dans les thèses [Th7, Th9] et articles [RI11, RI17], les principales "non-linéarités" du système sont dues aux distortions radiales provoquées par l'optique des endoscopes. Après étalonnage, celles-ci peuvent être corrigées au cours d'une phase de pré-traitement

des images. Par ailleurs, la surface de vessie visualisée peut être considérée comme rigide entre 2 images consécutives. Ainsi, la fonction de transfert du système d'acquisition cystoscopique projetant un point réel 3D sur un plan image 2D peut être représentée par un modèle de projection linéaire. Le modèle de transformation linéaire T le plus complet est le modèle perspective décrit par une matrice M 3×3 telle que, en coordonnées homogènes :

$$\begin{bmatrix} x' \\ y' \\ 1 \end{bmatrix} w = [M] \begin{bmatrix} x \\ y \\ 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \underbrace{k_x \cos \phi}_{m_1} & \underbrace{-S_x \sin \phi}_{m_2} & \underbrace{t_x}_{m_3} \\ \underbrace{S_y \sin \phi}_{m_4} & \underbrace{k_y \cos \phi}_{m_5} & \underbrace{t_y}_{m_6} \\ m_7 & m_8 & m_9 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \\ 1 \end{bmatrix}$$

où $\mathbf{x} = [x, y]^T$ et $\mathbf{x}' = [x', y']^T$ sont les points correspondants dans les images I_i et I_{i+1} respectivement, m_1, m_5, m_2 et m_4 sont des paramètres adimensionnels contenant les facteurs d'échelle (k_x, k_y) et de cisaillement (shearing) (S_x, S_y) ainsi que l'angle de rotation ϕ dans le plan, t_x et t_y sont les paramètres de translation (en pixels), m_7, m_8, m_9 sont les paramètres adimensionnels prenant en compte les effets de perspective et w est le facteur de perspective lié à l'écriture matricielle en coordonnées homogènes.

L'équation II.1 peut alors s'écrire :

$$\tilde{T}_{i,i+1} = \arg \underset{T_{i,i+1} \in \mathbf{T}}{\text{opt}} \{f^t(I_i(\mathbf{x})), f^s(I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)))\} \quad (\text{II.2})$$

où $I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M))$ désigne l'image I_{i+1} après application de la transformation $T_{i,i+1}$ à l'aide de la matrice des paramètres de transformation M .

Comme également mentionné dans [Th7, RI11] il n'est pas toujours possible, dans les images cystoscopiques, d'extraire des points caractéristiques ou de segmenter des régions ou des contours de façon suffisamment robuste compte tenu de la grande variabilité intra- et inter-patient des textures, des éléments anatomiques ou des artefacts présents dans les images, dont plusieurs exemples sont donnés dans [Th9, RI17]. En conséquence, par souci de robustesse, nous avons choisi d'éviter l'emploi d'algorithmes de segmentation (f_t et f_s dans II.1) et de privilégier l'emploi de mesures de similarité calculées à partir des valeurs de niveaux de gris des pixels des images. Ce choix s'est confirmé par les résultats peu exploitables obtenus en testant l'application du détecteur de coins de Harris à des séquences d'images cystoscopiques réelles (les détails dans [Th9]). L'approche développée dans le cadre de la thèse de R. Miranda a été de considérer une mesure de similarité basée sur l'expression d'une dépendance statistique des niveaux de gris des pixels homologues entre les images à recalcer $I_i(\mathbf{x})$ et $I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M))$, en l'occurrence **l'Information Mutuelle** (IM) [54, 113, 95]. Robuste et flexible, cette mesure (équation II.3) est calculée à l'aide des entropies $H(z)$ des niveaux de gris $z(I_i(\mathbf{x}))$ et $z(I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)))$ des images à recalcer, et de leur entropie jointe $H(z(I_i(\mathbf{x})), z(I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M))))$ comme suit⁴ :

$$IM(I_i, I_{i+1}^T) = H(z(I_i)) + H(z(I_{i+1}^T)) - H(z(I_i), z(I_{i+1}^T)) \quad (\text{II.3})$$

4. par souci de lisibilité, on utilise ici les notations simplifiées $I_i = I_i(\mathbf{x})$ et $I_{i+1}^T = I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M))$

avec

$$\left\{ \begin{array}{l} H(z(I_i)) = - \sum_{z(I_i)} p(z(I_i)) \ln(p(z(I_i))) \\ H(z(I_{i+1}^T)) = - \sum_{z(I_{i+1}^T)} p(z(I_{i+1}^T)) \ln(p(z(I_{i+1}^T))) \\ H(z(I_i), z(I_{i+1}^T)) = - \sum_{z(I_i)} \sum_{z(I_{i+1}^T)} p(z(I_i), z(I_{i+1}^T)) \ln(p(z(I_i), z(I_{i+1}^T))) \end{array} \right.$$

où $p(z(I_i)) = p(z(I_i(x)))$ et $p(z(I_{i+1}^T)) = p(z(I_{i+1}(T_{i,i+1}(x; M))))$ sont les densités de probabilité des niveaux de gris des parties superposées des images recalées et $p(z(I_i), z(I_{i+1}^T)) = p(z(I_i(x), z(I_{i+1}(T_{i,i+1}(x; M))))$ la densité de probabilité jointe.

Afin de rechercher les valeurs optimales des paramètres de transformation recalant au mieux chaque paire d'images, c'est-à-dire maximisant l'IM entre elles, nous avons choisi de mettre en œuvre une méthode d'optimisation robuste (résistante aux minima locaux) de type **gradient descendant stochastique**. Dans un souci prioritaire d'efficacité et de précision de convergence, le calcul des dérivées premières de l'IM i.e. des entropies est effectué à partir de l'expression analytique des fonctions de densité de probabilités correspondantes. L'estimation non-paramétrique de ces dernières à partir des histogrammes réels des images a été réalisée au moyen d'un **fenêtrage de Parzen** (par tirages aléatoires dans les zones communes des images) permettant de prendre en compte leur nature multimodale de façon précise (somme de 260 fonctions gaussiennes) [Th7, RI11].

Au final, les transformations optimales locales $\tilde{T}_{i,i+1}$ obtenues pour chacune des paires d'images recalées I_i et I_{i+1} sont utilisées pour calculer les transformations globales successives \tilde{T}_{i+1} , telles que :

$$\tilde{T}_{i+1} = \tilde{T}_{i,i+1} \times \tilde{T}_i = \prod_{j=0}^{i-1} \tilde{T}_{i-j,i-j+1} \quad (\text{II.4})$$

avec $i \in [1; n-1]$ et n le nombre d'images dans la séquence.

Cette approche séquentielle simple de mosaïquage des images dans un système de coordonnées global implique que les erreurs de recalage par paire d'images soient minimales. Après application de la méthode développée sur des séquences vidéo acquises au cours d'un parcours en boucle du cystoscope sur une photographie de vessie de porc (cf. paragraphe suivant), les premiers résultats ont montré que l'accumulation des petites erreurs de recalage (≈ 1 pixel) entre chaque paire d'images conduisait à une erreur cumulée trop importante. Nous avons donc proposé et mis en œuvre [Th7, RI11] une méthode originale d'**ajustement global et simultané** des paramètres des matrices de transformations locales en cherchant à minimiser (cf. équation II.5) la somme des écarts quadratiques d'une part, entre les valeurs des paramètres de la transformation globale \tilde{T}_n et celles de la dernière transformation locale de la boucle $\tilde{T}_{n-1,n}$ et d'autre part, entre les valeurs des paramètres des transformations locales initialement trouvées $\tilde{T}_{i,i+1}$ et les nouvelles valeurs de ces paramètres obtenues après ajustement $T_{i,i+1}^{adj}$.

$$\arg \min_{T_{i,i+1}^{adj}} \left\{ f^t \left(\tilde{T}_n - \tilde{T}_{n-1,n} \right)^2 + \sum_{i=1}^{n-2} \left(T_{i,i+1}^{adj} - \tilde{T}_{i,i+1} \right)^2 \right\} \quad (\text{II.5})$$

II.2.3.1.2 Evaluation quantitative et qualitative

Peu de travaux sont décrits dans la littérature dans ce domaine. L'évaluation **quantitative** de la précision du mosaïquage peut s'effectuer si l'on parvient à quantifier précisément les écarts de position existants entre les pixels d'une image panoramique construite et ceux homologues de sa version entière correspondante "réelle", ce qui n'est pas possible à partir de séquences cystoscopiques sur patients.

Notre idée initiale [Th5] a donc consisté à construire une image de dimension supérieure au champ de vue du cystoscope et constituée par exemple d'un quadrillage de points de positions connues puis, de mesurer les distances entre ces positions et celles des points homologues dans une image panoramique construite. Or, l'évaluation de la précision du mosaïquage dans le cadre de notre application doit s'effectuer à partir du recalage (i.e. calcul de l'information mutuelle et des paramètres optimaux de transformation) d'images endoscopiques acquises impérativement sur vessie. Pour résoudre le problème, nous avons exploité deux séquences d'acquisitions, l'une sur une image fantôme de vessie et l'autre sur une image "mire" ce, en effectuant précisément le même parcours de déplacement de l'endoscope sur chaque image. Les paramètres de transformations obtenus au cours du recalage des images du fantôme sont ensuite appliqués aux images correspondantes de la séquence acquise sur la mire. Le fantôme plan est une photographie haute résolution de la paroi interne d'une vessie de porc mise à plat. Le protocole de déplacement et d'acquisition a été mis en oeuvre au moyen d'un système motorisé de positionnement micrométrique 5 axes (2 déplacements dans le plan du fantôme, 1 déplacement perpendiculaire au plan, 1 rotation dans le plan et 1 rotation hors plan).

Au final, une **erreur moyenne de mosaïquage** e_m est calculée comme la distance Euclidienne moyenne entre les coordonnées (x_m^j, y_m^j) de N_p centroïdes segmentés dans l'image panoramique construite et les coordonnées (x_r^j, y_r^j) des points de référence correspondants de la mire entière de départ.

$$e_m = \frac{1}{N_p} \sum_{j=1}^{N_p} \sqrt{(x_m^j - x_r^j)^2 + (y_m^j - y_r^j)^2}. \quad (\text{II.6})$$

Suite à l'acquisition de différentes séries de 50 à 60 images le long de trajectoires bouclées impliquant des translations dans le plan ainsi que des changements de facteur d'échelle et de perspective, nous avons obtenu des erreurs moyennes de mosaïquage de 43.1 et 3.3 pixels respectivement sans puis avec correction de boucle [CI12, CI17].

Pour une évaluation **qualitative**, les cliniciens ont analysé et validé la cohérence visuelle d'images panoramiques construites à partir de 2 séquences cystoscopiques de 2 patients. La méthode de correction de boucle a été appliquée aux paramètres des transformations des suites d'images appartenant à des trajectoires bouclées dans la séquence acquise. Programmé en langage C, l'algorithme développé nécessite environ 80 secondes pour le recalage d'une paire d'images (250 itérations) soient plusieurs heures de calcul pour la construction d'une image panoramique partielle de la vessie (plusieurs centaines d'images par séquence). Ce traitement, réalisé "off-line", permet donc de fournir au clinicien un support complémentaire exploitable pour un compte-rendu post-opératoire ou la comparaison avec les résultats d'un examen ultérieur sur un même patient.

II.2.3.2 Correction des distorsions et étalonnage

Les images endoscopiques sont par nature affectées de différents défauts géométriques et photométriques qui doivent être corrigés ou compensés pour parvenir à un recalage efficace. Les principaux effets observables sont : une distorsion radiale et un effet de vignettage dus à l'optique

grand angle utilisée dans les endoscopes (large champ de vision) et un motif des fibres optiques apparaissant sur les images obtenues avec un fibroscope.

II.2.3.2.1 Correction du vignettage et élimination du motif des fibres optiques

L'effet de vignettage correspond à une inhomogénéité d'illumination dans l'image (variations d'intensité de très faibles fréquences spatiales). Ces gradients peuvent être modélisés par des fonctions polynomiales [114] si les conditions d'illumination entre les images d'une même séquence ne changent pas, ce qui n'est pas le cas en cystoscopie. L'autre approche, implémentée par [61, 94] et par nous [CI12, CI13, RI17] est simplement d'appliquer un filtrage passe-haut pour éliminer les fréquences très basses du vignettage (inférieures à celles des informations utiles à notre recalage).

Dans le cas de l'utilisation d'un fibroscope, l'image de la vessie est conduite à la caméra au travers d'un faisceau de plusieurs centaines de fibres optiques possédant chacune un coeur et une gaine. L'image qui en résulte est affectée d'un motif ombré en nid d'abeilles du à la non-transmission de lumière par les gaines des fibres. Le motif ainsi formé représente une texture de fond de très haute fréquence spatiales dans l'image (supérieures à celles des informations utiles à notre recalage) qui peut être éliminé au moyen d'un filtrage passe-bas.

Pour ces filtrages, des masques gaussiens ont été mis en œuvre. Les valeurs des paramètres de ces masques ont été déterminées à partir des périodes et fréquences caractéristiques du vignettage et du motif des fibres visibles sur les images et leurs spectres de Fourier [Th7, Th9].

II.2.3.2.2 Compensation des distortions radiales et étalonnage automatique

Un grand nombre de travaux existe concernant le calibrage des endoscopes ou d'autres systèmes à forte distorsion radiale qui impliquent, soit l'emploi contraignant de mires de géométrie connue couplées à un système de positionnement précis de l'endoscope [4, 53, 104], soit la mise en œuvre plus délicate (robustesse, précision, automatisation) de méthodes de segmentation et de mise en correspondance de segments de droites déformées en courbes par la distorsion mais sans besoin d'un positionnement précis de l'endoscope [110, 2].

Afin de déterminer les paramètres de correction de distorsion radiale à appliquer à nos images cystoscopiques, nous avons établi une méthode de calibrage automatique précise et simple à mettre en œuvre en condition clinique. Son principe consiste à utiliser une image numérique de référence, imprimée puis acquise avec l'endoscope. L'image de référence et l'image déformée de celle-ci sont alors utilisées comme images cible et source respectivement dans notre algorithme de recalage. Les valeurs optimales des paramètres de transformation perspective et ceux du modèle non-linéaire de déformation radiale sont obtenues à l'issue du processus d'optimisation.

Nous avons testé les performances de cette méthode pour différents angles d'acquisition ($\pm 20^\circ$) entre le cystoscope et l'image cible imprimée et pour différents motifs (damier, cercles concentriques, image en niveaux de gris). Quelque soient l'angle et le motif, l'erreur moyenne de recalage calculée n'excède jamais quelques pixels, comparables aux erreurs obtenues par d'autres méthodes référencées [53, 104]. Ainsi, la méthode implémentée permet de déterminer automatiquement et rapidement les paramètres de distorsion radiale d'un endoscope en utilisant simplement l'impression d'une image contrastée quelconque et en maintenant l'endoscope à peu près perpendiculaire à cette image mais sans besoin de système de positionnement particulier [CI13, Th7].

II.2.3.3 Méthode de recalage d'images par composition inverse

II.2.3.3.1 Algorithme de recalage développé

Une seconde étude menée de 2004 à 2007 nous a permis de poursuivre ces travaux en évoluant

vers un algorithme de mosaïquage automatique rapide, c'est-à-dire compatible avec la durée de l'examen clinique, et suffisamment robuste [Th9]. Pour ce faire, nous avons cherché d'une part, à utiliser une mesure de similarité plus **rapide** à calculer mais toujours basée sur les niveaux de gris des images et d'autre part, à effectuer une **sélection dynamique** des images à recaler afin de limiter leur nombre et donc réduire d'autant le temps de calcul global.

L'analyse de la littérature montre que les méthodes de recalage basées sur l'utilisation des niveaux de gris et capables de travailler avec un modèle de transformation perspective sont toutes des méthodes itératives. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de développer une méthode originale combinant une approche non itérative capable de nous donner une première approximation de certains paramètres de transformation existant entre les images et un algorithme itératif affinant le recalage avec un modèle de transformation perspective [CI16].

En terme d'approche non itérative pour recaler deux images, nous avons cherché à exploiter des techniques de **corrélation de phase** basées sur la Transformée de Fourier (TF). La corrélation de phase permet d'estimer simplement les translations dans le plan entre deux images avec une excellente immunité aux variations d'illumination ou aux ombres mobiles (fonction de corrélation normalisée en amplitude). Afin de déterminer non seulement les paramètres de translations dans le plan entre ces deux images mais aussi l'angle de rotation dans le plan et le facteur d'échelle (paramètres d'une transformation de *similitude*), il est possible d'étendre la technique de corrélation de phase en utilisant la **Transformée de Fourier-Mellin** (TFM) au lieu de la TF. La TFM permet en effet d'analyser ces paramètres en exploitant les propriétés d'invariance par rotation et de déphasage par translation de la transformée de Fourier des images et sa représentation dans un repère en coordonnées logarithmiques-polaires [CN5, Th9].

L'évaluation **quantitative** des performances de cette méthode réalisée sur des séquences d'images d'un fantôme (photographie de vessie de porc) dont les transformations étaient parfaitement connues a permis d'obtenir de très bons résultats avec des erreurs moyennes faibles pour les paramètres trouvés en translation (± 3 pixels), en rotation ($\pm 0,8^\circ$) et en facteur d'échelle ($\pm 0,05$). Par contre, les essais effectués sur des séquences d'images de cystoscopies cliniques ont mis en évidence la présence de nombreux pics dans la fonction de corrélation de phase (ce, malgré l'emploi de filtres d'apodisation spatiale) empêchant l'extraction du pic de corrélation correct déterminant les valeurs de rotation et de facteur d'échelle. Un des problèmes de cette approche est que les images cystoscopiques sont déformées en réalité par des transformations plus complexes (changements de perspective) qu'une similitude. Des similitudes ont été testées car les changements de perspective sont en moyenne très faibles entre deux images consécutives et ce même pour un examen réel. Cependant lors de changements de trajectoires du cystoscope, les changements de perspective deviennent trop importants et le recalage échoue avec une similitude.

Bien que l'approche utilisant la TFM ne puisse pas être retenue pour notre application, ces travaux nous ont permis de confirmer que la corrélation de phase constitue une technique simple, rapide et suffisamment robuste dans le cas des images cystoscopiques réelles pour obtenir des valeurs de translation proches de la solution. Notre idée originale est donc d'utiliser ces valeurs de translations dans le plan pour **initialiser** un processus subséquent de **recalage** itératif de l'ensemble des paramètres de la transformation projective. Cela doit mener à réduire considérablement le nombre d'itérations d'un algorithme d'optimisation qui trouve précisément la solution.

Inspirés par les méthodes de flot optique, de suivi d'objets ou de mosaïquage d'angiogrammes [83, 9, 126, 125], nous avons choisi une méthode de recalage basée sur l'algorithme de **Lucas & Kanade** ($L \& K$) [68] qui utilise, comme mesure de similarité S , la somme des différences au

carré SSD entre les niveaux de gris des images source et cible telle que :

$$\begin{aligned} SSD &= \sum_{\mathbf{x} \in I_i \cap I_{i+1}} [I_{i+1}(\mathbf{x}) \circ (T_{i,i+1}(M)) - I_i(\mathbf{x})]^2 \\ &= \sum_{\mathbf{x} \in I_i \cap I_{i+1}} [I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)) - I_i(\mathbf{x})]^2 \end{aligned} \quad (\text{II.7})$$

où $I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M))$ est l'image source I_{i+1} transformée par $T_{i,i+1}$ avec la matrice des paramètres M . SSD est calculée pour les pixels de coordonnées \mathbf{x} communes aux deux images cible I_i et source I_{i+1} .

A partir d'une estimation initiale connue des valeurs des paramètres de la matrice M , l'algorithme de $L \mathcal{E} K$ consiste à chercher les incréments ΔM pour minimiser :

$$SSD = \sum_{\mathbf{x} \in I_i \cap I_{i+1}} [I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M + \Delta M)) - I_i(\mathbf{x})]^2 \quad (\text{II.8})$$

La mise à jour itérative $M \leftarrow M + \Delta M$ est telle que :

$$T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M) \leftarrow T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M + \Delta M) \approx T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M) + \frac{\partial T_{i,i+1}}{\partial M} \Delta M \quad (\text{II.9})$$

Les valeurs d'incrément ΔM sont obtenus à l'aide d'une méthode d'optimisation du second ordre (Gauss-Newton). Ce problème de minimisation de moindres carrés passe par le calcul de la dérivée première de SSD (équation II.8) après développement en série de Taylor de $I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M + \Delta M))$ par rapport à ΔM . Ceci implique de calculer, à chaque itération, le Jacobien $J_T(M)$ (dérivée première des coordonnées transformées des pixels en (x, y) par rapport à chaque paramètre de transformation), le Gradient en niveaux de gris $\nabla I_{i+1}(\mathbf{x})$ et la matrice des dérivées secondes H_{i+1} (le Hessian) de l'image source $I_{i+1}(\mathbf{x})$, définis comme :

$$\left\{ \begin{array}{l} J_T(M) = \frac{\partial T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)}{\partial M} = \begin{pmatrix} \frac{\partial T_{i,i+1}(x; M)}{\partial m_1} & \dots & \frac{\partial T_{i,i+1}(x; M)}{\partial m_9} \\ \frac{\partial T_{i,i+1}(y; M)}{\partial m_1} & \dots & \frac{\partial T_{i,i+1}(y; M)}{\partial m_9} \end{pmatrix} \\ \nabla I_{i+1}(\mathbf{x}) = \left(\frac{\partial I_{i+1}(x, y)}{\partial x}, \frac{\partial I_{i+1}(x, y)}{\partial y} \right) \\ H_{i+1} = \sum_{\mathbf{x} \in I_i \cap I_{i+1}} \left[\nabla I_{i+1}(\mathbf{x}) \frac{\partial T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)}{\partial M} \right]^T \left[\nabla I_{i+1}(\mathbf{x}) \frac{\partial T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)}{\partial M} \right] \end{array} \right. \quad (\text{II.10})$$

Lorsque les images à recalculer sont relativement similaires, ce qui est le cas dans notre application (images successives d'une séquence), le calcul du gradient de l'image **source** peut être avantageusement remplacé par celui de l'image **cible**. L'algorithme de composition inverse ainsi développé dans [8] minimise l'expression suivante par rapport à ΔM :

$$SSD = \sum_{\mathbf{x} \in I_i \cap I_{i+1}} [I_i(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; \Delta M)) - I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M))]^2 \quad (\text{II.11})$$

avec la mise à jour itérative :

$$T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M) \leftarrow T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M) \circ T_{i,i+1}(\mathbf{x}; \Delta M)^{-1} \quad (\text{II.12})$$

Après développement (détails dans [Th9] et [RI17] en page 179), on aboutit finalement au calcul du Hessian H_i de l'image $I_i(\mathbf{x})$ tel que :

$$H_i = \sum_{\mathbf{x} \in I_i \cap I_{i+1}} \left[\nabla I_i(\mathbf{x}) \frac{\partial T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)}{\partial M} \right]^T \left[\nabla I_i(\mathbf{x}) \frac{\partial T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)}{\partial M} \right] \quad (\text{II.13})$$

avec $\nabla I_i(x)$ le gradient de l'image I_i .

Ainsi, en inversant le rôle des images source et cible, le Gradient et le Hessien de I_i peuvent être calculés **une fois pour toute** au départ du processus d'optimisation, ce qui conduit à une réduction importante du temps de calcul global sans affecter la robustesse. L'algorithme de composition inverse ainsi développé peut être appliqué aux transformations homographiques i.e. perspectives.

II.2.3.3.2 Evaluation quantitative et qualitative

L'ensemble des résultats détaillés est donné dans [Th9, RI17, CI16, CN5, CI19, CN9]. Comme précédemment, l'évaluation **quantitative** de la précision de construction des images panoramiques à l'aide de l'algorithme de mosaïquage développé a été menée sur des séquences d'images acquises sur une photographie de vessie et sur un quadrillage de points alignés régulièrement espacés. L'acquisition de ces séquences a été réalisée en suivant un parcours prédéfini de déplacements contrôlés à l'aide du système de positionnement motorisé (2 rotations et 3 translations). Le parcours décrit comprend 4 combinaisons de déplacements impliquant les 5 axes : translations en \vec{x} (dans le plan) et en \vec{z} (facteur d'échelle), translation en \vec{y} et rotation dans le plan, translation en \vec{x} et rotation hors plan (effet perspective), et finalement la combinaison de translations en \vec{y} et \vec{z} et de rotations dans et hors plan simultanément. Un ensemble de 169 images a été acquis avec la première et la dernière de la séquence acquises à la même position. L'erreur moyenne de mosaïquage e_m définie par l'équation II.6 est obtenue à partir de l'extraction des positions des centroïdes de 31 points de l'image du quadrillage avant recalage (image complète) et après recalage (image panoramique construite). L'erreur moyenne de mosaïquage obtenue de 3.82 pixels représente environ 0.3% du plus petit côté de l'image panoramique construite (1947×1187 pixels). Ce très faible pourcentage d'erreur est obtenu sans besoin de recourir à une correction de boucle comme précédemment.

La validation **qualitative** des performances de notre algorithme de mosaïquage a été menée sur 10 séquences cystoscopiques d'intérêt (contenant des éléments exploitables par le clinicien pour orienter l'image panoramique et l'analyser plus précisément) provenant de 6 examens cliniques réels de patients. Le nombre d'images dans ces séquences varie de 150 (6 secondes) à 1300 images (52 secondes). Malgré les différences importantes des caractéristiques texturales et des conditions d'illumination, l'approche développée est suffisamment robuste pour construire des images panoramiques visuellement cohérentes qui ont permis aux cliniciens de les analyser et de les interpréter correctement. Pour recalculer une paire d'images, l'algorithme d'optimisation nécessite en moyenne 12 itérations soit une durée de recalage entre 1.2 et 1.5 secondes. Pour les séquences testées, le **temps de construction** total (recalage et collage) varie selon la nature des images et des mouvements dans les séquences, entre 5 et 13 minutes [Th9, RI17]. Ces temps de calcul permettent d'envisager la construction d'une image panoramique partielle de la vessie avant la fin de l'examen cystoscopique en particulier si l'on trouve le moyen de ne pas recalculer l'intégralité des images d'une séquence mais seulement celles séparées par des variations "significatives" des paramètres de transformation.

II.2.3.4 Caractérisation des paramètres de translation et sélection dynamique d'images

Comme mentionné précédemment, notre algorithme de recalage comprend une phase préliminaire de calcul de corrélation de phase entre chaque paire d'image permettant d'obtenir rapidement des valeurs de translations dans le plan pour mieux initialiser le processus d'optimisation du recalage et diminuer ainsi le nombre d'itérations. Or, l'approche développée nous a permis d'analyser, **pour la première fois** sur des séquences cystoscopiques réelles (3860 paires

d’images issues des 10 séquences), l’évolution des valeurs de ces translations dans le plan entre les paires d’images consécutivement recalées. Nous avons ainsi pu caractériser les distributions des valeurs absolues des translations en \vec{x} et \vec{y} avec des valeurs moyennes de 3.2 ± 3.3 et 4.0 ± 4.4 pixels respectivement et des valeurs maximales systématiquement inférieures à 50 pixels.

Compte tenu de la dimension des images et de ces valeurs maximales de translations, nous avons pu confirmer que le taux de superposition entre images adjacentes est toujours supérieur à 80%, ce qui favorise une meilleure efficacité de la méthode de recalage.

Par ailleurs, nous avons observé dans les séquences réelles enregistrées beaucoup de phases où le cystoscope bouge assez lentement voire reste pratiquement statique. Dans ces conditions, un temps important est perdu à recaler des images extrêmement proches. Nous avons donc proposé d’exploiter les estimations des translations fournies par l’étape de corrélation pour réaliser une **sélection dynamique** des paires d’images à recaler. A partir des distributions de valeurs identifiées pour les translations dans le plan, nous avons inséré une étape conditionnelle à notre algorithme de sorte que seules les images entre lesquelles les translations sont supérieures à 9 pixels soient finalement recalées (calcul itératif de tous les paramètres de transformation). Cette méthode originale de sélection dynamique et automatique des paires d’images à recaler nous a permis de diminuer d’un facteur **2 à 4** le temps global de construction d’une image panoramique complète (moins de 5 minutes) tout en conservant un résultat visuel de qualité similaire [RI17].

II.3 Endoscopie de fluorescence et imagerie panoramique bi-modale

II.3.1 Situation du problème et objectifs des travaux

Les examens cystoscopiques en lumière blanche permettent au clinicien de repérer des lésions cancéreuses au niveau macroscopique à un stade où elles ont généré des modifications tissulaires visibles à l’œil nu. Pour des lésions pré-cancéreuses ou cancéreuses précoces infra-cliniques, cette méthode de détection en lumière blanche n’est pas suffisamment sensible et spécifique. De nombreux travaux de recherche se concentrent actuellement sur l’exploitation de la fluorescence des tissus sous excitation UV (autofluorescence ou fluorescence induite) pour laquelle plusieurs dispositifs endoscopiques sont disponibles commercialement et utilisés en clinique.

Notre approche d’imagerie panoramique en cystoscopie trouve tout son intérêt applicatif dans l’idée de **combinaison** sur un support panoramique **unique**, les informations **spatiales** données par les images acquises en lumière blanche et les informations **“fonctionnelles”** issues des images acquises sous excitation UV.

Les matrices de transformation globales déterminées au cours du recalage / mosaïquage des images de la séquence acquise en lumière blanche peuvent ainsi être utilisées pour construire une seconde image panoramique avec les images de fluorescence, à condition de disposer des séquences d’images en lumière blanche et en fluorescence acquises simultanément (superposables). Or, les systèmes d’endoscopie de fluorescence existants fonctionnent sur un mode alternatif dans lequel le clinicien choisit de visualiser les images en lumière blanche ou en fluorescence en commutant la source. Le principe du système d’imagerie multi-bandes développé par notre groupe CRAN-BioMoCeTi repose sur la visualisation simultanée (en termes de perception visuelle pour le clinicien) des séquences endoscopiques en lumière blanche et en fluorescence (images de même dimension et résolution). Il consiste à effectuer l’acquisition **séquentielle automatique** d’une image en lumière blanche et d’une ou plusieurs images en fluorescence au rythme de l’acquisition vidéo afin de visualiser et d’enregistrer en temps réel les deux séquences acquises quasiment simultanément dans les **deux modalités** [RN3].

Les objectifs des travaux liés à l'instrumentation en endoscopie de fluorescence et menés dans le cadre des thèses soutenues de R. Miranda et de Y. Hernandez étaient donc de :

- développer un système permettant la visualisation simultanée et en temps réel des images endoscopiques en lumière blanche et d'images de fluorescence superposables spatialement
- valider la construction d'images panoramiques bi-modales (lumière blanche et fluorescence) à l'aide de l'instrumentation et des algorithmes de mosaïquage développés

II.3.2 Travaux réalisés et résultats obtenus

Un **premier prototype** de qualification permettant l'acquisition d'images dans 3 bandes spectrales différentes a été développé et a permis de tester la faisabilité d'une visualisation simultanée et superposable des images en lumière blanche et en fluorescence. La partie source du prototype comporte deux lampes Xénon dont l'une est filtrée dans le bleu-violet et l'autre est placée derrière un shutter activé au rythme de l'acquisition vidéo. La partie acquisition est constituée d'une caméra couleur et d'une caméra CCD intensifiée recevant les images de fluorescence formées successivement dans 1, 2 ou 3 bandes spectrales différentes au moyen d'un ensemble de miroirs mobiles formant des chemins optiques différents. Sa validation métrologique (calibrages, sensibilité) a été réalisée sur fantômes synthétiques (mires, photographies de vessie) [RI11, RN3, CI13, CI17]. A l'aide de fantômes synthétiques fluorescents, nous avons également validé la **faisabilité de la superposition spatiale** sur une image panoramique construite en lumière blanche, d'informations de fluorescence co-localisées spatialement.

Une **nouvelle version** de dimension plus petite de la partie réception du prototype a été réalisée dans le cadre d'un contrat de collaboration CRAN-LETI-BioMoCeTi (cf. §A.II.4.2.2). Exploitée depuis 2007, elle combine trois caméras recevant chacune l'image de la scène dans une bande particulière et ne nécessite plus aucune pièce mécanique mobile. Les développements logiciels complémentaires associés et l'optimisation des performances de la partie source sont en cours d'évaluation. A partir de séquences d'images acquises sur fantômes fluorescents à l'aide de ce dispositif, nous avons validé la construction d'images panoramiques bimodales correspondantes [CI24, CN17].

II.4 Conclusion et perspectives

L'**imagerie endoscopique panoramique** permet au clinicien d'observer des zones de tissus plus étendues, facilitant ainsi le repérage de lésions satellitaires, la comparaison, le suivi et le guidage d'examen ultérieurs voire l'archivage des données.

Nous avons développé une première méthode robuste de **recalage** et de **mosaïquage** automatique basée sur l'**IM** des niveaux de gris entre chaque paire d'images consécutives et une optimisation des paramètres de transformation utilisant un **gradient descendant stochastique** [Th7]. Cette méthode comprend également la **correction des défauts** spécifiques liés aux images endoscopiques (distorsions radiales, vignettage, motif des fibres optiques). Incidemment, nous avons mis au point une méthode originale de **calibrage endoscopique**, précise, simple et rapide (ni mire, ni positionnement particuliers). Afin d'améliorer la qualité du mosaïquage, nous avons également proposé un ajustement global et simultané des paramètres de toutes les transformations locales issues du recalage d'images (parcours en boucle). Une évaluation **quantitative** de l'erreur de mosaïquage (quelques pixels) a été réalisée sur fantômes ainsi qu'une évaluation **qualitative** sur quelques séquences issues de cystoscopies de patients [RI11] (en intégralité, page 163).

La deuxième méthode développée nous a permis de poursuivre ces travaux en évoluant vers un algorithme **rapide** de mosaïquage automatique compatible avec la durée de l'examen clinique et suffisamment robuste [Th9]. Après avoir évalué une première approche basée sur la **TFM**, nous avons mis en oeuvre une méthode composite originale de calcul des paramètres de transformation perspective pour le recalage des images. Les valeurs des paramètres de translation obtenues par corrélation de phase servent d'**initialisation rapide** à un algorithme d'optimisation itératif court de l'ensemble des paramètres. Ce dernier est basé sur une méthode de minimisation d'erreur (Gauss-Newton) par **composition inverse** permettant un calcul unique du Hessien et donc un gain significatif de temps de calcul. Les performances de la solution développée en termes de robustesse, de vitesse et de précision de construction des images panoramiques, ont été évaluées **quantitativement** et **qualitativement** respectivement sur fantômes (application de transformations connues, calcul d'erreur, limites de convergence) et sur séquences réelles (variabilité des sites, instruments, patients). Par ailleurs, l'approche développée nous a permis d'analyser pour la première fois sur des séquences réelles, les **distributions des valeurs de translations** existant entre les images successives. Nous avons exploité ces informations pour mettre en oeuvre une étape originale de **sélection dynamique et automatique** des paires d'images à recaler nous permettant de réduire significativement le temps global de construction d'une image panoramique complète [RI17] (en intégralité, page 179).

Parallèlement, grâce au développement d'un système d'imagerie endoscopique multi-bandes spécifique (acquisition entrelacée des séquences acquises en lumière blanche et en fluorescence), nous avons validé la **faisabilité de la superposition** sur les images panoramiques construites en lumière blanche, d'informations de **fluorescence co-localisées spatialement**.

L'acquisition simultanée des images en lumière blanche et en fluorescence permet d'envisager de nouvelles formes de visualisation des données spatiales et spectrales plus **pratiques** pour le clinicien comme par exemple la construction d'images panoramiques partielles d'organe avec localisation des anomalies repérées ou bien la visualisation endoscopique en temps réel **augmentée** par la localisation de la fenêtre d'observation dans la carte de l'organe réalisée. Une partie de nos **travaux en cours** vise donc à poursuivre le développement de solutions de traitement d'images optimisées (sélection dynamique, prédiction) pour être compatible en terme de temps de réponse avec les contraintes d'observation clinique (images panoramiques de vessie **quasi-entière**, cf. partie prospective B.IV page 81). Enfin, après que nous ayons exploré une première approche de visualisation 3D sur une forme générique de vessie [CI24, CN17], une autre partie de nos travaux s'oriente également vers la recherche de solutions de **représentation** voire de **recalage 3D** (visualisation, acquisition).

Chapitre III

Spectroscopies optiques *in vivo* : identification et caractérisation tissulaire

Ce chapitre présente les solutions développées et les résultats obtenus dans le cadre des thèses de Emilie Pery (2003-2007, co-directeur), Marine Amouroux (2005-2008, co-encadrant) et Gilberto Diaz (2005-2008, co-directeur).

Production scientifique du projet (2003-2008) :

- 6 RI [RI9, RI13, RI14, RI16, RI15, RI18] dont les 4 derniers en intégralité en pages 197, 207, 223 et 235 de ce manuscrit
- 1 RN [RN3], en intégralité page 127
- 8 CI [CI14, CI15, CI21, CI22, CI27, CI25, CI23] et [CI20] en intégralité page 155
- 9 CN [CN3, CN6, CN8, CN11, CN15, CN16, CN12, CN13, CN14]

III.1 Motivations, positionnement et originalités de l’approche

Pour plus de détails, se référer aux parties correspondantes des mémoires des thèses soutenues [Th8, Th11] et des articles [RI14, RI15, RI16, RI18, RN3].

Comme mentionné en B.I.1.2 page 38, l’identification et la caractérisation *in vivo* non invasive, précise et en temps réel, d’états tissulaires localisés représente un enjeu majeur pour améliorer l’efficacité du diagnostic (guidage biopsique), du traitement chirurgical (aide au ciblage et au contournage) et du suivi individualisé.

Au cours du processus carcinogénique, le tissu pathologique se différencie du tissu sain par de multiples modifications **anatomiques**, **biochimiques** et **physiologiques** à l’échelle **cellulaire** et **tissulaire** [3, 107, 77] avec notamment : une désorganisation de l’architecture tissulaire (multiplication cellulaire anormalement élevée, épaissement de l’épithélium, infiltration des tissus voisins, néo-vascularisation, *etc.*), un hyper-chromatisme (épaissement et densification de la chromatine⁵) et un hyper-métabolisme des cellules tumorales (production augmentée de NADH⁶), une perte de polarité cellulaire (changement d’orientation), une augmentation de la

5. La chromatine est la substance de base des chromosomes qui associe l’ADN et des protéines fibrées impliquées dans le repliement de l’ADN

6. Le NAD, Nicotinamide Adénine Dinucléotide, est une coenzyme d’oxydo-réduction impliquée dans le métabolisme énergétique de la cellule (transport d’électrons), se trouvant sous forme réduite (NADH) ou phosphatée (NADPH).

taille des noyaux⁷, une synthèse anormale des molécules et des modifications des interactions cellulaires (perturbation du transport trans-membranaire et de la perméabilité cellulaire, activité métabolique modifiée).

Ces modifications physico-chimiques, morphologiques, structurelles et fonctionnelles, entraînent des modifications des propriétés **optiques** globales d'absorption et de diffusion de la lumière dans les tissus, sensibles dès les premiers développement hyperplasiques.

La spectroscopie optique tissulaire, également appelée spectroscopie optique de diagnostic *in vivo* voire "biopsie optique", caractérise l'ensemble des méthodes d'acquisition et d'analyse spectrales du rayonnement émis par un tissu *in situ*, en réponse à une excitation lumineuse adéquate [1]. La propagation de la lumière dans les tissus biologiques entraîne différents phénomènes d'**interaction**. La diffusion élastique (sans changement de longueur d'onde) constitue le phénomène prédominant qui permet à la lumière pénétrant dans le tissu de revenir à la surface après un ou plusieurs changements de direction (diffusion simple ou multiple) et d'être mesurée. La lumière d'excitation peut également être absorbée soit par des chromophores (hémoglobine, mélanine, eau) c'est-à-dire sans ré-émission photonique, soit par des fluorophores (collagène, élastine, NADH, flavines, porphyrines...) qui vont générer une émission de fluorescence à une longueur d'onde supérieure à celle de l'excitation, avant d'être détectée. Par ailleurs, des processus inélastiques produisant un décalage en longueur d'onde (diffusion Raman) peuvent être exploités. Compte tenu des gammes de longueur d'ondes d'intérêt associées (du proche UV à l'Infra-Rouge), ces techniques sont particulièrement bien adaptées à la caractérisation de tissus biologiques d'épaisseurs limitées tels que les muqueuses et la peau (détection des lésions épithéliales et sub-épithéliales). La plupart du temps fibrées, elles sont par ailleurs compatibles avec un usage en endoscopie.

La fluorescence est porteuse d'informations liées à la nature **biochimique** et à l'activité **métabolique** du tissu et à ses modifications. Historiquement la première à avoir été mise en œuvre en clinique, la Spectroscopie d'AutoFluorescence (SAF) est aujourd'hui très développée à des fins diagnostiques *in vivo* en cancérologie [15]. Ses principales applications concernent la cavité buccale, l'oesophage, les bronches, le col de l'utérus, la peau et la vessie. L'exploitation et l'interprétation des résultats passent par des analyses statistiques et empiriques des spectres d'intensité de fluorescence mesurés, dont les caractéristiques spectrales sont modifiées par les contributions intriquées de l'absorption et de la diffusion qui limitent l'extractibilité d'informations biochimiques quantitatives [35]. Différentes approches de modélisation sont actuellement développées pour compenser ces distortions et extraire la fluorescence "intrinsèque" du tissu [6, 29]. Afin d'exploiter les informations complémentaires liées à la localisation et à la concentration des divers fluorophores intrinsèques dans les tissus, quelques équipes [98, 46, 124, 122] ont développé des méthodes de spectroscopie à multiple excitations de fluorescence appliquées notamment au col de l'utérus, à la vessie et à la peau. Pour le diagnostic, le principe consiste à rechercher les combinaisons de longueurs d'onde d'excitation qui fournissent les meilleures performances de classification des spectres d'émission correspondants ou à analyser les différences entre les matrices d'excitation-émission obtenues pour les différents types de tissus testés.

La Spectroscopie de Diffusion Élastique (SDE), plus récemment exploitée dans le cadre du diagnostic *in vivo* en clinique, suscite un intérêt croissant [51, 1]. Ses principales applications en cancérologie concernent la classification de tissus sains et pré-cancéreux de l'oesophage, du sein, de la vessie et de la peau. Les diffusions simple et multiple des photons sont porteuses d'informations liées aux caractéristiques **morphologiques** et **structurelles** des constituants du tissu dont les propriétés optiques d'absorption et de diffusion façonnent les spectres d'intensité

7. L'augmentation du rapport volumique noyau sur cytoplasme est un indice de diagnostic de cancer [80, 115]

rétro-diffusée par ce dernier. L'exploitation des spectres de réflectance diffuse finalement obtenus passe d'une part, par des analyses statistiques et empiriques des caractéristiques spectrales extraites afin de rechercher des corrélations avec des états pathologiques et d'autre part, par le développement de méthodes analytiques ou statistiques de **modélisation** du transport de la lumière dans les tissus biologiques pour fournir des informations diagnostiques quantitatives sur leur composition (concentration en hémoglobine ou en mélanine, dimension et densité des noyaux des cellules épithéliales, valeur des coefficients optiques, *etc.*).

Dans la bande d'intérêt NUV-NIR, l'intensité lumineuse mesurée (spectre ou image) est donc la résultante d'une **combinaison** de phénomènes complémentaires d'absorption "pure", d'absorption/émission en fluorescence et de diffusions multiples, dont les contributions varient en fonction de la longueur d'onde. Quelques équipes de recherche ont ainsi montré l'intérêt de combiner plusieurs méthodes spectroscopiques, comme la diffusion simple ou multiple et l'autofluorescence, pour augmenter la sensibilité et la spécificité du diagnostic et donc sa fiabilité dans le cadre du diagnostic *in vivo* en clinique des cancers du col de l'utérus, de la cavité buccale, du sein et de la peau [88, 45, 25, 122]. Les mesures colocalisées spatialement des spectres de fluorescence et de diffusion élastique permettent notamment de corriger les spectres de fluorescence en utilisant l'information apportée par les données de réflectance diffuse ou d'extraire des caractéristiques spectrales supplémentaires et complémentaires en vue de sélectionner une combinaison la plus discriminante possible en regard du problème de classification tissulaire posé.

Nos travaux s'inscrivent dans la continuité des 2 thèses précédemment soutenues au laboratoire dans le domaine de la spectroscopie fibrée en autofluorescence par J.J. Padilla [85] (étude sur les tumeurs cutanées murines chimio-induites) et en diffusion élastique par V. Chalau [Th6]. Ce dernier a développé une maquette compacte de spectroscopie de diffusion élastique résolue spatialement et montré qu'il existe, dans la bande 600–800 nm, des différences significatives entre les spectres de diffusion recueillis *in vivo* sur la peau saine de rats et sur des tumeurs transplantées sous-cutanées, visibles à l'oeil nu.

Dans le cadre de notre collaboration **étroite** avec les cliniciens du CAV, les applications visées en cancérologie concernent prioritairement la vessie (en complémentarité avec les travaux menés en imagerie endoscopique sur ce même organe) et la peau. Nous cherchons en particulier à **optimiser** la sensibilité et la spécificité du diagnostic des états sain, hyperplasiques et dysplasiques pour ces organes. Pour résoudre ce problème, l'originalité de notre approche réside dans le **développement** complémentaire de **techniques** et de **méthodes** :

- de mesures physiques *in vivo* permettant la réalisation de systèmes d'instrumentation scientifique précis, simples, d'un coût limité et transférables en clinique,
- de traitement et d'analyse des données spectroscopiques pour la caractérisation des paramètres optiques des tissus (modélisation statistique) et pour la classification diagnostique (approches linéaires et non-linéaires) associée à l'extraction et la sélection de caractéristiques spectrales discriminantes,
- de validation expérimentale sur fantômes et sur modèles tumoraux animaux d'intérêt (pré-clinique).

Objectifs des travaux :

- Combiner spatialement les mesures d'autofluorescence (sensibles aux modifications biochimiques et structurales du tissu) et de diffusion élastique (sensibles aux modifications anatomiques et architecturales)
- Optimiser la qualité de l'identification diagnostique (approche multi-modalités, résolution spatiale et spectrale)
- Améliorer le réalisme de la modélisation du comportement optique des tissus biologiques

(méthodes théoriques et expérimentales) pour identifier les propriétés optiques spectrales des tissus (absorption, diffusion et fluorescence intrinsèque)

- Améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic (extraction de caractéristiques, classification)
- Valider les méthodes (mesures physiques et traitement des données) sur modèles précliniques en se rapprochant de l'étiologie tumorale humaine pour permettre un transfert clinique optimal

Verrous à lever :

- Aspects métrologiques et technologiques : développement et validation d'une instrumentation de spectroscopie multi-modalités résolue spatialement, utilisable *in vivo* puis en clinique ; mise au point de méthodes de calibrage fiables
- Traitement de données : extraction de caractéristiques spectrales discriminantes pour la classification affinée d'états hyperplasiques et dysplasiques
- Modélisation des interactions lumière-tissus en fluorescence et diffusion multiple pour les milieux multi-couches, et application à l'identification des paramètres optiques de tissus biologiques

III.2 Spectroscopie bimodale : instrumentation et validations expérimentales

III.2.1 Situation du problème, applications et objectifs des travaux

Les travaux actuellement publiés sur le développement et l'application de systèmes d'**instrumentation scientifique** en spectroscopie bimodale d'autofluorescence et de diffusion élastique sont le fait de quelques équipes principalement aux Etats-Unis [88, 45, 25], au Canada [122] et aux Pays-Bas [28]. Ces systèmes se composent systématiquement de trois parties principales : une sonde à multiple fibres optiques amenée au contact du tissu, un système de source d'excitation générant successivement différents pics d'excitation de fluorescence et une excitation large bande pour la diffusion élastique, et un système d'acquisition spectrométrique, le plus souvent multi-voies pour permettre l'acquisition simultanée de spectres d'intensités recueillis par plusieurs fibres optiques de la sonde situées à différentes distances de la fibre d'excitation (résolution spatiale). La spécificité de la configuration instrumentale (géométrie de la sonde fibrée, gamme de longueurs d'onde d'excitation, sensibilité de mesure...) implique le développement et la réalisation de solutions dédiées dont les caractéristiques et performances dépendent notamment des technologies disponibles, des organes et des pathologies visés, des besoins de mise en œuvre *in vivo* voire de transfert clinique ou encore des méthodes de calibrage.

L'une des principales difficultés concerne le développement, la réalisation et le calibrage du système de source multi-excitations. Les solutions implémentées par les équipes précédemment référencées reposent essentiellement sur la combinaison d'une lampe blanche large bande et d'un monochromateur ou bien sur des systèmes plus complexes et plus coûteux combinant par exemple plusieurs excitations LASER.

Le but final de nos travaux en instrumentation est le développement et l'utilisation en clinique d'un système de spectroscopie bimodale en diffusion élastique et multiple excitations de fluorescence facilement configurable et d'un coût limité (réalisation et maintenance). Nos objectifs ont été fixé en 4 étapes successives :

- 2003–2004 : Exploitation des outils **existants** et **validation** sur tissus biologiques *ex vivo*, définition des contraintes et étude de solutions techniques

- 2005–2006 : Développement et évaluation d’une solution bimodale avec **mono-excitation** d’autofluorescence, validation *in vivo* sur modèle tumoral animal,
- 2006–2008 : Développement et évaluation d’une solution bimodale avec **multi-excitations** d’autofluorescence, validation *in vivo* sur modèle tumoral animal,
- 2008–2011 : Réalisation d’un outil utilisable en **clinique** et validation *in vivo* sur patients

III.2.2 Travaux réalisés et résultats obtenus

III.2.2.1 Développements et réalisations en instrumentation

L’orientation de nos travaux en instrumentation débutés en 2003 s’est fondée sur les dispositifs développés jusque là au CRAN – CAV (au sein du laboratoire Instrumentation Médicale Automatisée en Cancérologie IMAC, sous la responsabilité du Docteur J. Didelon) à savoir : un spectrofluorimètre portable fibré (excitation monochromatique à 410 nm, une voie d’acquisition) et une maquette de spectroscopie de diffusion élastique (2 sources d’excitation à base de Diodes Electro-Luminescentes -DEL-, une voie d’acquisition) (thèse de V. Chalau [Th6]). L’expertise de ces dispositifs a été réalisée grâce à leur mise en œuvre dans le cadre d’une **première étude expérimentale** menée en 2004 sur tissus artériels *ex vivo* [Th2]. Nous avons ainsi pu identifier les contraintes techniques et technologiques posées par le développement d’un nouveau prototype “bimodal” et qui concernent en particulier :

- la **colocalisation spatiale** (sur le tissu) des excitations de fluorescence et de diffusion élastique, obligeant à injecter dans une seule et même fibre successivement des pics d’intensité de quelques nanomètres de largeur centrés sur des longueurs d’onde entre 350 et 450 nm et une lumière à large bande spectrale allant de 350 à 800 nm, tout en conservant une puissance incidente au tissu suffisante,
- la possibilité de capter la lumière rétro-diffusée par le tissu à **plusieurs distances** (entre 200 et 1700 μm) du lieu d’injection de l’excitation, nécessitant une sonde à multiples fibres optiques,
- l’acquisition simultanée des spectres d’intensités recueillis par les différentes fibres de collection et impliquant un dispositif spectrométrique **multi-voies** suffisamment sensible.

Une partie des travaux de thèse d’E. Pery (2004-2005) [Th8] puis de M. Amouroux et G. Diaz (2006-2007) [Th11, Th12] a été consacrée à l’étude, au développement et à la réalisation de différentes solutions **méthodologiques** et **techniques** pour chacune des trois parties principales du dispositif : sonde de mesure fibrée, source multi-excitations et système d’acquisition spectrométrique.

Les caractéristiques techniques de la **sonde** à multiple fibres optiques (ouverture numérique -ON-, diamètres, nombre, nature des fibres, distances entre les fibres) sont des éléments clés qui influencent l’efficacité de collection des photons et le Rapport Signal sur Bruit (RSB) des mesures et qui dépendent des propriétés optiques du tissu visé et des profondeurs de sondage recherchées [112]. L’augmentation du diamètre des fibres ou des distances inter-fibres permet d’explorer des volumes plus profonds dans les tissus [92, 65]. Par exemple, les petites distances inter-fibres favorisent la collecte de la lumière diffusée une seule fois dans la couche épithéliale⁸ [14, 66] et l’augmentation de l’ON permet d’accroître l’intensité du signal de fluorescence acquis [93, 90, 127]. Par ailleurs, l’application endoscopique souhaitée implique un diamètre extérieur de sonde n’excédant pas 2 à 3 mm. Au final, la sonde réalisée d’un diamètre de 2 mm possède un maximum de fibres optiques de 200 μm de diamètre (37 au total) afin de disposer d’un grand

8. Par exemple, une distance inter-fibres de 250 μm permet de sonder les tissus jusqu’à une profondeur de 100 μm aux longueurs d’onde du visible.

choix de combinaisons de distances inter-fibres (de 0.255 à 1.53 mm) en fonction des tissus. Les fibres à saut d'indice choisies en silice/silice possèdent une bande de transmission en longueur d'onde allant de 200 à 1100 nm, une ON de 0.22 et sont traitées anti-solarisation⁹ pour leur maintien dans l'UV. La nouvelle sonde est stérilisable et peut suivre le même processus de décontamination que les endoscopes souples.

Comme mentionné ci-avant, pour le **système de génération d'excitations multiples** en fluorescence et en diffusion élastique, les deux principales approches développées [88, 45, 25, 122, 28] mettent en œuvre des systèmes constitués soit d'une lampe blanche de forte puissance et d'un monochromateur, soit d'une combinaison de LASER (diodes ou à colorants) et d'une lampe blanche. Dans un premier temps, nous avons étudié une solution originale combinant une vingtaine de DEL et diodes LASER (pics d'émission de 380 à 940 nm), mais sur la base des technologies actuelles, l'efficacité d'injection de l'ensemble des faisceaux de ces différentes sources, notamment à l'aide d'un réflecteur spécialement adapté, reste un problème non résolu (cf. [Th8]). Dans un deuxième temps, nous avons donc choisi de développer un système bimodal avec mono-excitation de fluorescence associant une diode LASER à 410 nm (puissance ajustable jusqu'à 40 mW) et une source tungstène-halogène faible puissance 20W (350-2000 nm). Ce système a servi aux études expérimentales sur fantômes [RI15] et sur tissus sains et tumoraux de vessie de rats *in vivo* menées par E. Pery [Th8]. Dans un troisième temps, nous avons développé une méthode originale de génération d'excitations multiples de fluorescence en associant simplement une lampe Xénon 300W à arc court avec spectre d'émission étendu dans l'UV (350-1000 nm, sans émission d'ozone) et un couple de filtres optiques passe-bas et passe-haut linéairement variables. Le système développé (C++ puis Labview) permet de paramétrer entièrement une séquence d'excitations en fonction des caractéristiques des pics souhaitées (nombre et largeur) et synchronise les déplacements précis de ces filtres avec le système d'acquisition.

Le **système d'acquisition** doit permettre l'enregistrement simultané de plusieurs spectres (entre 10 et 20) avec une résolution spectrale de quelques nanomètres, une sensibilité suffisante pour mesurer les faibles intensités d'émission d'autofluorescence dans les bandes de longueurs d'onde d'intérêt. Les solutions développées par les principales équipes dans le domaine reposent sur la mise en œuvre d'un spectrographe imageant avec un détecteur CCD intensifié (ICCD). Dans un premier temps, nous avons étudié une solution méthodologique et technique basée sur un spectromètre mono-voie miniature (350 - 850 nm, résolution ≈ 0.3 nm) couplé à un système de déplacement rapide des fibres qui s'est révélée inadaptée à nos besoins en termes de vitesse, de robustesse (pièces mobiles) et de répétabilité (positionnement de chaque fibre). Parallèlement nous avons testé les performances d'une deuxième solution compacte couplant une caméra CCD à multiplication d'électrons (EMCCD) et un objectif de diffraction de la lumière issue de 13 fibres optiques en ligne. Les essais réalisés ont mis en évidence l'existence de problèmes non résolus de "smearing"¹⁰, de calibrage, de temps d'acquisition et de sensibilité [Th8]. Finalement, nous avons choisi une solution technique versatile reposant sur un spectromètre imageant de configuration Czerny-Turner (longueur focale 320 mm) avec 3 réseaux de diffraction, une caméra CCD rétro-éclairée (optimisée pour l'UV) et une roue à filtre interne pour couper les différentes excitations de fluorescence rétrodiffusées. Un adaptateur fibré en ligne a été spécialement conçu pour coupler notre sonde à l'entrée du spectromètre. Les détails des systèmes sont données dans [RI15, RI16, RI18] (en intégralité pages 197, 207 et 235).

9. Détérioration irréversible des caractéristiques de transmission de la silice dues aux irradiations UV intenses

10. Traînées verticales dans l'image dues au transfert des charges

III.2.2.2 Calibrages, validation métrologique et pré-traitements

Les éléments les plus récents relatifs à cette partie sont consultables dans [RI18] en page 235 du présent document.

Les spécificités du dispositif instrumental réalisé imposent de développer, de mettre au point et de valider des méthodes expérimentales de **calibrage** et de **caractérisation métrologique** adaptées qui concernent :

Le système d'excitation programmable :

- Un calibrage en longueur d'onde de l'excitation lumineuse générée en bout de sonde est effectué pour chaque protocole expérimental. Il consiste en un ajustement précis des positions des filtres linéaires pour obtenir les caractéristiques définies pour chaque pic d'excitation de fluorescence (longueur d'onde centrale, largeur à mi-hauteur). Les tests de répétabilité effectués ont permis d'obtenir pour ces paramètres des variations inférieures à 0.5%.
- La puissance de chaque excitation de fluorescence est mesurée à chaque début de manipulation. Le dispositif ne permet pas un réglage d'amplitude direct et par ailleurs la puissance lumineuse délivrée par la lampe Xénon diminue au fur et à mesure de son utilisation. De ce fait, dans le cas d'un protocole expérimental long, une mesure de puissance (photodiode calibrée) en sortie de sonde est quotidiennement effectuée pour chaque excitation de fluorescence afin de pouvoir tenir compte des variations éventuelles.

Le système d'acquisition spectrométrique (sonde et spectrographe) :

- Un calibrage en amplitude est effectué régulièrement en identifiant la réponse spectrale du système. Les différents éléments constitutifs de la chaîne d'acquisition spectrométrique (fibres, lentilles, miroirs, réseaux de diffraction, détecteur CCD) possèdent chacun leur propre réponse spectrale qui déforme le spectre d'intensité émis par le tissu. L'identification de la réponse spectrale de l'ensemble consiste à injecter la lumière d'une source (tungstène) calibrée en amplitude entre 350 et 800 nm dans chacune des fibres de la sonde, à enregistrer les spectres d'intensité correspondants et à calculer les coefficients de correction à appliquer à chaque intensité en fonction de la longueur d'onde pour retrouver les valeurs de la source de calibrage [23, 25].
- Le calcul des spectres de réflectance diffuse implique l'acquisition des spectres d'intensité de diffusion élastique mesurés sur le tissu et sur un standard diffusant de réponse spectrale uniforme dans la bande 350-800 nm.
- La répétabilité des mesures évaluée sur fantômes nous a permis de valider des variations maximales d'amplitude inférieures à 5%.

Pour pouvoir traiter automatiquement, comparer et interpréter correctement les spectres d'intensités émis par les tissus, les spectres enregistrés (dits "bruts") doivent être corrigés et débarrassés d'un certain nombre de perturbations. Les **pré-traitements** essentiels concernent en particulier :

- la suppression de pics parasites de très grande amplitude comparée à celle du signal, étroits (quelques nanomètres de large) et apparaissant de façon aléatoire et très épisodique.
- le moyennage de plusieurs spectres bruts acquis à la suite tout en conservant une durée des mesures compatible avec les contraintes du protocole expérimental.
- le lissage des spectres d'autofluorescence et de réflectance diffuse en fonction de leurs caractéristiques propres (amplitude et largeur des bosses ou creux informatifs).
- l'application des coefficients de correction de la réponse du système (obtenus au cours de l'étape de calibrage expérimental) ce, pour chacune des voies d'acquisition.

- la normalisation des spectres de réflectance diffuse et d'autofluorescence permettant de réduire les variations inter-patients [23].

III.2.3 Validations expérimentales : motivations et modèles

De 2004 à 2008, nous avons mené principalement quatre protocoles d'étude expérimentale dans le cadre des thèses de E. Pery [Th8], M. Amouroux [Th11] et G. Diaz [Th12] :

Etude *ex vivo* sur tissus artériels (cf. [RI14], consultable en page 197)

La partie expérimentale de cette étude a été menée au moyen des dispositifs **précédemment développés** au sein du laboratoire : spectrofluorimètre à 410 nm et maquette de réflectance diffuse (cf. §B.III.2.2.1).

Notre démarche initiale était de chercher à évaluer la capacité et la complémentarité des deux méthodes pour caractériser des modifications dimensionnelles et structurelles de milieux préférentiellement biologiques (plutôt que des fantômes synthétiques). Notre idée a été d'exploiter les tissus artériels dont les propriétés rhéologiques (relations contraintes – déformations) sont relativement bien caractérisées. Premièrement, des déformations peuvent être appliquées assez simplement sur des échantillons prélevés entraînant ainsi une réorganisation dynamique des éléments constitutifs de la paroi artérielle. Deuxièmement, la structure en couches concentriques de la paroi constitue un modèle réel bien adapté à l'application de modèles théoriques actuellement développés et simulant le transport de la lumière dans les milieux stratifiés. Troisièmement, notre expertise précédemment acquise sur l'étude des propriétés mécaniques d'artères nous a permis de montrer que les artères fraîches et issues de cryo-conservation sont caractérisées par des modifications de leurs propriétés rhéologiques [RI4, RI6, RI8] du fait des dégradations en termes de viabilité cellulaire [100] et d'organisation des constituants du tissu [33] liées au processus de congélation. Les quelques études spectroscopiques consacrées aux artères portent essentiellement sur la caractérisation des propriétés optiques d'artères saines et pathologiques (athérosclérose) [27, 97].

L'originalité de notre approche a été de chercher à observer et analyser des modifications des **réponses bio-optiques de tissus artériels** (absorption, diffusion, fluorescence) en **modifiant dynamiquement les caractéristiques intrinsèques** de ces tissus **par déformation et congélation**. Pour ce faire, nous avons mis en œuvre un système de conditionnement mécanique *in vitro* uniaxial sur anneaux artériels (carotides de cochon) permettant l'acquisition simple de jeux de données complets dans des conditions "contrôlées" [27, 40]. Des résultats préliminaires publiés par notre groupe [RI9] ont confirmé l'existence de différences entre les comportements rhéologiques et optiques des artères avant et après cryoconservation, en utilisant la spectroscopie d'autofluorescence seule. Ensuite, nous avons montré la complémentarité des mesures spectroscopiques en autofluorescence et en réflectance diffuse pour caractériser les propriétés biomécaniques des artères en déformation et avant / après cryoconservation. Finalement, à l'aide d'un modèle de propagation de lumière et de fluorescence dans un milieu multi-couches dans la bande [470 - 850 nm], nous avons pu montrer de quelles manières les propriétés optiques (coefficients d'absorption et de diffusion) des différentes couches de la paroi artérielle varient avec les déformations mécaniques [RI14].

Etude *in vivo* sur tissus sains, inflammatoires et cancéreux de vessies de rats (cf. [Th8])

Cette étude expérimentale a été menée au moyen du système de spectroscopie **bimodale** existant en **mono-excitation** de fluorescence (410 nm) et en diffusion élastique, avec 13 distances inter-fibres. L'objectif de cette première étude préclinique était la caractérisation

des performances diagnostiques de la méthode développée sur des tissus sains et cancéreux *in vivo*.

Dans le cadre de notre collaboration étroite avec les chercheurs du centre de lutte nationale contre le cancer de Nancy (CAV), nous avons effectué cette première étude sur un modèle de tumeur de vessie de rats développé au laboratoire. Il s'agit d'un modèle de tumeur orthotopique instillée dans la vessie qui simule la maladie dans son comportement comme dans sa composition histologique et qui a été mis au point à destination des études en PDT réalisées dans l'équipe [38]. Le modèle est obtenu au moyen d'un pré-traitement (acide) sur l'urothélium du rat suivi d'une administration globale de cellules tumorales (lignée cellulaire de carcinome de vessie de rat). Son principal avantage est de fournir rapidement, entre trois et quinze jours, des lésions de tailles variables avec une classification histologique fiable des états sains et cancéreux. Par contre, la localisation tumorale *in vivo* constitue une difficulté à surmonter dans le cadre d'une approche ponctuelle comme celle de la spectroscopie fibrée. Le déroulement détaillé du protocole (matériels et méthodes) est précisé dans [Th8]. Au final, sur 99 sites analysés de 42 vessies de rats, trois classes histologiques Saine (S), Inflammatoire (I) et Cancéreuse (C) composées respectivement de 71, 18 et 18 sites, ont été établies pour servir de référence à la classification spectroscopique développée pour le diagnostic, et présentée plus loin au §B.III.4 page 72.

Etude *in vivo* sur tissus sains, hyperplasiques et dysplasiques de peau murine (cf. [Th11, Th12])

Cette étude expérimentale a été menée au moyen du système de spectroscopie **bimodale** développé en **multi-excitations** de fluorescence (7 longueurs d'onde de 360 à 430 nm) et en diffusion élastique. Au stade de l'étude préclinique, la caractérisation des performances diagnostiques de la méthode développée ne peut être optimisée et affinée sur des tissus sains, hyperplasiques et dysplasiques *in vivo*, qu'à condition de disposer d'un modèle d'induction tumorale "naturelle" présentant ces différents états **intermédiaires** du processus de carcinogénèse.

Dans le cas des cancers cutanés, l'exposition aux rayonnements UV du soleil est la principale cause environnementale d'augmentation de l'incidence du mélanome et du carcinome. A partir de la description, dans la littérature, de deux modèles d'induction chimique et par UV de carcinomes épidermoïdes sur la souris, nous avons choisi de mettre en place un modèle de souris glabres UV-irradiées compte tenu de ses caractéristiques avantageuses : le rayonnement UV agit comme un carcinogène "complet", les mutations génétiques précoces chez la souris sont similaires à celles observées chez l'homme, l'induction est moins complexe et moins risquée (toxicité pour l'homme). Un des inconvénients de ce modèle de photocarcinogénèse expérimentale est sa durée relativement longue au regard de la durée de vie des souris (typiquement au moins 10 à 20 semaines avant d'obtenir des carcinomes). Nous avons au contraire exploité cette durée pour adapter en continu les doses d'irradiations délivrées aux animaux afin de limiter systématiquement les réactions érythémateuses (à éviter pour notre étude). D'un point de vue purement pratique enfin, la peau est un organe dont l'accès direct facilite un repérage spatial précis des sites de mesures, indispensable pour pouvoir effectuer le suivi temporel de l'évolution du tissu.

Notre protocole a ainsi consisté à induire des états précancéreux et cancéreux sur la peau de souris SKH1 soumis à une irradiation UV régulière. Un suivi spectroscopique de 18 sites tissulaires précisément localisés sur le dos et le ventre de chaque animal a été effectué durant 30 semaines. La description détaillée de ce protocole (nombre, groupes, doses, durées, mise au point, *etc.*) ainsi que celle des critères de classification histologique rigoureusement

définis pour analyser les échantillons prélevés (épaisseur épiderme-derme, nombre, taille et orientation des cellules, mitoses. . .) est donné dans [Th11, RI16, RI18]. A partir de l'analyse histologique des prélèvements de 252 sites tissulaires qui ont fait l'objet des analyses et classifications spectroscopiques présentées plus loin, nous avons identifié 4 catégories de tissus : un groupe de 84 échantillons Sains (S), un groupe de 47 échantillons à caractère bénin appelé Hyperplasie Compensatoire (HC), et 2 groupes précancéreux avec 64 Hyperplasies Atypiques (HA) et 57 Dysplasies (D) .

Etudes *in vitro* sur fantômes

Parallèlement aux études précliniques, nous avons mené principalement deux études expérimentales sur **fantômes**.

La première étude (cf. [RI15] en intégralité page 223) est associée à nos travaux de développement d'un modèle de **simulation** des interactions lumière-tissus avec **fluorescence multiple**, pour lesquels une validation expérimentale est impérative [67]. Elle avait pour objectif de valider le fonctionnement de l'algorithme développé en comparant les résultats théoriques et expérimentaux obtenus sur des milieux multi-couches multi-fluorophores absorbants et diffusants. L'algorithme développé et la validation expérimentale associée sont détaillés plus avant dans les parties B.III.3.3.2 page 70 et B.III.3.3.3 page 71.

La seconde étude menée sur **fantômes** (cf. [RI13]) est associée à nos travaux de caractérisation de tumeurs cutanées mais visant leur application potentielle aux **mélanomes**. En effet, l'étape préalable sur fantômes est envisagée car l'étude des mélanomes *in vivo* présente un certain nombre de difficultés de mise en œuvre non résolues au stade actuel de nos travaux, que ce soit pour un modèle animal ou pour un protocole en clinique sur patients. L'un des paramètres essentiels du pronostic et du traitement du mélanome est l'épaisseur de la tumeur (indice de Breslow notamment) déterminée avec précision *a posteriori*, c'est-à-dire à l'issue de l'analyse histologique de son exérèse. Une évaluation préopératoire non invasive de cette épaisseur est donc un enjeu majeur pour pouvoir évoluer vers une procédure simplifiée, comme le montrent les études dermoscopiques et ultrasonographiques menées dans ce but. Or, la spectroscopie optique résolue spatialement présente également un potentiel certain pour sonder les tissus à différentes profondeurs. Nous avons donc cherché à déterminer la sensibilité de la méthode de SDE à des modifications d'épaisseurs d'un fantôme solide bi-couches avec une couche supérieure mimant l'absorption spectrale de la peau humaine. Les résultats obtenus ont permis de montrer notamment qu'en exploitant les spectres de réflectance diffuse acquis à 3 distances inter-fibres, il est possible de discriminer des variations de 1 mm d'épaisseur.

III.3 Modélisation des interactions lumière-tissus

III.3.1 Situation du problème

La modélisation des phénomènes d'absorption, de diffusion et de fluorescence dans les tissus biologiques permet d'étudier la distribution de la lumière qui s'y propage, en tenant compte de leurs propriétés optiques intrinsèques [35]. Comme mentionné ci-avant, celles-ci dépendent notamment de la concentration, de la morphologie, de l'orientation, de la composition biochimique et de l'activité métabolique des constituants du tissu [75]. Par exemple, les modifications des propriétés de diffusion et de fluorescence du collagène peuvent apparaître dans les stades les plus précoces du développement du cancer [121]. Les modèles de propagation de la lumière dans les tissus sont indispensables pour pouvoir extraire des informations **intra-tissulaires locales** à

partir de mesures **globales de surface** (calcul de la distribution spatiale de la fluence¹¹, estimation de la concentration en oxygène, quantification de la fluorescence intrinsèque, identification des coefficients optiques...) [81, 76, 32, 119, 69].

Les tissus biologiques sont à la fois inhomogènes microscopiquement (organites cellulaires, noyaux, membranes, matrices extra-cellulaires) et macroscopiquement (stratifications, vaisseaux sanguins, *etc.*). Ces différents degrés d'inhomogénéité sont difficiles à prendre en compte actuellement et l'hypothèse habituellement faite est que les tissus biologiques étudiés peuvent être considérés comme des milieux stratifiés et continus dont les propriétés optiques sont homogènes en tout point d'une même couche et ne dépendent pas du repère dans lequel elles sont observées ou mesurées (isotrope). On fait ainsi l'hypothèse que ce sont des milieux dont les propriétés optiques autorisent l'utilisation d'outils mathématiques applicables aux fonctions continues et/ou dérivables.

Dans [Th8], nous avons recensé les différentes approches développées depuis plus d'une vingtaine d'année pour modéliser le transport de la lumière dans les milieux absorbants et très diffusants tels que les tissus biologiques. La théorie de Mie traite la modélisation rigoureuse de la diffusion d'une Onde ElectroMagnétique plane harmonique par une particule sphérique homogène et isotrope. Elle consiste à résoudre les équations de Maxwell dans le milieu ambiant et dans les structures diffractantes (diffusantes) puis à appliquer des conditions aux limites (conditions de passage) aux interfaces. Les approches théoriques des phénomènes de diffusion dépendent donc des dimensions et formes des particules diffusantes en regard de la longueur d'onde (géométrie simple comme ellipsoïdes de révolution, cylindres) et de la concentration des centres diffuseurs dans le milieu. Lorsque le degré d'hétérogénéité du milieu augmente, il n'est plus possible de négliger les interactions des particules diffusantes entre elles (diffusions multiples) et de trouver une solution rigoureuse (analytique ou numérique). En pratique, la majorité des modèles développés pour les milieux biologiques très diffusants sont des solutions numériques ou analytiques approchées de l'Equation de Transfert Radiatif (ETR) dérivée de l'équation de Boltzmann appliquée aux photons. L'ETR décrit le transport particulaire d'un rayonnement de l'espace sous la forme de variations spatiales (au point $r \in \mathbb{R}^3$ représenté par \vec{r}) et temporelles $t \geq 0$ locales de la radiance / luminance $L(\vec{r}, \vec{s}, t, \lambda)$ émise dans un angle solide élémentaire $d\Omega$ en un point \vec{r} d'un élément de volume unitaire dans une direction \vec{s} [102, 103]. Cette équation ne prend en compte ni les effets de polarisation, ni les effets de cohérence. L'ETR (équation III.1) constitue un bilan énergétique qui exprime l'égalité entre les gains et les pertes d'énergie dans l'élément de volume considéré.

$$\frac{1}{c} \frac{\partial L(\vec{r}, \vec{s}, t, \lambda)}{\partial t} + \vec{s} \cdot \vec{\nabla}_r L(\vec{r}, \vec{s}, t, \lambda) = \mu_s(\lambda) \int_{4\pi} L(\vec{r}, \vec{s}', t, \lambda) f(\vec{s}, \vec{s}') d\Omega' - \mu_t(\lambda) L(\vec{r}, \vec{s}, t, \lambda) + Q(\vec{r}, \vec{s}, t, \lambda) \quad (\text{III.1})$$

avec

$$\vec{\nabla}_r L = \left(\frac{\partial L}{\partial x}, \frac{\partial L}{\partial y}, \frac{\partial L}{\partial z} \right) \quad \text{dans un repère cartésien } (0, \vec{x}, \vec{y}, \vec{z})$$

avec $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ le coefficient total d'extinction, μ_a et μ_s les coefficients d'absorption et de diffusion du milieu, c la vitesse de la lumière dans le milieu, $f(\vec{s}, \vec{s}')$ la fonction de phase normalisée et $Q(\vec{r}, \vec{s}, t, \lambda)$ une source locale de rayonnement.

Si des solutions exactes existent pour l'ETR dans des cas simples comme la diffusion isotrope et dans des géométries simples [89], il n'y a pas de solution générale mais différents types de

11. densité d'énergie lumineuse en J/cm^2

modèles déterministes (méthodes des flux, “adding-doubling”, approximation de la diffusion multiple isotrope, Kubelka-Munk), stochastiques (méthode de Monte Carlo) ou hybrides dérivant de l’ETR dont une description détaillée est donnée dans [Th8]. Compte tenu de la complexité des milieux considérés (anisotropie, multi-couches) et des contraintes géométriques (faibles distances entre fibres d’excitation et d’émission), les **simulations statistiques** de propagation de photons (Monte Carlo) sont les plus couramment utilisées pour modéliser la propagation de la lumière dans les tissus biologiques.

III.3.2 Applications de la méthode de Monte Carlo, Objectifs des travaux

Les méthodes probabilistes de simulation de type Monte Carlo (MC) permettent de traduire un problème déterministe en s’appuyant sur la loi des grands nombres. La méthode de MC est l’approche la plus largement étudiée pour simuler la propagation de la lumière dans les tissus biologiques qui constituent des milieux complexes et turbides [67] ; son principe est détaillé dans [Th8]. Brièvement, il consiste à propager un paquet d’énergie élémentaire (photon ou groupe de photons) pas à pas, avec un échantillonnage aléatoire de la longueur et de la direction des pas de déplacement, ainsi que de la proportion d’énergie absorbée dans chaque voxel élémentaire du milieu. Ces tirages aléatoires sont réalisés à partir des fonctions de distribution de probabilité qui dépendent des coefficients optiques du milieu (μ_a , μ_s , g). Le principal avantage de cette méthode est de fournir des résultats précis quelque soient les distances inter-fibres et une distribution spatiale détaillée de la fluence tout en tenant compte d’un grand nombre de paramètres tels que le spectre d’intensité de la source d’excitation, les caractéristiques de la sonde multi-fibrées (caractéristiques des fibres, géométrie de la sonde), les valeurs des coefficients locaux d’absorption et de diffusion, le caractère anisotrope de la diffusion dans les tissus, les valeurs d’indices de refraction et la présence de dioptries, *etc.*[116].

Wilson *et al.* [118] et Flock *et al.* [41] ont été parmi les premiers à appliquer la méthode de MC pour modéliser la propagation de la lumière dans des structures multi-couches de tissus. Entre 1992 et 1995, Wang *et al.* [116, 84] ont développé un code de référence “MCML” (Monte-Carlo for Multi-Layered media) largement exploité depuis pour simuler l’absorption et la diffusion de la lumière entre 350 et 1000 nm, dans différentes configurations expérimentales [37, 87], et sur différents tissus [75, 67, 111, 86]. La simulation de la fluorescence a, quant à elle, été partiellement implémentée dans quelques travaux. En 1997, Zeng *et al.* [123] ont simulé les interactions de fluorescence dans les tissus en 2 temps : calcul de la distribution de fluence de l’excitation à 442 nm par méthode de MC, excitation du fluorophore selon cette distribution et propagation de l’émission de fluorescence correspondante (modèle en 7 couches, bande spectrale de 470 à 750 nm). Sur le même principe, les simulations d’excitation de fluorescence à 476 nm et d’émission à 600 nm réalisées par Welch *et al.* en 1997 [117] ont montré que 90% de l’émission de fluorescence mesurée provient des couches du tissu jusqu’à 0.5 mm de profondeur. Müller *et al.* [81] ont validé en 2001 une méthode de compensation des contributions d’absorption et de diffusion tenant compte de la dimension spectrale des coefficients optiques et permettant d’obtenir un spectre de fluorescence intrinsèque du tissu. Ils précisent que cet algorithme n’est pas valide pour les fluorophores à haut rendement quantique et fortement absorbants et n’implémentent pas les émissions secondaires de fluorescence. En 2003, Liu *et al.* [67] ont été les premiers à décrire précisément un algorithme de simulation statistique de fluorescence avec une longueur d’onde d’excitation et une longueur d’onde d’émission. Ils ont ainsi proposé les expressions intégrables dans MCML des coefficients optiques de leur modèle en fonction de l’absorption et de la diffusion par le fluorophore et effectué une validation expérimentale rigoureuse sur fantômes avec une excitation à 460 nm et une émission à 520 nm. Chang *et al.* en 2004 [24] ont montré grâce aux

simulations de MC que l'absorption de la lumière dans la couche épithéliale de tissus normaux et préneoplasiques, est principalement due aux fluorophores endogènes qui la compose. Parmi les travaux récents, Ma *et al.* en 2007 [69] ont confirmé que la méthode de MC donnent de meilleurs résultats qu'un modèle d'approximation de la diffusion en fluorescence lorsque les fluorophores se trouvent localisés à proximité des fibres d'excitation et d'émission ou pour les petites distances inter-fibres.

Une des difficultés actuelles réside ainsi dans la simulation **couplée** de l'absorption, de la diffusion et de la fluorescence **multiple** (plusieurs fluorophores) dans les milieux multi-couches très diffusants et sur une large bande spectrale. Les travaux précédemment cités mettent également en évidence la nécessité de validations expérimentales rigoureuses des algorithmes de simulation développés avant leur application aux tissus biologiques. Les objectifs de nos travaux ont donc été :

- de développer une méthode de simulation de l'absorption et de l'émission spectrales de plusieurs fluorophores dans un modèle multi-couches implémentable dans un algorithme de type MCML (adapté à notre configuration expérimentale),
- d'effectuer une validation de l'algorithme ainsi développé en comparant les résultats de simulation et ceux expérimentaux de mesures en configuration de réflectance pour plusieurs distances inter-fibres et pour différents fantômes mono- et multi-couches contenant des éléments absorbants, diffusants et fluorescents.

III.3.3 Travaux réalisés et résultats obtenus

Les éléments détaillés relatifs à cette partie peuvent être trouvés dans [Th8] et [RI15] en intégralité page 223.

III.3.3.1 Algorithmes de Monte Carlo de base

L'algorithme de base développé est conforme à ceux classiquement employés dans les problèmes de simulation de propagation de photons dans des tissus biologiques multi-couches [96, 116, 55]. On considère ainsi un milieu semi-infini constitué de N couches parallèles sur lequel sont posées une fibre d'excitation et plusieurs fibres de réception (diamètres, positions, indices de réfraction et ON selon la sonde mise en œuvre). Chaque couche est décrite par une épaisseur e (mm), un coefficient d'absorption $\mu_a(\lambda)$ (cm^{-1}), un coefficient de diffusion $\mu_s(\lambda)$ (cm^{-1}), un indice de réfraction n , et un facteur d'anisotropie $g(\lambda)$.

Les photons source, avec un "poids" initial unitaire, sont injectés à partir des coordonnées d'origine de la fibre d'excitation. Chaque nouvelle direction de propagation est déterminée par un échantillonnage statistique de l'angle de déflexion $\theta \in [0, \pi]$ (dont l'expression du cosinus est classiquement basée sur la fonction de phase de Henyey-Greenstein utilisée pour les tissus biologiques) et de l'angle azimuthal (angle formé avec le plan précédent) $\alpha \in [0, 2\pi]$. La distance parcourue par le photon dans la nouvelle direction est définie comme le pas variable Δs tiré aléatoirement selon une densité de probabilité fonction des paramètres optiques de la couche tel que :

$$\Delta s = -\frac{\ln \xi}{\mu_a + \mu_s} \quad (\text{III.2})$$

avec ξ une variable aléatoire uniformément distribuée entre 0 et 1.

Après chaque pas, une partie du poids du photon est déposé à l'endroit où il se trouve puis le photon est propagé à nouveau jusqu'à ce que son poids atteigne un seuil minimum ou bien

qu'il sorte du milieu. Les poids restants des photons émergeant aux coordonnées des fibres de réception sont comptabilisés.

Depuis 2003, les principaux travaux publiés ont permis de valider des algorithmes de fluorescence dans le cas de modèles mono-fluorophore et/ou mono-couche [26, 74]. Liu *et al* [67] ont notamment défini une probabilité d'absorption de fluorescence liée au coefficient d'absorption du fluorophore μ_{af} telle que :

$$p = \mu_{af}/(\mu_a + \mu_{af} + \mu_s) \quad (\text{III.3})$$

La validation expérimentale sur fantômes absorbant et diffusant s'est effectuée avec un fluorophore (FAD) à une seule excitation (460 nm) et une seule longueur d'onde d'émission (520 nm).

III.3.3.2 Modèle développé pour la simulation de fluorescence multiple

L'hypothèse de base fixée pour notre modèle multi-couches est que chaque couche du milieu peut contenir un ou plusieurs fluorophores répartis de façon homogène. Ensuite, notre idée est de caractériser chaque fluorophore à l'aide de 4 paramètres principaux : un coefficient d'absorption $\mu_{af}(\lambda)$, un rendement quantique de fluorescence $\phi(\lambda)$, un spectre d'émission $S_{em}(\lambda)$ et une valeur de concentration moléculaire.

La méthode proposée de simulation de fluorescence multiple se compose de trois étapes principales : absorption d'un photon par un fluorophore en fonction de son spectre d'absorption et de sa concentration dans le milieu, sélection d'une longueur d'onde d'émission en fonction du spectre d'émission, et enfin génération d'un photon de fluorescence dans une nouvelle direction. Tout d'abord, le pas Δs est modifié en tenant compte du nombre de fluorophores n présents et de leurs coefficients d'absorption respectifs $\mu_{af_i}(\lambda)$ ($i \in [1, N_f]$, N_f le nombre total de fluorophore dans la couche) de sorte que :

$$\Delta s = -\frac{\ln \xi}{\mu_t} = -\frac{\ln \xi}{\mu_a + \sum_{i=1}^n \mu_{af_i} + \mu_s} \quad (\text{III.4})$$

avec $\xi \in [0, 1]$ un nombre aléatoire généré à partir d'une distribution de probabilité uniforme. A chaque événement d'absorption, on détermine si le photon est absorbé par un chromophore ou un des fluorophore f_i sur la base de leurs probabilités d'absorption respectives p_{abs} et p_{f_i} telles que :

$$p_{abs} = \frac{\mu_a}{\mu_t} \quad , \quad p_{f_i} = \frac{\mu_{af_i}}{\mu_t} \quad \text{et} \quad \sum_{i=1}^{N_f} p_{f_i} + p_{abs} + \frac{\mu_s}{\mu_t} = 1 \quad (\text{III.5})$$

En fonction du tirage aléatoire (distribution uniforme) d'un nombre $\xi_{norm} \in [0, p_{abs} + \sum_{j=i+1}^{N_f} p_{f_j}]$,

le photon est ainsi absorbé par :

un chromophore si $0 \leq \xi_{norm} < p_{abs}$, et le poids du photon est alors mis à jour conformément à la procédure habituelle avant de reprendre sa propagation,

un fluorophore f_i si $p_{abs} + \sum_{i=0}^{N_f-1} p_{f_i} \leq \xi_{norm} \leq p_{abs} + \sum_{j=i+1}^{N_f} p_{f_j}$ (avec $p_{f_0} = 0$, $N_f \geq 2$).

Dans ce cas, à partir du rendement quantique de fluorescence ϕ (probabilité de conversion en fluorescence), on détermine si le photon incident est converti ou non en un photon de fluorescence en effectuant un second tirage aléatoire d'un nombre ξ uniformément distribué entre 0 et 1 de sorte que :

- si $\phi < \xi \leq 1$, la conversion n'a pas lieu et le photon poursuit sa trajectoire après avoir déposé une partie de son poids en référence à μ_{af_i} de sorte que :

$$\omega_a = \omega_b \left(1 - \frac{\mu_{af_i}}{\mu_a + \sum_i \mu_{af_i} + \mu_s} \right) \quad (\text{III.6})$$

où ω_b, ω_a sont les poids des photons avant et après absorption.

- si $0 \leq \xi \leq \phi$, le photon incident est entièrement absorbé et un photon de fluorescence est généré aux mêmes coordonnées dans le milieu. La première direction de propagation du photon émis est déterminée par un tirage aléatoire de l'angle de déflexion $\theta \in [0, \pi]$ suivant une distribution uniforme.

Pour déterminer la longueur d'onde d'émission λ_j du photon de fluorescence généré en fonction de la longueur d'onde d'excitation du photon incident et du spectre d'émission $S_{em}^{f_i}(\lambda)$ du fluorophore concerné, nous avons tout d'abord défini la probabilité d'émission de fluorescence telle que :

$$p[\text{photon}(\lambda_j)] = v'(\lambda_j) = \frac{v(\lambda_j)}{\sum_{j=1}^n v(\lambda_j)} \quad (\text{III.7})$$

où $j \in [1, n_\lambda]$ et n_λ est le nombre total de points de discrétisation du spectre d'émission.

Ensuite nous utilisons la fonction de distribution cumulative $C_{v'}$ telle que $C_{v'}(\lambda_j) = \sum_{i=1}^j v'(\lambda_i)$

pour déterminer la longueur d'onde d'émission de sorte que :

$$\begin{cases} \text{si} & \xi \leq C_{v'}(\lambda_1) & \Rightarrow \text{émission à la longueur d'onde } \lambda_1 \\ \text{si} & C_{v'}(\lambda_{j-1}) < \xi \leq C_{v'}(\lambda_j) \text{ for } j \geq 2, & \Rightarrow \text{émission à la longueur d'onde } \lambda_j \end{cases} \quad (\text{III.8})$$

toujours avec $\xi \in [0, 1]$ à distribution uniforme.

Le modèle de fluorescence multiple dans un milieu multi-couches ainsi développé permet les effets de **cascade** (plusieurs événements consécutifs d'absorption – fluorescence) tout en respectant l'ordre des longueurs d'onde pour la génération de fluorescence (émission à une longueur d'onde supérieure).

III.3.3.3 Validation expérimentale sur fantômes

Le fonctionnement de notre algorithme a tout d'abord été testé en comparant nos résultats de simulation en absorption et diffusion sans fluorophore avec ceux de la **littérature** dans des configurations de paramétrage identique (coefficients optiques, épaisseur, nombre de photons. . .). Les valeurs de réflectance diffuse moyenne et d'erreur standard obtenues sont en parfait accord avec celles publiées par Giovanelly [47], Prahl *et al* [96] et Wang *et al* [116] ce qui confirme le fonctionnement correct de notre algorithme en l'absence de fluorophore.

L'**évaluation expérimentale** des performances du modèle développé a été réalisée en comparant les résultats obtenus en simulation et ceux issus des mesures sur 10 fantômes **mono-et multi-couches** liquides et solides de différentes complexités. Toutes les simulations ont été effectuées en lançant 40 millions de photons répartis sur 40 longueurs d'onde entre 400 et 800

nm. L'instrumentation utilisée est celle décrite précédemment. L'écart entre les courbes de simulation et celles expérimentales est exprimé comme la moyenne des différences normalisées en valeur absolue telle que :

$$Error_{mean} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{S_{exp}(\lambda_i) - S_{sim}(\lambda_i)}{S_{exp}(\lambda_i)} \right| \quad (\text{III.9})$$

avec N le nombre de points de la courbe, $S_{exp}(\lambda)$ et $S_{sim}(\lambda)$ les spectres de réflectance expérimental et simulé respectivement.

Nous avons choisi l'encre indienne super noire comme absorbeur, les intralipides comme éléments diffusants et 3 fluorophores dont les spectres d'émission se chevauchent partiellement : éosine Y, fluorescéine et cryptocyanine. Les spectres d'absorption et d'émission de chaque fluorophore ont été caractérisés par spectrofluorimétrie dans l'éthanol et dans l'eau.

Quatre fantômes liquides ont été réalisés dans l'éthanol : chaque fluorophore seul et un mélange fluorescéine + cryptocyanine pour tester le fonctionnement de l'effet cascade. Pour les trois fantômes mono-fluorophore, l'erreur moyenne obtenue est inférieure à 2.5%. Pour le fantôme bi-fluorophores cette erreur est de 5.3% confirmant la très bonne concordance entre spectres simulés et mesurés.

Six fantômes solides (agarose et eau distillée) ont été composés comme suit : 1 mono-couche avec fluorescéine, 3 bi-couches mono-fluorophore avec fluorescéine en couche inférieure et encre ou intralipides ou encre + intralipides en couche supérieure, 1 bi-couches bi-fluorophores éosine au-dessus et fluorescéine en-dessous, 1 tri-couches bi-fluorophores encre / éosine / fluorescéine. Les différents résultats ont permis de montrer une très bonne correspondance entre les courbes simulées et expérimentales et d'interpréter les variations d'amplitude et de forme des spectres d'intensité de fluorescence rétro-diffusés, en présence de couches absorbantes et/ou diffusantes. Pour les fantômes mono-fluorophore (mono- et multi-couches) les erreurs moyennes obtenues augmentent avec le nombre de constituants du fantôme de 2.2% (fluorescéine seule) à 9.4% (éosine / fluorescéine), probablement du fait du nombre identique de photons injectés est le même quelle que soit la configuration. Pour les deux fantômes bi-fluorophores, les courbes simulées et expérimentales concordent bien également et les erreurs moyennes obtenues sont de 9.3% et 10.6% respectivement pour le bi- et le tri-couches. Les temps d'exécution vont de 6 à 34 minutes du fantôme le plus simple (mono-couche, mono-fluorophore) au plus complexe (tri-couches, bi-fluorophore).

III.4 Extraction, sélection et classification de données

III.4.1 Situation du problème

La mise en œuvre des méthodes de spectroscopie optique tissulaire *in vivo* vise à exploiter les caractéristiques d'**amplitude** et de **forme** des spectres d'intensité de lumière rétro-diffusée recueillis en différents points de sondage du tissu pour effectuer une identification de l'état du tissu en question ce, de façon non invasive. L'objectif est ainsi de déterminer son appartenance à une **catégorie** pré-définie d'intérêt **diagnostique** (par exemple sain, inflammatoire ou tumoral) et attestée ou confirmée par l'expertise histologique.

En spectroscopie bimodale couplant multiple excitations de fluorescence et diffusion élastique résolue spatialement, le jeu de données spectroscopiques acquises en un point d'un tissu se compose de plusieurs (6 à 10) spectres d'intensité d'autofluorescence et de réflectance diffuse mesurés à plusieurs distances inter-fibres (2 à 6). Ces spectres acquis en n points des tissus sont regroupés

dans une matrice de données X (variables indépendantes) qui contient les valeurs numériques d'intensité observées pour les p variables quantitatives (longueurs d'onde de chaque spectre) pour les n individus. En parallèle, l'analyse histologique des n échantillons tissulaires permet de déterminer les valeurs de référence d'appartenance à une classe. Ces valeurs codées de manière discrètes sont regroupées dans un vecteur des labels de classe Y (variables dépendantes).

Chaque spectre mesuré comprend un nombre important de valeurs d'intensités (plusieurs centaines) ce qui entraîne des matrices de données de **très grande dimension** (plusieurs milliers de variables avec $p \gg n$). La **sélection** de l'information pertinente, des variables significatives voire explicatives ou des échantillons représentatifs permet de réduire la dimension du jeu de données spectrales initial, d'améliorer la performance ainsi que la robustesse des modèles et le cas échéant, de proposer une instrumentation scientifique simplifiée plus facilement transférable. L'application clinique de cette approche nécessite un algorithme adapté au diagnostic c'est-à-dire permettant de classer rapidement et précisément les données spectrales recueillies sur un tissu inconnu en référence à une base de données spectrales d'autres tissus de classes histopathologiques connues.

Le problème à résoudre est donc de **développer des méthodes de sélection** de variables spectrales discriminantes et de **classification** des individus (souvent plus de 2 classes) adaptées à la nature des données spectroscopiques recueillies (liées à l'instrumentation développée) afin d'optimiser les critères d'**efficacité** globale de la méthode de **diagnostic** (notamment la Sensibilité Se ¹² et la Spécificité Sp ¹³).

III.4.2 Applications et objectifs des travaux

L'**analyse qualitative** (discrimination et classification) est employée dans un grand nombre d'études en spectroscopie optique tissulaire et se déroule classiquement en plusieurs étapes.

La première phase consiste le plus souvent en l'**extraction** "empirique" d'indices de discrimination à partir de différences observées entre les spectres, tels que des valeurs absolues ou normalisées d'intensité ou d'aires sous courbe [63, 71], des ratios d'intensités ou d'aires [59, 17], des pentes[79], *etc.*. Ensuite, la plupart du temps, une étape de **réduction** de la dimension du jeu de caractéristiques extraites (sélection des variables les plus pertinentes) est implémentée, souvent à l'aide de méthodes factorielles de régression linéaire (Analyse en Composantes Principales ACP, Analyses Factorielles Discriminante AFD ou des Correspondances AFC). La troisième étape est une étape de **discrimination** et de **classification** appliquée au jeu de données sélectionnées. En connaissance de la classification histologique de référence des individus (échantillons), une classification de type supervisée est classiquement entreprise. Le principe consiste à développer un modèle de classification sur les échantillons d'un lot d'entraînement (apprentissage) et à évaluer les performances du modèle sur un lot de validation en comparant les valeurs prédites à celles de référence. La recherche d'une méthode de classification adaptée au problème posé s'effectue ensuite selon des critères de précision et de généralisation liés notamment aux règles de discrimination entre les classes et en particulier la linéarité ou non de la frontière construite (par exemple : Analyse Discriminante Linéaire ADL ou *Support Vector Machine* SVM, Réseaux de Neurones RNA). Par ailleurs, le choix de la méthode appropriée peut dépendre de la nature de la distribution de probabilité des caractéristiques : méthodes paramétriques (ADL) qui demandent des distributions normales ou méthodes non-paramétriques qui ne font pas d'hypothèse sur ces distributions (k plus proches voisins k -NN, SVM).

12. La sensibilité est la probabilité d'obtenir un résultat positif lorsque la maladie est réellement présente. Plus la méthode est sensible et plus le risque de non-détection d'une lésion est faible.

13. La spécificité est la probabilité d'obtenir un résultat négatif lorsque la maladie est réellement absente.

A titre d'exemple parmi les principales études visant à caractériser l'efficacité diagnostique des méthodes de spectroscopies de fluorescence et de diffusion élastique *in vivo*, Kamath *et al.* [56] ont obtenu des Se et Sp de 94.5 et 100% (4 caractéristiques extraites par spectre, ACP puis k -NN) et de 96.5 et 100% (RNA) [82] pour discriminer des tissus normaux, précancéreux et cancéreux de la cavité buccale (fluorescence seule), Lin *et al.* ont obtenu des Se et Sp de 94% et 97% (SVM linéaire), 95% et 99% (SVM non linéaire) à partir de 211 caractéristiques extraites par spectre de fluorescence de tissus sains et cancéreux de la région nasopharyngée [62]. L'étude menée par Georgakoudi *et al.* sur la classification (ACP et régression logistique) de tissus dysplasiques de bas grade et de haut grade à partir de données spectroscopiques en autofluorescence et en réflectance diffuse a montré que la combinaison des données issues des deux modalités améliore l'efficacité de diagnostic ($Se > 93\%$ et $Sp = 100\%$) [45].

Les objectifs de nos travaux concernent donc la recherche et le développement de méthodes :

- d'extraction de caractéristiques spectrales spécifiques aux spectres de réflectance diffuse et aux différents spectres d'émission de fluorescence en fonction des longueurs d'onde d'excitation correspondantes, voire à leur combinaison,
- de sélection de variables ou de combinaisons de variables discriminantes en essayant d'éliminer celles redondantes ou non-pertinentes, ce qui implique de choisir une estimation de la pertinence de ces variables et un algorithme d'optimisation.
- de discrimination / classification, en fonction de la nature des distributions des variables, de la précision et de la capacité de généralisation souhaitée.

III.4.3 Travaux réalisés et résultats obtenus

III.4.3.1 Etude *in vivo* sur la vessie de rats après instillation tumorale

III.4.3.1.1 Méthodes de pré-traitements des spectres d'intensité

Pour les **pré-traitements** essentiels mentionnés en B.III.2.2.2, nous avons développé et mis en œuvre les solutions particulières suivantes :

- l'amplitude moyenne du bruit de mesure (gaussien) qui affecte les spectres acquis a été diminuée d'un facteur 2 en moyennant 3 acquisitions successives.
- La méthode de lissage des spectres d'autofluorescence et de réflectance diffuse finalement retenue repose sur l'implémentation de filtres de lissage polynômiaux dont le degré et la dimension de fenêtre sont ajustés aux différents types de spectre.
- Pour les spectres de réflectance diffuse, la normalisation est effectuée par rapport à un spectre d'intensité acquis à une distance inter-fibre donnée sur un standard diffusant. Pour les spectres d'autofluorescence, la normalisation consiste en une mise à l'échelle par rapport à la surface sous courbe ou à l'intensité maximale [23].

III.4.3.1.2 Méthode d'extraction de caractéristiques

Le jeu de données initial est constitué de 99 individus (sites tissulaires) pré-classifiés par histologie en 3 groupes : 71 Sains (S), 18 Inflammatoires (I) et 18 Tumoraux (T). Dans le cadre de notre étude spectroscopique bimodale en mono-excitation de fluorescence, chaque individu est caractérisé par 12 spectres d'intensité colocalisés spatialement (1 AF et 1 DR à 6 distances inter-fibres D1-D6) correspondant à plus de 10000 variables d'amplitude par point du tissu.

L'observation des variations d'amplitude ou de forme des spectres moyens d'autofluorescence et de réflectance diffuse acquis sur tissus sains, inflammatoires et tumoraux de vessies de rats, nous a permis de définir et de calculer différents indices spectraux potentiellement utiles à la discrimination entre ces classes. Dans le cas de notre modèle animal, les spectres d'autofluores-

cence mesurés sont caractérisés par des variations d’amplitude liées aux pics d’absorption de l’hémoglobine dans la bande 525 - 575 nm. Globalement, les spectres d’auto fluorescence des tissus classés tumoraux possèdent un niveau d’intensité plus élevé que celui des tissus classés sains. Cinq caractéristiques ont ainsi été extraites (aires sous courbe, intensités de pics et rapports d’intensités) et après vérification de leur distribution normale par un test de comparaison de loi (test d’homogénéité du Khi-2), nous avons confirmé qu’elles permettaient de différencier significativement les tissus sains de ceux tumoraux (test-t paramétrique de Student-Fisher, $p < 0.05$). A partir de l’observation des spectres de réflectance diffuse, nous avons défini 9 autres caractéristiques (aires partielle et totale sous courbe, rapports de pics et d’aires, pentes) pour lesquelles des différences statistiques significatives sont obtenues entre tissus sains et tumoraux ou entre sains et inflammatoires.

Disposant des spectres d’auto fluorescence et de réflectance diffuse colocalisés pour chaque point mesuré des tissus, nous avons également cherché si les spectres d’auto fluorescence **intrinsèques** pouvaient nous fournir des paramètres discriminants complémentaires. Pour obtenir le spectre d’auto fluorescence intrinsèque $F_i(\lambda)$ à partir du spectre d’auto fluorescence mesuré $F_a(\lambda)$ et du spectre de réflectance diffuse $R_d(\lambda)$, nous avons utilisé l’approximation de premier ordre proposée par De Veld *et al.* [28] telle que :

$$F_i(\lambda) = \frac{F_a(\lambda)}{e^{-\mu_a(\lambda)l_f}} = \frac{F_a(\lambda)}{R_d(\lambda)^{k_p(\lambda)}} \quad (\text{III.10})$$

avec l_f le libre-parcours moyen d’auto fluorescence dans le tissu, $\mu_a(\lambda)$ son coefficient d’absorption et $k_p(\lambda)$ un coefficient de proportionnalité dont la valeur est calculée pour minimiser les ondulations d’amplitude du spectre d’auto fluorescence intrinsèque dans la bande 550-650 nm (pics d’absorption de l’hémoglobine).

Pour les distance inter-fibres de 271 et 528 μm , les valeurs de k_p obtenues sont de 0.86 pour les tissus sains et de 0.97 pour les tissus tumoraux. Tout se passe comme si les photons de fluorescence, dans un tissus tumoral, parcouraient un chemin relativement plus long, ce qui est cohérent avec un épaississement pariétal de l’organe.

Nous avons observé que l’intensité globale des spectres de fluorescence intrinsèque ainsi modélisés est plus faible pour les tissus tumoraux que pour les tissus inflammatoires, elle-même plus faible que pour les tissus sains, et retrouvé en cela une cohérence avec les spectres d’auto fluorescence acquis *in vivo* sur vessie non incisée. Deux derniers paramètres ont finalement été définis (coefficient de proportionnalité et aire totale sous courbe) et leur pouvoir discriminant entre les différents types de tissus validé par test paramétrique [CI22, CI22].

III.4.3.1.3 Discrimination et classification hiérarchique

A l’issue de l’étape précédente, nous disposions d’un jeu de 15 caractéristiques spectrales (variables explicatives) extraites des spectres d’intensité d’auto fluorescence mesurée et intrinsèque et de réflectance diffuse. La classification finale a porté sur un ensemble de 71 sites sains, 10 sites inflammatoires et 18 sites tumoraux ainsi définis par l’analyse histologique. Nous avons cherché à comparer les performances de classification obtenues à partir des sous-ensembles de caractéristiques spécifiques à chaque modalités, de la totalité du jeu de caractéristiques et d’un sous-ensemble des 5 caractéristiques les plus discriminantes issues des tests statistiques.

Afin de construire un espace de représentation pertinent (variables ou axes décorrélés, redondances supprimées), nous avons procédé à une ACP et retenu un nombre de premières composantes principales expliquant au moins 90% de la variance totale du jeu initial. Les données spectrales ainsi condensées par l’ACP nous ont servi de base pour une classification non supervisée hiérarchique de type ascendante (agrégation de groupes d’observations ou “clusters”) [60].

Dans l'espace Euclidien défini par les axes fournis par l'ACP, nous avons choisi une mesure de distance entre clusters $D_{ij,Ward}$ utilisant le critère de Ward. Ce dernier permet d'associer les clusters en diminuant le moins possible l'inertie inter-groupes (i.e. augmentant l'inertie intra-classe) tel que :

$$D_{ij,Ward} = \frac{n_i n_j}{n_i + n_j} d^2(\mu_i, \mu_j) \quad (\text{III.11})$$

avec n_i, μ_i et n_j, μ_j le nombre de points et le barycentre des groupes i et j respectivement, et $d(\mu_i, \mu_j)$ la distance entre les centres de gravité.

Les différents résultats obtenus (cf. [Th8] et [CI22, CI22]) nous ont permis de montrer que la combinaison de caractéristiques spectrales choisies des spectres d'autofluorescence (excitation à 410 nm), de réflectance diffuse (440 - 800 nm) et de fluorescence intrinsèque, améliore significativement l'efficacité de la méthode de classification avec des critères de pourcentage de bien classés Se et Sp respectivement de 89% et 93% (ACP sur la totalité des caractéristiques extraites) pour discriminer tissus sains et tumoraux. Compte tenu de l'originalité du modèle expérimental animal utilisé, une comparaison avec les résultats des études publiées de spectroscopie de réflectance diffuse et d'autofluorescence sur vessie humaine est délicate. Les meilleures valeurs de sensibilité et spécificité ont été obtenues par Mourant *et al.* pour la détection de carcinomes à partir du calcul de la pente entre 330 et 370 nm de spectres de réflectance diffuse recueillis sur 10 patients ($Se = 100\%$) et par Koenig *et al.* à partir des caractéristiques spectrales d'autofluorescence (excitation à 337 nm) pour la détection de tumeurs chez 75 patients ($Sp = 98\%$) [59]. Bien qu'inférieurs, nos résultats originaux montrent qu'en se limitant à l'exploitation d'informations spectrales dans la bande 400-800 nm (bande de transmission classique de la cystoscopie conventionnelle), il est toute fois possible d'atteindre une très bonne efficacité pour le diagnostic *in vivo* de lésions cancéreuses de la vessie.

III.4.3.2 Etude *in vivo* sur la peau de souris UV-irradiées

III.4.3.2.1 Pré-traitements complémentaires des spectres d'intensité

L'algorithme de pré-traitement des spectres bruts acquis se compose des mêmes étapes que celui pour l'étude sur les vessies de rats (cf. §B.III.4.3.1) avec les solutions complémentaires suivantes :

- Pour les spectres d'autofluorescence, la normalisation comprend une division par les mesures de puissance quotidiennes (pour tenir compte des variations d'intensités de la source lumineuse au cours du temps) puis une mise à l'échelle par rapport à la surface sous courbe ou à l'intensité maximale [23].
- deux méthodes de détection et de suppression automatique des pics parasites ont été développées et appliquées : l'une exploite les variations de la variance du signal en fonction de la longueur d'onde (cf. [RI18] consultable en page 235) et l'autre utilise le principe du filtre médian après sous-échantillonnage du spectre d'intensité.

III.4.3.2.2 Méthode d'extraction et de sélection de caractéristiques

Le jeu de données initiales est constitué de 252 individus (sites tissulaires) pré-classifiés par histologie en 4 groupes : 84 S, 47 HC, 57 HA et 57 D (cf. §B.III.2.3 page 64). Dans le cadre de notre étude spectroscopique bimodale, chaque individu est caractérisé par 24 spectres d'intensité colocalisés spatialement (7 AF et 1 DR à 3 distances inter-fibres D1-D3) correspondant à plus de 20000 variables d'amplitude par point.

A partir de la recherche visuelle de différences d'amplitude et de forme dans les spectres d'intensité d'autofluorescence (pour les différentes longueurs d'onde d'excitation) et dans les spectres de réflectance diffuse, entre les 4 catégories de tissus définis, nous avons extrait en moyenne une trentaine de caractéristiques par spectre (amplitudes, aires globales et locales, ratios, pente, etc.) soit au total 254 caractéristiques x 3 distances inter-fibres par point.

Un premier test de normalité de Lilliefors appliqué à toutes les variables extraites nous a permis de conserver celles caractérisées par une distribution normale. Nous avons ensuite appliqué un second test paramétrique de comparaison au seuil de 5% (test-t de Student) de chaque variable conservée individuellement afin de sélectionner des sous-ensembles de caractéristiques qui discriminent de façon significative chacune des 6 paires de classes. Nous avons cherché à évaluer la précision de la méthode de classification diagnostique en testant 3 sous-groupes de caractéristiques discriminant au moins 4, 5 ou 6 paires de classes (soient 13, 186 et 306 variables spectrales respectivement, en bi-modalités et pour les 3 distances inter-fibres ensemble), et les différentes combinaisons des 3 distances inter-fibres. Une ACP est alors effectuée pour réduire la dimension des jeux de données et fournir des axes de caractéristiques décorrélés avant la classification.

III.4.3.2.3 Classification supervisée

Sur la base des résultats de la classification histologique de référence (groupes S, HC, HA et D), une classification **supervisée** des caractéristiques spectrales est réalisée en recherchant les meilleures séparations linéaires entre chacune des paires de classes. Malgré la grande dimension de l'espace des paramètres, une approche de séparation linéaire (recherche d'un hyperplan) est privilégiée dans cette étude car potentiellement plus généralisable et plus simple (nombre limité de paramètres à régler) que les méthodes non-linéaires.

Parmi les algorithmes de classification linéaire les plus courants, nous nous intéressons plus particulièrement à l'ADL de Fisher, au classifieur k -NN et aux SVM. L'ADL de Fisher vise à définir un hyperplan de séparation entre groupes de données projetées dans un espace de représentation (ensemble d'axes ou fonctions discriminantes linéaires) qui maximise le rapport des variances inter- et intra-classes garantissant ainsi une séparabilité maximale. Cette méthode requiert un jeu de données distribuées normalement. Couramment utilisée dans un grand nombre d'application, elle est notamment mise en œuvre pour la classification de tissus sains et tumoraux à partir de caractéristiques spectroscopiques d'autofluorescence sur la peau [32, 39], le cerveau [19], l'œsophage [91], de réflectance diffuse sur le colon [43] ou des deux modalités sur la cavité buccale ou les bronches [28, 10] par exemple. La classification k -NN est une méthode simple donnant de bons résultats avec des distributions de population normales ou non. Elle est basée sur l'apprentissage par analogie tel que, connaissant un jeu de données classées de référence, chaque nouvelle donnée est classée dans le groupe qui possède le plus grand nombre de plus proches voisins parmi k dans l'espace de représentation. Bien que largement exploitée dans de nombreuses applications, la méthode des k -NN a été globalement peu mise en œuvre pour la classification de tissus cancéreux par spectroscopie *in vivo* fibrée [57]. La principale difficulté réside dans le choix du nombre de k plus proches voisins adapté au problème traité. Nous avons donc calculé les performances de l'algorithme de classification développé pour différentes valeurs de k afin de déterminer un ensemble de valeurs optimales. Comme pour l'ADL, la classification par SVM linéaire consiste à rechercher un hyperplan de séparation optimale des données mais en maximisant un critère de marge entre les classes. Cette marge correspond à la distance entre les hyperplans parallèles qui contiennent les échantillons en bordure de chaque classe. Cette méthode non paramétrique fournit une classification efficace sur des jeux d'entraînement avec un nombre réduit d'individus. Elle est fréquemment employée dans les applications de spectroscopie optique

en cancérologie [62, 16, 70].

L'efficacité de chaque méthode de classification a été évaluée pour chacune des 6 paires de groupes histologiques (S *vs* HC, S *vs* HA, S *vs* D, HC *vs* HA, HC *vs* D, HA *vs* D). La mesure de la qualité de chacune des méthodes de classification appliquées à nos données spectrales est effectuée par une méthode hybride d'échantillon test et de validation croisée originale qui permet de calculer des valeurs moyennes de pourcentage d'individus bien classés entre chaque paire de classes (Se et Sp), plus représentatives des variations liées au choix arbitraire des individus constitutifs des jeux de base (ou d'entraînement) et de validation (ou test). On effectue un sondage par stratification dans l'ensemble des classes proportionnellement au nombre d'individus dans chaque échantillon afin de constituer un jeu de base (66%) et un jeu de validation (34%). Les individus du jeu de base servent à calculer les paramètres de la méthode de classification que l'on applique ensuite au jeu de validation pour calculer les valeurs de Se et de Sp . Puis, on réitère le tirage aléatoire de nouveaux jeux de base et test tant que les valeurs moyennes de Se et Sp calculées sur tous les jeux de validation varient de plus de 5% d'un tirage à l'autre (100 itérations dans notre cas).

Nous avons évalué les performances de classification des trois méthodes choisies en recherchant le nombre optimal de composantes principales (CP) représentant jusqu'à 95 ou 99% de la variance totale des données, et pour différentes combinaisons du nombre de plus proches voisins pour la méthode k -NN.

Les résultats originaux publiés dans [RI16] (en version intégrale page 207) ont permis de comparer les performances de classification en utilisant chaque excitation de fluorescence individuellement, la combinaison des 7 excitations, la réflectance diffuse seule et la combinaison de l'ensemble. En mono-excitation de fluorescence, les longueurs d'onde d'excitation supérieures à 380 nm permettent d'obtenir les Se les plus élevées pour différencier la classe HC des autres classes (S, HA et D) mais les plus faibles (environ 50%) pour discriminer S et HA (toutes les deux présentent une couche de kératine normale). En multi-excitations, bien que restant inférieure à 90%, la sensibilité est systématiquement améliorée pour toutes les paires de classes (+7% en moyenne) ce qui n'est pas le cas pour la spécificité. Celle-ci est supérieure à 95% pour discriminer la peau saine des autres classes mais chute fortement dans la différenciation des hyperplasies entre elles (76%, 75% et 41%). La classification à partir des données de réflectance diffuse est nettement plus sensible pour différencier HC et HA des autres classes (de 65 à 95%) que pour différencier S du reste (moins de 70%). Au final les meilleures Se sont obtenues en multi-excitations plutôt qu'en réflectance diffuse et des valeurs comparables de Sp sont obtenues pour les deux modalités qui permettent de mieux classer les tissus hyperplasiques par rapport aux tissus sains que les tissus HC, HA et D entre eux. La moins bonne performance est obtenue pour la classification des individus AH et D avec un Sp inférieure à 50% pour les deux modalités individuellement. Par contre, le couplage de ces deux modalités permet d'obtenir des résultats nettement plus élevés de Sp (+5 à 15% environ) pour la classification des groupes hyperplasiques entre eux et des résultats comparables à la modalité de multi-excitations seule pour toutes les autres paires de classes comparées. Ces résultats confirment et complètent ceux publiés notamment par Diagaradjane *et al.* en multi-excitations sur la peau [32] et par Chang *et al.* en spectroscopie bimodale sur le col de l'utérus [25].

Les résultats originaux publiés dans [RI18] (en version intégrale page 235) ont permis de montrer l'amélioration apportée à la performance de la classification spectroscopique en fonction des méthodes implémentées, du nombre de CP, des valeurs de k et aussi des distances inter-fibres et de leurs combinaisons. Nous avons limité ces comparaisons aux jeux de données discriminant 6 et 5 paires de classes (13 et 186 caractéristiques maximum respectivement) car aucune amélioration significative n'a été observée en utilisant un jeu de caractéristiques plus étendu.

Quelque soit l'algorithme de classification utilisé, des valeurs moyennes très élevées de Se et Sp (proches de ou égales à 100%) sont obtenues avec le jeu de 13 caractéristiques combinant les 3 distances inter-fibres, pour différencier HC des autres catégories S, HA et D. Les valeurs de Se et Sp pour discriminer S de HA et D augmentent sensiblement ($Se < 90\%$ et $Sp \approx 100\%$) lorsque l'on combine les caractéristiques spectrales liées aux 3 distances inter-fibres, la sensibilité la plus élevée étant donnée par la méthode SVM. La classification AH *vs* D reste la plus difficile avec une valeur optimale de $Se \approx 65\%$ pour une combinaison de distances D2D3 et une valeur maximum de $Sp < 80\%$ pour la distance D1 seule, obtenues avec la méthode k -NN. Ainsi, à l'exception de la classification HA *vs* D, la combinaison des caractéristiques (discriminant les 6 paires de classes) aux 3 distances inter-fibres fournit les performances les plus élevées. La méthode SVM semble mieux adaptée pour différencier les tissus sains des autres hyperplasiques tandis que la méthode k -NN se révèle plus efficace pour différencier HA de D en utilisant les compositions avec la plus grande distance inter-fibres ou D de HA en utilisant la distance D1 seule.

Les résultats obtenus à partir du jeu étendu de caractéristiques discriminant au moins 5 paires de classes parmi 6 montrent une amélioration supplémentaire des performances de classification. La classification des individus HC est systématiquement maximale (proche ou égale à 100%) en utilisant les trois distances inter-fibres et quelque soit la méthode de classification. Les valeurs maximales de Se et Sp pour discriminer S de HA et D sont significativement améliorées ($Se > 95\%$ et $Sp \approx 100\%$) pour les combinaisons des distances incluant la plus proche (D1) et en utilisant plus particulièrement les méthodes ADL et SVM. La classification HA *vs* D est globalement améliorée avec une sensibilité plus forte pour chaque distance individuellement. Si les valeurs maximum atteintes pour Se (65% obtenue pour la combinaison des 3 distances et avec l'algorithme ADL) et pour Sp (80% en combinant les distances les plus grandes et avec la méthode k -NN) n'augmentent pas significativement, les résultats sont par contre globalement plus équilibrés quelque soit les distances inter-fibres.

Dans l'ensemble, les performances de classification sont maximales pour toutes les paires de classes (à l'exception de HA *vs* D) lorsque l'on utilise la combinaison des 3 distances inter-fibres, un nombre de CP représentant 90 à 95% de la variance expliquée du jeu de caractéristiques étendu et les méthodes ADL et SVM. La différenciation HA *vs* D reste la plus difficile à améliorer avec des Se et Sp inférieures ou égales à 70 et 80% obtenues grâce à la méthode k -NN.

III.5 Conclusion et perspectives

La spectroscopie optique fibrée permettant de mesurer les spectres d'intensité de lumière émis en diffusion et en autofluorescence par les tissus biologiques constitue un outil sensible de **caractérisation *in vivo***. Associée à des algorithmes adaptés de pré-traitement des signaux, d'**extraction** et de **classification** de caractéristiques spectrales ainsi que de **modélisation** des interactions lumière-tissus, l'ensemble de la méthode permet de fournir une classification **efficace** d'états sains et hyperplasiques de tissus de façon non invasive.

Après plusieurs étapes successives de développements, réalisations et validations d'instrumentations échelonnées de 2003 à 2008, nous disposons aujourd'hui d'un **système** entièrement automatique de spectroscopie fibrée **bimodale** en diffusion élastique et multiple excitations d'autofluorescence, résolue **spatialement**. Outre la recherche continue de nouvelles solutions pour améliorer les performances **métrologiques** du système (puissance, durée de mesure, sensibilité, répétabilité, reproductibilité), la poursuite du développement instrumental concerne prioritairement son **applicabilité** à la peau humaine dans le cadre d'un projet de recherche en environnement clinique. Afin de transformer le système actuel en un dispositif transportable compatible

avec une utilisation en clinique, une sous-traitance industrielle est en cours qui devrait permettre d'envisager un projet de recherche de type clinique impliquant les médecins et dermatologues du CAV.

Les travaux réalisés en modélisation des interactions lumière-tissus [RI15] nous ont permis de valider un algorithme original de **simulation** statistique tenant compte des caractéristiques spectrales de plusieurs **fluorophores** présents dans le milieu. Néanmoins, les temps d'exécution de certaines simulations complexes restent encore très élevés avec la méthode proposée et ces travaux devraient être poursuivis par exemple par le développement d'approches **hybrides** comme proposées par quelques équipes.

Nous avons également développé et validé plusieurs solutions **méthodologiques** visant à optimiser l'**exploitabilité** des signaux spectroscopiques acquis, l'**extraction** et la **sélection** d'ensembles de **caractéristiques spectrales discriminantes** et la **classification** d'échantillons tissulaires en catégories histologiques définies [RI16, RI13, RI14, RI18]. Ces travaux doivent être poursuivis en envisageant par exemple l'utilisation de techniques de reconnaissance de forme pour exploiter le contenu informatif des spectres entiers, l'exploitation de critères de mesure de dépendances non linéaires entre les données (classification non linéaire), ou encore le développement de méthodes itératives optimisant le choix des caractéristiques discriminantes vis-à-vis des critères de classification finaux (cf. partie prospective B.IV page 81).

Chapitre IV

Projet de recherche : Prospective

LE projet de recherche présenté dans ce manuscrit s’inscrit dans une démarche globale de développement et de validation de méthodes de spectro-imagerie optique pour la **caractérisation *in vivo* de tissus biologiques**, dont les enjeux et les intérêts en **cancérologie** ont été rappelés au §B.I.1, page 37. Les objectifs applicatifs de ces travaux de recherche en photo-diagnostic ciblent prioritairement les cancers de la vessie et de la peau. Compte tenu de l’état d’avancement de nos travaux actuels, nous proposons les 3 directions de recherche complémentaires suivantes (détaillées dans les 2 sections ci-après) :

- la **détection et la localisation** de modifications tissulaires à l’échelle **macroscopique** (“imagerie”)
- l’**identification de classes histologiques et spectroscopiques** de tissus (“spectroscopie”)
- la **caractérisation optique tissulaire** (“biopsie optique”)

A terme, le couplage des méthodes d’imagerie et de spectroscopie développées vise à améliorer les performances de la procédure de diagnostic clinique dans son ensemble par une approche “multi-échelles” plus efficace.

La recherche en spectro-imagerie optique de diagnostic est une **entreprise inter-, pluri- et trans-disciplinaire** dont le succès repose sur la mise en commun de **compétences** scientifiques, techniques et médicales **complémentaires**. De fait, notre projet de recherche s’appuie sur un **réseau de collaborations** existantes et en cours de développement principalement au niveau interne (intra- et inter-Groupes Thématiques), local (autres laboratoires de Nancy) et national. Ce projet s’inscrit en particulier **dans le prolongement** d’une collaboration forte depuis plus de 12 ans entre les chercheurs du GT IPS du CRAN, des cliniciens et biologistes du Centre Régional de Lutte Contre Le Cancer de Nancy (CAV - Centre Alexis Vautrin) et des chercheurs du laboratoire de Biophysique Moléculaire Cellulaire et Tissulaire (BioMoCeTi - UMR CNRS 7033, ex-LPBC) de l’Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. L’**équipe du CRAN** apporte ses connaissances en **acquisition et traitement du signal** et de l’**image** et son expérience dans la mise en oeuvre des méthodes associées, appliquées aux problématiques médicales et cliniques. Elle y joint sa maîtrise du développement de **systèmes** automatisés d’**instrumentation scientifique** exploitant la fluorescence et la diffusion élastique, ainsi que ses compétences en **analyse des données** de nature spatiale (imagerie), spectrale (spectroscopie) ou combinée (imagerie multispectrale, spectroscopie multi-modale). Grâce à l’intégration d’une équipe de **biologistes** au sein du GT IPS (actée au contrat quadriennal 2005-2008 du laboratoire), l’équipe possède également les compétences et le savoir-faire nécessaires en biologie **cellulaire** et **expérimentation animale** dans le domaine de la **photobiologie** ainsi que dans l’utilisation de molécules

photo-activables. L'**équipe clinique du CAV** (sous la direction de François Guillemin) apporte ses compétences dans le domaine de la pratique clinique et de la **validation *in situ*** des systèmes développés. Elle propose des champs d'application pour le transfert clinique en pathologie cancéreuse et dispose des moyens pour approfondir le cas échéant la recherche par une ouverture biologique fondamentale. La connaissance du contexte clinique permet une bonne adaptation de l'instrumentation aux contraintes imposées par le patient et le médecin. L'**équipe du BioMoCeTi** (coordonnée par Geneviève Bourg-Heckly) apporte ses compétences en **spectroscopie de fluorescence** cellulaire et tissulaire et son expérience en **optique instrumentale** destinée à la clinique. Elle y joint sa maîtrise des techniques de culture cellulaire et des différentes méthodes spectroscopiques et microscopiques mises en oeuvre au laboratoire (notamment microspectrofluorimétrie confocale). Les travaux menés dans le cadre de notre **collaboration CRAN-BioMoCeTi-CAV** ont été soutenus financièrement à 4 reprises par le CNRS et les instances universitaires et régionales : projet "Imagerie du vivant" en 1999-2000, JemSTIC "Imagerie de fluorescence et spectroscopie dans le proche infrarouge (Biopsie Optique)" en 2001-2002, ATIP Jeunes chercheurs "Développements et applications en Spectro-Imagerie de Diagnostic *in vivo* du Cancer" en 2005, et BQR UHP-Région 2006 Projets émergents, jeunes chercheurs "Photodiagnostic *in vivo* : développements et applications en spectro-imagerie". Les nombreuses publications communes CRAN-BioMoCeTi-CAV en congrès et revues nationales et internationales [] attestent de la **synergie** créée et de la **dynamique féconde** de cette collaboration.

IV.1 Imagerie panoramique cystoscopique

IV.1.1 Orientations des travaux

Cet axe propose de poursuivre une partie des travaux de l'action 1 (cf. A.II.2.2.2.1 page 17) motivés et détaillés au §B.II et qui nous ont permis de valider la construction automatique d'images panoramiques partielles de vessies et la superposition spatiale d'images panoramiques formées en lumière blanche et en fluorescence. Le **concept** est **original** et son **intérêt diagnostique** potentiel réel mais deux aspects sont néanmoins à considérer.

D'une part, la construction d'images panoramiques de **vessies quasi-entières en lumière blanche** permet d'envisager de nouvelles formes de **visualisation** plus pratiques et plus informatives pour le clinicien (support unique avec localisation précise des sites d'intérêt repérés, données quantitatives de distribution spatiale des lésions). Dans le cadre du diagnostic et du suivi thérapeutique des cancers urothéliaux, l'outil développé pourrait à moyen terme être proposée en **cystoscopie standard**, avec en perspective par exemple une étude tout à fait originale pour caractériser leur **multi-focalité** à l'aide d'**indices spatiaux précis** et **objectifs**.

Actuellement, une partie de nos travaux est donc consacrée à poursuivre le développement de solutions **optimisées** de **recalage 2D** et de mosaïquage d'images de vessies (sélection dynamique, prédiction) compatibles avec les contraintes cliniques fixées (temps de réponse, surface entière de vessie à mosaïquer). **A moyen terme**, nous envisageons également de poursuivre le développement de solutions de **représentation** (visualisation) **3D** en cherchant notamment à effectuer un recalage 3D des images à l'aide d'informations de profondeur complémentaires dont les modalités d'acquisitions au moyen de systèmes cystoscopiques standards sont en cours d'étude. **A plus long terme** enfin, le développement de solutions techniques et méthodologiques pour atteindre un recalage des images en **temps réel** permet d'envisager de nouvelles possibilités de visualisation endoscopique augmentée par exemple par la localisation en temps réel de la fenêtre d'observation endoscopique dans la carte globale de l'organe réalisée.

D'autre part, un système **d'acquisition simultanée des images en lumière blanche et**

TABLE IV.1 – Organisation (non contractuelle) des contributions collaboratives aux problématiques générales (non exhaustives) de l’axe imagerie panoramique cystoscopique

Collaborations/Partenariats	Problématiques générales		
	Instrumentation, expérimentation	Recalage, mosaïquage	Clinique, médical
Participants du GT IPS			
Walter Blondel	×	×	
Christian Daul	×	×	
Didier Wolf		×	
François Guillemin	×		×
Participants du GT IRIS (CRAN)			
Charles Soussen		×	
Collaborations inter-laboratoires			
Geneviève Bourg-Heckly, BioMoCeTi, Paris	×		
Philippe Peltié, CEA-LETI, Grenoble	×		
Collaborations en cours de développement			
Michael de Mathelin, Christophe Doignon, Pierre Graebing, LSIT, Strasbourg	×		

en autofluorescence permet d’envisager de nouvelles perspectives de visualisation des données spatiales et spectrales en cystoscopie de fluorescence. Or, bien que validé en laboratoire, le prototype actuel (projet de collaboration BioMoCeTi-CRAN-LETI) reste d’une dimension incompatible avec une utilisation en clinique et un nouveau développement instrumental dépend fortement de nos moyens internes actuellement limités en ingénierie. Par ailleurs, bien que nos travaux se concentrent prioritairement sur des approches totalement non-invasives (c’est-à-dire n’utilisant pas notamment de marqueurs exogènes fluorescents), le système d’imagerie endoscopique panoramique pourrait avantageusement être appliqué en **cystoscopie de fluorescence induite**.

Les méthodes de recalage et de mosaïquage développées l’ont été en fonction des caractéristiques particulières des images de **vessie**. Une autre perspective à moyen terme serait donc **d’étendre l’application** du principe de construction d’images panoramiques à la détection et à la localisation de lésions **cutanées**. Cette approche **originale** sur la peau permettrait là aussi d’envisager à plus long terme le couplage **imagerie-spectroscopie** répondant au problème d’échelle de **localisation-identification** de lésions.

IV.1.2 Organisation, collaborations et moyens

Le tableau IV.1 présente l’organisation actuelle (non contractuelle) de l’équipe constituée autour de cet axe de recherche en indiquant les problématiques générales auxquelles les différents participants apportent leur(s) contribution(s). Pour l’instant, la poursuite des travaux mentionnés ci-avant s’effectue dans le cadre d’une thèse débutée en octobre 2007. Au stade actuel, pour pouvoir poursuivre efficacement cet axe de recherche dans une perspective de transfert en clinique, l’intégration de nos développements **logiciels** (implémentation des algorithmes de recalage et mosaïquage au travers d’une interface d’utilisation pour les médecins) et **matériels** (dispositif multi-spectral) est indispensable. Pour ce faire, l’association d’un **partenaire industriel** (préférentiellement du domaine de l’endoscopie) semble difficilement contournable. La prise en charge des aspects techniques et opérationnels de ces activités (programmation informatique, gestion

d'un partenariat industriel) passe par l'obtention contractuelle voire le redéploiement en interne (CRAN, université) de moyens humains supplémentaires en **ingénierie scientifique** (ingénieur d'étude ou de recherche).

IV.2 Spectroscopie optique multi-modalités *in vivo*

IV.2.1 Orientations des travaux

Cet axe propose de poursuivre les travaux de l'action 3 (cf. A.II.2.2.2.3 page 21) motivés et détaillés au §B.III et qui nous ont permis de développer et de valider des **techniques** et des **méthodes** de **caractérisation** et de **classification tissulaire** par spectroscopie bimodale en diffusion élastique et multiple excitation de fluorescence résolue spatialement, mises en œuvre dans plusieurs **études *in vivo*** sur les tissus sains, précancéreux et cancéreux de la **vessie** et de la **peau**. L'intérêt de coupler plusieurs modalités spectroscopiques différentes et complémentaires a été démontré par quelques équipes, dont la nôtre, pour l'amélioration des performances d'identification et de classification des tissus *in vivo*. **Les recherches dans ce domaine** sont en plein essor et une demi-douzaine d'équipes internationales se sont d'ailleurs engagées au cours de ces dernières années dans des phases d'essais et de validation en clinique (cavité buccale, bronches, col de l'utérus, peau et vessie principalement).

Dans cet objectif applicatif, le **premier enjeu** concerne donc le développement de systèmes d'instrumentation spectroscopique et de **mesures physiques multi-modalités** compatibles avec une utilisation sur l'homme. Les résultats obtenus à l'issue de deux études précliniques nous ont permis de qualifier notre dispositif actuel sur l'animal. A très **court terme**, il nous faut donc poursuivre l'adaptation et l'optimisation de cette instrumentation scientifique (en tenant compte par exemple du compromis entre durée de mesure disponible et quantité d'information à exploiter, de l'organe visé, *etc.*) pour un transfert en **clinique**. Comme mentionné précédemment, nos moyens internes limités en ingénierie et l'intérêt potentiel de la technique pour d'autres applications nous amènent à envisager une sous-traitance industrielle voire un partenariat pour pouvoir poursuivre plus rapidement.

Le **second enjeu** est relatif à **l'exploitation des mesures** fournies par les dispositifs multimodaux mis en œuvre vers deux objectifs complémentaires mais impliquant de résoudre des problèmes de natures un peu différentes :

l'identification de classes histologiques et spectroscopiques de tissus

Il s'agit de concevoir et d'appliquer des méthodes adaptées d'**extraction**, de **sélection** et de **classification** de **données spectroscopiques multi-dimensionnelles**, la plupart du temps en les confrontant aux données histologiques de **référence**. En spectroscopie optique UV-visible, la majorité de ces travaux cherche traditionnellement à exploiter certaines caractéristiques spectrales possédant une "**significativité**" particulière pour former des ensembles de critères discriminants. Certains efforts récents se consacrent à l'utilisation de techniques de reconnaissance de forme pour exploiter le contenu informatif des **spectres entiers** ou de **fenêtres** spectrales adaptatives afin d'extraire de "meilleures" caractéristiques de diagnostic et les utiliser pour classer plus précisément les tissus dans les catégories histopathologiques correspondantes. Nos travaux actuels dans ce domaine s'inscrivent dans cette démarche qu'il faut poursuivre et développer en particulier pour améliorer les performances de classification des états **hyperplasiques** de types bénin et malin "proches". **A court terme** également, nous proposons d'orienter nos recherches vers l'exploitation de critères **statistiques** (non linéaires) de mesure des **dépendances** (par exemple l'IM) entre les variables spectroscopiques et celles à prédire (classes histologiques

TABLE IV.2 – Organisation (non contractuelle) des contributions collaboratives aux problématiques générales (non exhaustives) de l’axe spectroscopie multimodale

Collaborations/Partenariats	Problématiques générales			
	Instrumentation, expérimentation	Simulation, modélisation	Extraction, classification	Biologie, clinique
Participants du GT IPS				
Walter Blondel	×	×	×	
François Guillemin				×
Frédéric Marchal				×
Marie-Ange D’Hallewin				×
Participants du GT IRIS (CRAN)				
David Brie (phase initiale)			×	
José Ragot, Gilles Mourot (phase initiale)			×	
Collaborations inter-laboratoires				
Geneviève Bourg-Heckly, BioMoCeTi, Paris	×			
Samy Tindel, IECN, Nancy		×	×	
Agnès Leroux, CAV, Nancy				×
Collaborations en cours de développement				
Florence Granel-Brocard, CHU, Nancy				×

d’appartenance), comme une étape préliminaire de sélection. L’avantage est ensuite de pouvoir réaliser n’importe quel type de régression ou de modèle pour la classification.

la caractérisation optique tissulaire

La **signification physique** des informations issues des mesures en spectroscopie de réflectance multimodale est difficile à interpréter du fait de l’influence combinée des phénomènes d’absorption, de diffusion et de fluorescence. **Quantifier leur contribution respective** permet en principe d’extraire les propriétés structurelles et physiques des tissus et d’accéder ainsi aux mécanismes sous-jacents utiles au diagnostic. Les travaux actuels les plus récents visent ainsi à développer des méthodes d’**identification des propriétés optiques** des tissus à partir des mesures spectroscopiques de surface. Mais les méthodes à développer pour résoudre ce problème inverse dépendent du type de **modèle** (analytique, numérique, simple ou hybride) utilisé pour décrire le problème direct et notamment de ses performances en termes de précision et de temps de calcul. Ainsi à court et moyen terme, des travaux importants restent à poursuivre dans cette voie, sur la base des résultats déjà obtenus pour notre algorithme de simulation en multiple fluorescence. A moyen terme également, ces approches de modélisation doivent nous donner les moyens de progresser d’une analyse “**descriptive**” vers une analyse “**cognitive**” en collaboration avec les photobiologistes. Un autre aspect **très original** de nos travaux à poursuivre concerne la caractérisation de tissus biologiques **déformables** comme la peau et la vessie en établissant notamment des relations entre certaines de leurs propriétés mécaniques et optiques.

IV.2.2 Organisation, collaborations et moyens

Le tableau IV.2 présente l’organisation actuelle (non contractuelle) de l’équipe constituée autour de cet axe de recherche en indiquant les problématiques générales auxquelles les différents participants apportent leur(s) contribution(s).

Pour l'instant, la poursuite des travaux mentionnés ci-avant s'effectue dans le cadre d'une thèse débutée en septembre 2008. Au stade actuel, pour pouvoir poursuivre efficacement cet axe de recherche dans une perspective de transfert en clinique, l'intégration de nos développements **logiciels** (implémentation des algorithmes de simulation statistique et de modélisation expérimentale, parallélisation des calculs, interface utilisateur versatile) et **matériels** (dispositif de spectroscopie fibrée bimodale résolue spatialement) est indispensable. Pour ce faire, l'association d'un **industriel** (sous-traitance, partenariat) semble difficilement contournable. Comme pour les travaux de l'axe imagerie, la prise en charge des aspects techniques et opérationnels de ces activités (programmation informatique, instrumentation, gestion d'un partenariat industriel) passe par l'obtention contractuelle voire le redéploiement en interne (CRAN, université) de moyens humains supplémentaires en **ingénierie scientifique** (ingénieur d'étude ou de recherche).

Enfin, bien que nos travaux se concentrent prioritairement sur des approches totalement non-invasives (c'est-à-dire n'utilisant pas notamment de marqueurs exogènes fluorescents), nous explorons également sur le plus long terme l'implémentation originale en spectroscopie fibrée de la **technique de gap-FRAP** (cf. action 3 au §A.II.2.2.2.3 page 21) voire son couplage complémentaire dans l'approche multimodale déjà engagée.

IV.3 Cadre de développement des activités et positionnement du projet de recherche

IV.3.1 Recherche en Cancérologie

Le bilan du **plan Cancer 2003-2007** réalisé par L'INCa (Institut National du Cancer) en juin 2008 indique que la **région Lorraine** est classée au quatrième rang en ce qui concerne la surmortalité par cancer [36]. La mortalité prématurée est significativement supérieure à la moyenne nationale (en 2002, on dénombre 80 décès dus aux cancers cutanés et presque 200 dus au cancer de la vessie, le plus grand nombre étant observé pour les cancers trachée – bronches – poumon avec plus de 1000 décès). Les tumeurs représentent la deuxième cause de décès dans la région. Dans ce contexte, la lutte contre le cancer est et reste une **priorité**. Le réseau régional de cancérologie ONCOLOR agréé en 1998 intègre 53 établissements de santé, répartis sur les quatre départements, regroupant les secteurs public et privé prenant en charge des patients atteints de cancer.

Les principales orientations "Recherche" de ce plan de mobilisation nationale ont permis notamment la structuration de la recherche en cancérologie (émergence des **cancéropôles**), une meilleure coordination de la recherche clinique, la structuration de 22 réseaux régionaux de tumorothonèques hospitalières ainsi que le renforcement de la **recherche de transfert** (appels à projets libres et thématiques, programmes transversaux, recherche translationnelle). Les Cancéropôles assurent entre autres le relais des AAP (Appels A Projets) financées par l'INCa ou par d'autres organismes telles que la LNC (Ligue Nationale Contre le Cancer) ou l'ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer) auxquels nous souhaitons **participer à court terme**.

Les missions du Cancéropôle Grand-Est (CGE) sont de soutenir les activités de recherche innovantes en favorisant les croisements entre **recherche fondamentale et clinique**, et de mettre en adéquation les politiques de R&D des 5 régions du Grand-Est pour le soutien de **projets collaboratifs et pluridisciplinaires** en s'appuyant notamment sur un réseau de plateformes technologiques et hospitalières. Compte tenu des forces en présence sur le site Nancéen en recherche fondamentale et clinique, une structuration locale forte nous donnerait les moyens de **renforcer notre présence** au sein des activités du CGE.

IV.3.2 Recherche en Ingénierie Pour la Santé “orientée biophotonique”

Les enjeux liés au développement de la **biophotonique** sont considérables [72, 49] car ils concernent les aspects **sociétaux** (amélioration de la santé humaine et de l’environnement), **technologiques** (les technologies biophotoniques servent de nombreuses applications de systèmes complexes : endoscopie, criblage moléculaire, photo-thérapie et photo-diagnostic *in vivo*...) et **économiques** (en 2005, la biophotonique représentait 8 milliards d’euros et servait un marché global de 25 milliards d’euros). Du point de vue industriel, les différentes initiatives internationales confirment que la biophotonique est à même de créer de nouvelles richesses, tant sur le plan des savoir-faire qu’en matière de création d’entreprises et d’emplois. Le croisement des savoir-faire des **domaines optique, STIC et sciences du vivant** apparaît comme un véritable défi en termes de formation, de recherche et d’industrie.

Dans le cadre du **7^ePCRD** européen (Programme Cadre de Recherche et de Développement), les principaux conducteurs politiques du **thème Santé** concernent : la santé des citoyens européens, la compétitivité des industries et activités liées à la santé en Europe et les problèmes de santé globaux, incluant les épidémies émergentes. Ce programme, doté d’un budget de 6 milliards d’euros sur 7 ans (2007-2013), soutient la **recherche collaborative fondamentale et appliquée** qui inclut les activités de découverte, la recherche “translationnelle” et le début des essais cliniques (phase I et II). Parmi les 3 principaux domaines d’activités du thème Santé, le domaine “Biotechnologie, outils génériques et technologies pour la santé humaine” se compose de 4 axes dont celui intitulé “Détection, diagnostic et monitoring” mettant l’accent sur les **approches non-invasives ou minimalement invasives**. En l’occurrence, dans le cadre du premier appel à projet intitulé “Detection, diagnosis and monitoring” en date du 17 Avril 2007, 3 des 4 sujets proposés concernaient le développement de **systèmes d’imagerie hybride**, les **nouvelles méthodologies optiques** pour la détection, le diagnostic et le suivi de maladies ou des processus associés, et les nouvelles sondes d’imagerie vectorisées pour le diagnostic *in vivo* précoce et/ou l’évaluation de réponses thérapeutiques. Le développement de nouveaux outils et de nouvelles technologies et le soutien à la recherche translationnelle¹⁴ (approches de type “from bench to bed-side”) permettent d’assurer la **continuité** dans la recherche collaborative pour la santé. Cette continuité va dans le sens naturel de **l’évolution des pratiques médicales** : recueil d’informations diagnostiques de moins en moins opérateur-dépendant (mesures objectives) et procédures de moins en moins invasives (*in vivo*, sans agent de contraste).

Le secteur de la **recherche en biophotonique** s’est fortement **structuré** au cours de ces 15 dernières années, en France grâce aux Sociétés Françaises d’Optique (SFO) et des Lasers Médicaux (SFLM), et au niveau international avec les sociétés savantes EOS¹⁵, OSA¹⁶, ASLMS¹⁷, ASP¹⁸ et SPIE¹⁹. Ces dernières publient entre autres les **revues** d’intérêt (pour **nos** activités) suivantes : Journal of Optics A - Pure and Applied Optics, Applied Optics (FI = 1.7), Optics Letters (FI = 3.7), Virtual Journal of Biomedical Optics, Applied Spectroscopy (FI = 1.9), Optical Engineering (FI = 0.8), Journal of Electronic Imaging (FI = 0.5), Journal of Biomedical Optics (FI = 3.5), Lasers in Surgery and Medicine (FI = 2.7), photochemistry and photobiology (FI = 2.2) et organisent de nombreux **congrès** nationaux (OPTDIAG, Journées SFO Photonique et Sciences du vivant) et internationaux (congrès biennaux Photonics Europe à Strasbourg et Biomedical Optics à Munich organisés par SPIE Europe, et congrès annuels Medical ima-

14. mise en application médicale des résultats scientifiques de la recherche fondamentale

15. European Optical Society

16. Optical Society of America

17. American Society Laser Medicine and Surgery

18. American Society for Photobiology

19. International Society for Optical Engineering

ging, Photonics West, Photonics Asia, Optics and Photonics, Smart Structures/Nondestructive Evaluation for Health Monitoring + Diagnostics, entre autres). Une analyse de la nature des communications issues du congrès SPIE BiOS 2008 à San José donne une indication des **directions** de recherche privilégiées **actuelles** :

- diagnostics et thérapies photoniques (dont 5 sessions orientées dermatologie, 4 en urologie, 8 en cancérologie sur 46),
- systèmes et technologies cliniques (dont 6 sessions consacrées aux systèmes de diagnostic clinique, 4 à l'imagerie biomédicale multimodale, 2 à la biopsie optique),
- optique tissulaire, interactions lumière-tissu, et ingénierie tissulaire,
- imagerie, microscopie et spectroscopie biomédicale (dont 11 sessions sur 43 portant sur les méthodes optiques de diagnostic et les applications biomédicales de la diffusion).

Plus largement dans le domaine **biomédical**, l'IFMBE²⁰ publie avec Springer le journal "Medical and Biological Engineering and Computing", organise les conférences européennes de l'IFMBE et soutient les conférences IBME²¹, ainsi que l'EMBE²². Enfin, l'IEEE publie plusieurs revues orientées vers les applications biologiques et médicales telles que : IEEE Journal of Quantum Electronics (avec l'IEEE Lasers and Electro Optics Society), IEEE Transactions on Biomedical Engineering (FI = 1.6), IEEE Transactions on Medical Imaging (FI = 3.3). Elle organise également plusieurs congrès internationaux annuels d'intérêt pour nos travaux dans les domaines du **biomédical** et de l'**optique**, notamment : European Conference on Biomedical Optics (ECBO), IFAC Symposium on Modelling and Control in Biomedical Systems (MCBMS), IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : Macro to Nano (ISBI).

IV.3.3 "Pluridisciplinarité", "Interdisciplinarité", "Transdisciplinarité", Qui a dit facilité ?

Comme détaillé au §A.II.2.2.3 page 23, notre projet de recherche, piloté par la **finalité médicale**, vise le développement et l'application de **concepts**, de **méthodes**, de **moyens** et d'**outils** pour la **caractérisation** de **tissus biologiques** par **spectro-imagerie *in vivo***. Il s'agit d'une entreprise par nature **transdisciplinaire** impliquant d'aborder et de résoudre **ensemble** les problématiques associées aux **différents axes disciplinaires** (instrumentation, traitement d'images, classification spectroscopique, modélisation numérique, modèles expérimentaux, *etc.*) et de les valoriser de façon équilibrée mais différente selon les communautés scientifiques en place (photo-physiciens, photo-biologistes, "instrumentalistes scientifiques", "traiteurs de signaux"). Si la **pluridisciplinarité**²³ consiste à faire appel à plusieurs disciplines pour concourir à un projet pré-existant, la construction et le fonctionnement de notre projet de recherche s'inscrit de façon plus ambitieuse dans une démarche **interdisciplinaire**²⁴ c'est-à-dire le **regroupement** de plusieurs

20. International Federation for Medical and Biological Engineering

21. International BioMedical Engineering

22. European Medical and Biological Engineering Conference

23. La pluridisciplinarité correspond au premier échelon de rapprochement entre deux disciplines [78]. Pierre Delattre [30] définit la pluridisciplinarité "comme une association de disciplines qui concourent à une réalisation commune, mais sans que chaque discipline ait à modifier sensiblement sa propre vision des choses et ses propres méthodes. A ce titre, la pluridisciplinarité existe depuis longtemps, même si son importance c'est accru de nos jours. Toute réalisation technique mettant en eux des corps de métier divers correspond en fait à une entreprise pluridisciplinaire."

24. Selon Delattre [30], "le but de l'interdisciplinarité est d'élaborer un formalisme suffisamment général et précis pour permettre d'exprimer dans ce langage unique les concepts, les préoccupations, les contributions d'un nombre plus ou moins grand de disciplines qui, autrement, restent cloisonnées dans leurs jargons respectifs. Il va de soi que, dans la mesure où un tel langage commun pourra être mis au point, les échanges souhaités s'en trouveront facilités. En outre, la compréhension réciproque qui en résultera est l'un des facteurs essentiels d'une

disciplines dans le but de se donner une vision **élargie** sur le problème et s'enrichir ainsi d'une **diversité** disciplinaire qui lui ouvre de **nouvelles** perspectives.

Compte tenu de la **dichotomie** antagoniste entre la pluri- ou trans-disciplinarité intrinsèque des activités de recherche en IPS/GBM et l'organisation plutôt "mono"-disciplinaire des systèmes nationaux d'évaluation de ces activités au niveau individuel (CNU) et collectif (CNRS, MESR), nous essayons de porter une attention **constante** à cet **équilibre**. Les résultats de nos travaux sont ainsi évaluables et évalués au niveau individuel principalement par les sections 63 et 61 du CNU pour les aspects liés à l'instrumentation scientifique et au traitement du signal respectivement (sections qui par ailleurs reconnaissent chacune en leur sein les applications en GBM), et au niveau du GT IPS et du laboratoire par les sections 7 (Sciences et technologies de l'information -informatique, automatique, signal et communication-) et 30 (Thérapeutique, pharmacologie et bio-ingénierie) du CNRS. Il est donc capital de pouvoir tenir compte de ces éléments par exemple dans la définition des sujets de thèses ou des objectifs des projets, dans la constitution des équipes de recherche, et dans le choix des congrès et des revues pour publications. La prise en compte de cette transversalité s'exprime entre autres au travers de la création des Commissions InterDisciplinaires du CNRS (par exemple, CID 43 : Modélisation des systèmes biologiques, bioinformatique), de la création de l'Inter-groupe "Extraction de l'information et physique des images" commun aux GDR ONDES et ISIS (portant sur l'imagerie quantique, microscopique, tomographique, multispectrale, *etc.*), dans le cadre du GDR Statistiques et Santé, ou encore lors de journées thématiques communes de ces derniers avec les GDR STIC-Santé ou MFV (Microscopie Fonctionnelle du Vivant). Notre contribution dans ce sens a consisté notamment à publier un article dans un numéro spécial dédié aux applications en cancérologie de la revue Traitement du Signal, l'une des branches de l'activité du GRETSI (Groupe de Recherche et d'Etudes du Traitement du Signal et des Images). A court terme, nous souhaitons également développer notre participation active dans les GDR (STIC-Santé en particulier), au travers de présentations de nos travaux ou de l'organisation de réunions thématiques.

Pour finir, depuis mon entrée en thèse en 1997, mes travaux d'enseignement et de recherche ont toujours été orientés vers la **promotion**, le **développement** et la **valorisation** des activités en **ingénierie pour la santé** à **Nancy**. C'est la raison pour laquelle, je souhaite pouvoir poursuivre mon implication dans cette direction en contribuant au renforcement et au développement de projets transversaux **fédérateurs** entre les principaux acteurs de recherche hospitaliers (CHU, CAV), universitaires (UHP, INPL) et des EPST (CNRS, INSERM) du site de Nancy, vers un **pôle** fort et visible en ingénierie pour la santé.

meilleure intégration des savoirs. [...] Mais cette fusion entre plusieurs domaines, porte en elle les germes de la genèse d'une nouvelle discipline, qui changeant d'échelle pour prendre plus de recul et assimiler des "corps de métier" différents, n'en gardera pas moins des frontières rigides. Ainsi la pluridisciplinarité et l'interdisciplinarité sont des manipulations artificielles de l'objet "discipline" qui ne poursuivent pas le même but."

Chapitre V

Références bibliographiques

- [1] O. A'Amar and I.J. Bigio. Spectroscopy for the Assessment of Melanomas. In *Reviews in Fluorescence 2006*, volume 3, pages 359–386. Springer, New York, 2006.
- [2] M. Ahmed and A. Farag. Nonmetric calibration of camera lens distortion : differential methods and robust estimation. *IEEE Trans. Med. Imaging*, 14(8) :1215–1230, August 2005.
- [3] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *L'essentiel de la biologie cellulaire*. Flammarion, 2005.
- [4] K.V. Asari, S. Kumar, and D. Radhakrishnan. A new approach for non-linear distortion correction in endoscopic images based on least squares method. *IEEE Trans. Med. Imaging*, 18 :345–355, 1999.
- [5] V. Backman, M. Wallace, L.T. Perelman, J.T. Arendt, R. Gurjar, M. Muller, Q. Zang, G. Zonios, E. Kline, T. McGillican, S. Shapshay, T. Valdez, K. Badizadegan, J. Crawford, M. Fitzmaurice, S. Kabani, H. Levin, M. Seiler, R.R. Dasari, I. Itzkan, J. Van Dam, and M.S. Feld. Detection of preinvasive cancer cells. *Nature*, 406(6791) :35–36, 2000.
- [6] K. Badizadegan, V. Backman, C.W. Boone, C.P. Crum, R.R. Dasari, I. Georgakoudi, K. Keefe, K. Munger, S.M. Shapshay, E.E. Sheets, and M.S. Feld. Spectroscopic diagnosis and imaging of invisible pre-cancer. *Faraday Discussions*, 126 :265–279, 2004.
- [7] S. Baker, R. Gross, I. Matthews, and T. Ishikawa. Lucas-Kanade 20 years on : A unifying framework : Part 2. Technical Report CMU-RI-TR-03-01, Robotics Institute, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA, Février 2003.
- [8] S. Baker and I. Matthews. Lucas-Kanade 20 years on : A unifying framework : Part 1. Technical Report CMU-RI-TR-02-16, Robotics Institute, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA, July 2002.
- [9] S. Baker, I. Matthews, J. Xiao, R. Gross, T. Ishikawa, and T. Kanade. Real-time non-rigid driver head tracking for driver mental state estimation. Technical Report CMU-RI-TR-04-10, Robotics Institute, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA, October 2004.
- [10] M.P. Bard, A. Amelink, M. Skurichina, H.V. Noordhoek, R.P. Duin, H.J. Sterenborg, H.C. Hoogsteden, and J.G. Aerts. Optical spectroscopy for the classification of malignant lesions of the bronchial tree. *Chest*, 129(4) :995–1001, 2006.
- [11] P. Baudisch, D. Tan, D. Steedly, E. Rudolph, M. Uyttendaele, C. Pal, and R. Szeliski. Panoramic viewfinder : providing a real-time preview to help users avoid flaws in panoramic pictures. In *OZCHI '05 : Proceedings of the 19th Conference of the computer-human*

- interaction special interest group (CHISIG) of Australia on Computer-human interaction*, pages 1–10, 2005.
- [12] J.M. Benavides, S. Chang, S.Y. Park, R. Richards-Kortum, N. MacKinnon, C. MacAulay, A. Milbourne, A. Malpica, and M. Follen. Multispectral digital colposcopy for in vivo detection of cervical cancer. *Optics Express*, 11(10) :1223–1236, 2003.
- [13] I.J. Bigio and S.G. Bown. Spectroscopic sensing of cancer and cancer therapy. *Cancer Biology and Therapy*, 3 :259–267, 2004.
- [14] I.J. Bigio and J.R. Mourant. Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics : fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, 42 :803–814, 1997.
- [15] G. Bourg-Heckly, J. Blais, J. J. Padilla, O. Bourdon, J. Etienne, F. Guillemin, and L. Lafay. Endoscopic ultraviolet-induced autofluorescence spectroscopy of the esophagus : tissue characterization and potential for early cancer diagnosis. *Endoscopy*, 32 :756–765, 2000.
- [16] T.M. Breslin, F. Xu, G.M. Palmer, C. Zhu, K.W. Gilchrist, and N. Ramanujam. Autofluorescence and Diffuse Reflectance Properties of Malignant and Benign Breast Tissues. *Annals of Surgical Oncology*, 11(1) :65–70, 2004.
- [17] M. Brewer, U. Utzinger, E. Silva, D. Gershenson, R.C. Jr Bast, M. Follen, and R. Richards-Kortum. Fluorescence spectroscopy for *in vivo* characterization of ovarian tissue. *Lasers in Surgery and Medicine*, 29(2) :128–135, 2001.
- [18] M. Brown and D. G. Lowe. Recognising panoramas. In *Proceedings of the 9th IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV2003)*, volume 2, pages 1218–1227, October 2003.
- [19] P.V. Butte, B.K. Pikul, A. Hever, W.H. Yong, K.L. Black, and L. Marcu. Diagnosis of meningioma by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 10(6) :064026, 2005.
- [20] A. Can, C. V. Stewart, B. Roysam, and H. L. Tanenbaum. A feature-based, robust, hierarchical algorithm for registering pairs of images of the curved human retina. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 24(3) :347–364, March 2002.
- [21] D. Capel and A. Zisserman. Computer vision applied to super-resolution. *IEEE Signal Processing Magazine*, 20(3) :75–86, 2003.
- [22] D. P. Capel. *Image Mosaicing and super-resolution*. PhD thesis, Robotics Research Group. Departement of Engineering Science. University of Oxford, 2001.
- [23] S. K. Chang, M. Y. Dawood, G. Staerkel, U. Utzinger, E. N. Atkinson, R. R. Richards-Kortum, and M. Follen. Fluorescence spectroscopy for cervical precancer detection : Is there variance across the menstrual cycle? *Journal of Biomedical Optics*, 7(4) :595–602, October 2002.
- [24] S.K. Chang, D. Arifler, R. Drezek, M. Follen, and R. Richards-Kortum. Analytical model to describe fluorescence spectra of normal and preneoplastic epithelial tissue : comparison with Monte Carlo simulations and clinical measurements. *Journal of Biomedical Optics*, 9(3) :511–522, 2004.
- [25] S.K. Chang, Y.N. Mirabal, E.N. Atkinson, D. Cox, A. Malpica, M. Follen, and R. Richards-Kortum. Combined reflectance and fluorescence spectroscopy for *in vivo* detection of cervical pre-cancer. *Journal of Biomedical Optics*, 10(2) :1–11, 2005.

- [26] D.Y. Churmakov, I.V. Meglinsky, S.A. Piletsky, and D.A. Greenhalgh. Analysis of skin fluorescence distribution by the Monte Carlo simulation. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 36 :1722–1728, 2003.
- [27] I.F. Cilesiz and A.J. Welch. Optical properties of human aorta : are they affected by cryopreservation? *Lasers in Surgery and Medicine*, 14 :396–402, 1994.
- [28] D.C.G. De Veld. *Autofluorescence spectroscopy for the classification of oral lesions*. PhD thesis, University of Groningen, 2005.
- [29] D.C.G. De Veld, M.J.H. Witjes, H.J.C.M. Sterenborg, and J.L.N. Roodenburg. The status of *in vivo* autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology : Review. *Oral Oncology*, 41(2) :117–31, 2005.
- [30] P. Delattre. *Recherches interdisciplinaires*. Encyclopédie Universalis, 2003.
- [31] S.G. Demos, R. Gandour-Edwards, R. Ramsamooj, and R. Devere. Spectroscopic detection of bladder cancer using near-infrared imaging techniques. *Journal of Biomedical Optics*, 9(4) :767–771, 2004.
- [32] P. Diagaradjane, M.A. Yaseen, J. Yu, M.S. Wong, and B. Anvari. Autofluorescence characterization for the early diagnosis of neoplastic changes in DMBA/TPA-induced mouse skin carcinogenesis. *Lasers in Surgery and Medicine*, 37(5) :382–395, 2005.
- [33] P.B. Dobrin. Mechanical properties of arteries. *Physiological Reviews*, 58(2) :397–460, 1978.
- [34] M. Douze. *Estimation d'homographies inter-images. Cas des mosaïques et du suivi en temps réel. Applications en réalité augmentée*. PhD thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2004.
- [35] E. Drakaki, M. Makropoulou, and A.-A. Serafetinides. In vitro fluorescence measurements and monte carlo simulation of laser irradiation propagation in porcine skin tissue. *Lasers in Medical Science*, 23(3) :267–276, June 2007.
- [36] Institut National du Cancer (InCA). Bilan du plan cancer 2003-2007. <http://www.e-cancer.fr>, juin 2008.
- [37] I.V. Meglinski D.Y. Churmakov and D.A. Greenhalgh. Influence of refractive index matching on the photon diffuse reflectance. *Physics in Medicine and Biology*, 47(23) :4271–4285, 2002.
- [38] S. El Kathib. *Interactions lumière-tissu dans le diagnostic et le traitement du cancer de la vessie*. PhD thesis, Université Henri Poincaré, Nancy I, 2005.
- [39] M.B. Ericson, J. Uhre, C. Strandeberg, B. Stenquist, O. Larko, A.M. Wennberg, and A. Rosen. Bispectral fluorescence imaging combined with texture analysis and linear discrimination for correlation with histopathologic extent of basal cell carcinoma. *Journal of Biomedical Optics*, 10(3) :034009, 2005.
- [40] G. Filippidis, G. Zacharakis, A. Katsamouris, A. Giannoukas, and T.G. Papazoglou. Single and double wavelength excitation of laser-induced fluorescence of normal and atherosclerotic peripheral vascular tissue. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 56 :163–171, 2000.
- [41] S. Flock, S. Jacques, B. Wilson, W. Star, and M. Van Gemert. Optical properties of Intralipid : a phantom medium for light propagation studies. *Lasers in Surgery and Medicine*, 12(5) :510–519, 1992.
- [42] B. Gattengo and D. Chopin. *Progrès en Urologie*, volume 11, chapter Histoire Naturelle, pages 961–990. Urofrance, 2001.

- [43] Z. Ge, K.T. Schomacker, and N.S. Nishioka. Identification of colonic dysplasia and neoplasia by diffuse reflectance spectroscopy and pattern recognition techniques. *Journal of Biomedical Optics*, 52(6) :833–839, 1998.
- [44] A. H. Gee, G. M. Treece, R. W. Prager, C. J. C. Cash, and L. Berman. Rapid registration for wide field-of-view freehand three-dimensional ultrasound. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 22(11) :1344–1357, 2003.
- [45] I. Georgakoudi, B.C. Jacobson, J. Van Dam, V. Backman, M.B. Wallace, M.G. Muller, Q. Zhang, K. Badizadegan, D. Sun, G.A. Thomas, L.T. Perelman, and M.S. Feld. Fluorescence, reflectance, and light-scattering spectroscopy for evaluating dysplasia in patients with Barrett’s Esophagus. *Gastroenterology*, 120 :1620–1629, 2001.
- [46] I. Georgakoudi, E.E. Sheets, M.G. Müller, V. Backman, C.P. Crum, K. Badizadegan, R.R. Dasari, and M.S. Feld. Tri-modal spectroscopy for the detection and characterization of cervical precancers *in vivo*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 186(3) :374–382, 2002.
- [47] R.G. Giovanelli. Reflection by Semi-infinite Diffusers. *Journal of Modern Optics*, 2(4) :153–162, 1995.
- [48] D. Goujon, M. Zellweger, A. Radu, P. Grosjean, B.C. Weber, H. Van Den Bergh, P. Monnier, and G. Wagnières. In vivo autofluorescence imaging of early cancers in the human tracheobronchial tree with a spectrally optimised system. *Journal of Biomedical Optics*, 8(1) :17–25, 2003.
- [49] J.P. Goure. *Livre blanc sur l’optique : Bilan des forces et faiblesses de l’optique en France*. Direction de la Technologie du Ministère de la Jeunesse, de l’Education et de la Recherche, 2004.
- [50] N. Gracias and S. Negahdaripour. Underwater mosaic creation using video sequences from different altitudes. In *In Proceedings of the MTS/IEEE OCEANS ’05*, volume 1, pages 1234–1240, 2005.
- [51] R.S. Gurjar, V. Backman, L.T. Perelman, I. Georgakoudi, K. Badizadegan, I. Itzkan, R.R. Dasari, and M.S. Feld. Imaging human epithelial properties with polarized light scattering spectroscopy. *Nature Medicine*, 7(11) :1245–1248, 2001.
- [52] J. Haringsma, G. Tygtat, H. Yano, H. Lishi, M. Tatsuta, T. Ogihara, H. Watanabe, N. Sato, N. Marcon, B. Wilson, and R. Cline. Autofluorescence endoscopy : feasibility of detection of gi neoplasms unapparent to white light endoscopy with an evolving technology. *Gastrointestinal Endoscopy*, 53(6) :642–650, 2001.
- [53] J.P. Helferty, C. Zhang, G. McLennan, and W.E. Higgins. Videoendoscopic distortion correction and its application to virtual guidance of endoscopy. *IEEE Trans. Med. Imaging*, 20 :605–617, 2001.
- [54] X. Huang, N. Paragios, and D.N. Metaxas. Shape registration in implicit spaces using information theory and free form deformations. *IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 28(8) :1303–1318, 2006.
- [55] S. L. Jacques. Light distributions from point, line and plane sources for photochemical reactions and fluorescence in turbid biological tissues. *Photochem Photobiol*, 67(1) :23–62, 1998.
- [56] S.D. Kamath, C.S. D’souza, S. Mathew, S.D. George, C. Santhosh, and K.K. Mahato. A pilot study on colonic mucosal tissues by fluorescence spectroscopy technique : Discrimination by principal component analysis (pca) and artificial neural network (ann) analysis. *Journal of Chemometrics*, 22(6) :408–416, 2008.

- [57] S.D. Kamath and K.K. Mahato. Optical pathology using oral tissue fluorescence spectra : classification by principal component analysis and k-means nearest neighbor analysis. *Journal of Biomedical Optics*, 12(1) :014028, 2007.
- [58] M. Kara, R.S. Dacosta, B.C. Wilson, N.E. Marcon, and J. Bergman. Autofluorescence-based detection of early neoplasia in patients with barrett’s esophagus. *Digestive Diseases*, 22 :134–141, 2004.
- [59] F. Koenig, F.J. McGovern, H. Enquist, R. Larne, T.F. Deutsch, and K.T. Schomacker. Autofluorescence guided biopsy for the early diagnosis of bladder carcinoma. *Journal of Urology*, 159 :1871–1875, 1998.
- [60] L. Lebart, A. Morineau, and M. Piron. *Statistique exploratoire multidimensionnelle*. Dunod, 3 edition, 2002.
- [61] F. J. W.-M. Leong, M. Brady, and J. O’D. McGee. Correction of uneven illumination (vignetting) in digital microscopy images. *Journal of Clinical Pathology*, 56 :619–621, 2003.
- [62] W. Lin, X. Yuan, P. Yuen, W.I. Wei, J. Sham, P. Shi, and J. Qu. Classification of in vivo autofluorescence spectra using support vector machines. *Journal of Biomedical Optics*, 9(1) :180–186, 2004.
- [63] W.C. Lin, S.A. Toms, M. Johnson, E.D. Jansen, and A. Mahadevan-Jansen. *In Vivo* Brain Tumor Demarcation Using Optical Spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology*, 73(4) :396–402, 2001.
- [64] A. Litvin, J. Konrad, and W. C. Karl. Probabilistic video stabilization using kalman filtering and mosaicking. In *Proceedings of the IS&T/SPIE Symposium on Electronic Imaging, Image and Video*, January 2003.
- [65] Q. Liu and N. Ramanujam. Relationship between depth of a target in a turbid medium and fluorescence measured by a variable-aperture method. *Optics Letters*, 27(2) :104–106, 2002.
- [66] Q. Liu and N. Ramanujam. Sequential estimation of optical properties of a two-layered epithelial tissue model from depth-resolved ultraviolet-visible diffuse reflectance spectra. *Applied Optics*, 45 :4776–4790, 2006.
- [67] Q. Liu, C. Zhu, and N. Ramanujam. Experimental validation of Monte Carlo modeling of fluorescence in tissues in the UV-visible spectrum. *Journal of Biomedical Optics*, 8(2) :223–236, 2003.
- [68] B. D. Lucas and T. Kanade. An iterative image registration technique with an application to stereo vision (darpa). In *Proceedings of the 1981 DARPA Image Understanding Workshop*, pages 121–130, April 1981.
- [69] G. Ma, J.-F. Delorme, P. Gallant, and D.A. Boas. Comparison of simplified monte carlo simulation and diffusion approximation for the fluorescence signal from phantoms with typical mouse tissue optical properties. *Applied Optics*, 46(10) :1686–1692, Avril 2007.
- [70] S.K. Majumder, A. Gupta, S. Gupta, N. Ghosh, and P.K. Gupta. Support vector machine for optical diagnosis of cancer. *Journal of Biomedical Optics*, 10(2) :024034, 2005.
- [71] S.K. MAjumder, A. Uppal, and P.K. Gupta. Autofluorescence spectroscopy of tissues from human oral cavity for discriminating cancerous from normal oral tissue. *Lasers in Life Sciences*, 8 :211–227, 1999.
- [72] J.L. Martin. *La biophotonique française : perspective de développement*. juin 2003.

- [73] Y. Matsushita, E. Ofek, X. Tang, and H.-Y. Shum. Full-frame video stabilization. In *Proceedings of 2005 IEEE International Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*, June 2005.
- [74] Z. Matszak, A. Sawow, and M. Wasilewska-Radwanska. Fluorescence spectra of some photosensitizers in solutions and in tissue-like media. Experiment and Monte Carlo simulation. *Pol. J. Med. Phys. Eng.*, 10(4) :209–221, 2004.
- [75] I.V. Meglinski and S.J. Matcher. Quantitative assessment of skin layers absorption and skin reflectance spectra simulation in the visible and near-infrared spectral regions. *Physiological Measurement*, 23 :741–753, 2002.
- [76] I.V. Meglinski and S.J. Matcher. Computer simulation of the skin reflectance spectra. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 70 :179–186, 2003.
- [77] P. Metais. *Biochimie clinique. Tome 3 : biochimie fonctionnelle*. SIMEP, 1997.
- [78] B. Morel. Pluridisciplinarité, interdisciplinarité, transdisciplinarité, qui a dit facilité? Mémoire de fin d'étude, Cefedem Rhône-Alpes, 2004.
- [79] J.R. Mourant, I.J. Bigio, J. Boyer, R.L. Conn, T. Johnson, and T. Shimada. Spectroscopic diagnosis of bladder cancer with elastic light scattering. *Lasers in Surgery and Medicine*, 17(4) :350–357, 1995.
- [80] J.R. Mourant, A.H. Hielscher, A.A. Eick, T.M. Johnson, and J.P. Freyer. Evidence of intrinsic differences in the light scattering properties of tumorigenic and nontumorigenic cells. *Cancer Cytopathology*, 84(6) :366–374, 1998.
- [81] M.G. Muller, I. Georgakoudi, Q. Zhang, J. Wu, and M.S. Feld. Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media : disentangling effects of scattering and absorption. *Applied Optics*, 40(25) :4633–4646, 2001.
- [82] G.S. Nayak, S. Kamath, K.M. Pai, A. Sarkar, S. Ray, J. Kurien, L. D'Almeida, B.R. Krishnanand, C. Santhosh, V.B. Kartha, and K.K. Mahato. Principal component analysis and artificial neural network analysis of oral tissue fluorescence spectra : Classification of normal premalignant and malignant pathological conditions. *Journal of Chemometrics*, 82(2) :152–166, 2006.
- [83] K. C. Ng, H. Ishiguro, M. Trivedi, and T. Sogo. An integrated surveillance system-human tracking and view synthesis using multiple omni-directional vision sensors. *Image and Vision Computing*, 22(7) :551–561, July 2004.
- [84] Oregon Medical Laser Center OMLC. Optical Spectra. <http://omlc.ogi.edu/spectra/>, 2004.
- [85] J.J. PADILLA IBARRA. *Biopsie Optique par Spectroscopie de Fluorescence des Tissus Vivants : Spectroscopie UV, Microscopie, Spectroscopie Résolue dans le Temps. Conception Instrumental, Traitement Automatique du Signal et Modélisation*. Thèse de doctora, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, Novembre 1999.
- [86] G.M. Palmer, Z. Changfang, T.M. Breslin, X. Fushen, K.W. Gilchrist, and N. Ramanujam. Monte Carlo-based inverse model for calculating tissue optical properties. Part II : Application to breast cancer diagnosis. *Applied Optics*, 45(5) :1072–1078, 2006.
- [87] G.M. Palmer and N. Ramanujam. Monte Carlo-based inverse model for calculating tissue optical properties. Part I : Theory and validation on synthetic phantoms. *Applied Optics*, 45(5) :1062–1071, 2006.

- [88] G.M. Palmer, C. Zhu, T.M. Breslin, F. Xu and W. Gilchrist, and N. Ramanujam. Comparison of Multiexcitation Fluorescence and Diffuse Reflectance Spectroscopy for the Diagnosis of Breast Cancer. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 50(11) :1233–1242, 2003.
- [89] M.S. Patterson, B.C. Wilson, and D.R. Wyman. The Propagation of Optical Radiation in Tissue. i. Models of Radiation Transport and their Applications. *Lasers in Medical Science*, 6(2) :155–168, 1991.
- [90] T.J. Pfefer, L.S. Matchette, and R. Drezek. Influence of illumination-collection geometry on fluorescence spectroscopy in multilayer tissue. *Journal Medical and Biological Engineering and Computing*, 42(5) :669–673, 2004.
- [91] T.J. Pfefer, D.Y. Paithankar, J.M. Ponerros, K.T. Schomacker, and S. Nishioka. Temporally and spectrally resolved fluorescence spectroscopy for the detection of high grade dysplasia in Barrett’s esophagus. *Lasers in Surgery and Medicine*, 32(1) :10–16, 2003.
- [92] T.J. Pfefer, K.T. Schomacker, M.N. Ediger, and N.S. Nishioka. Light propagation in tissue during fluorescence spectroscopy with single-fiber probes. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 7(6) :1004–1012, 2001.
- [93] T.J. Pfefer, K.T. Schomacker, M.N. Ediger, and N.S. Nishioka. Multiple-fiber probe design for fluorescence spectroscopy in tissue. *Applied Optics*, 41(22) :4712–4721, 2002.
- [94] E. Ardizzone R. Pirrone and O. Gambino. Illumination correction on mr images. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, 20 :391–398, 2006.
- [95] J. P. W. Plum, J. B. A. Maintz, and M. A. Viergever. Mutual-information-based registration of medical images : A survey. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 22(8) :986–1004, 2003.
- [96] S.A. Prahl, M. Keijzer, S.L. Jacques, and A.J. Welch. A Monte Carlo Model of Light Propagation in Tissue. volume IS 5, pages 102–111, 1989.
- [97] N. Ramanujam. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, chapter Fluorescence Spectroscopy In Vivo, pages 20–56. R.A. Meyers, Chichester, 2000.
- [98] N. Ramanujam, M. Mitchell, A. Jansen, S. Thomsen, G. Staerkel, A. Malpica, T. Wright, N. Atkinson, and R. Richards-Kortum. Cervical precancer detection using a multivariate statistical algorithm based on laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths. *Photochemistry and Photobiology*, 64(4) :720–735, 1996.
- [99] A. Rollins and M.V. Sivak. Potential new endoscopic techniques for the earlier diagnosis of pre-malignancy. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 15(2) :227–247, 2001.
- [100] E. Rosset, A. Friggi, G. Novakovitch, P.H. Rolland, R. Rieu, J.F. Pellissier, P.E. Magnan, and A. Branchereau. Effets de la cryoconservation sur les propriétés viscoélastiques des artères humaines. *Annals of Vascular Surgery*, 10 :262–272, 1996.
- [101] Y. Rzhanov, L. Huff, and R.G. Cutter Jr. Seafloor video mapping : modeling, algorithms, apparatus. In *In Proceedings of the International Conference on Image Processing (ICIP2002)*, page 4, 2002.
- [102] F. Schmidt. *Development of a Time-Resolved Optical Tomography System for Neonatal Brain Imaging*. PhD thesis, University of London, 1999.
- [103] J. Selb. *Source virtuelle acousto-optique pour l’imagerie des milieux diffusants*. PhD thesis, Université Paris VI, 2002.
- [104] R. Shahidi, M.R. Bax, C.R. Maurer, J.A. Jhonson, E.P. Wilkinson, B. Wang, J.B. West, M.J. Citardi, K.H. Manwaring, and R. Khadem. Implementation, calibration and accuracy

- testing of image-enhanced endoscopy system. *IEEE Trans. Med. Imaging*, 21(12) :1524–1535, 2002.
- [105] M.C. Skala, G.M. Palmer, C. Zhuand, Q. Liu, K.M. Vrotsos, C.L. Marshek-Stones, A. Gendron-Fitzpatrick, and N. Ramanujam. Investigations of Fiber-Optic probe designs for Optical Spectroscopic Diagnosis of Epithelial Pre-Cancer. *Lasers in Surgery and Medicine*, 34 :25–38, 2004.
- [106] D. Steedly, C. Pal, and R. Szeliski. Efficiently registering video into panoramic mosaics. In *In Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV 2005)*, pages 15–21, October 2005.
- [107] A. Stevens, J.S. Lowe, and B. Young. *Anatomie pathologique : Atlas de Wheater, traduction française*. De Boeck, 4^{ème} edition, 2004.
- [108] R. Szeliski. Video mosaics for virtual environments. *IEEE Computer Graphics and Applications*, 16(2) :22–30, March 1996.
- [109] R. Szeliski and H.-Y. Shum. Creating full view panoramic image mosaics and environment maps. In *SIGGRAPH '97 : Proceedings of the 24th annual conference on Computer graphics and interactive techniques*, volume 31, pages 251–258, 1997.
- [110] T. Thorsten and B. Hellward. Automatic line-based estimation of radial lens distortion. *Integrated Computer-Aided Engineering*, 12(2) :177–190, 2005.
- [111] P. Thueler, I. Charvet, and F. Bevilacqua. *In vivo* endoscopic tissue diagnostics based on spectroscopic absorption, scattering, and phase function properties. *Journal of Biomedical Optics*, 8(3) :495–503, 2003.
- [112] U. Utzinger and R.R. Richards-Kortum. Fiber optic probes for biomedical optical spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 8(1) :121–147, 2003.
- [113] P. Viola and W. M. Wells III. Alignment by maximization of mutual information. *International Journal of Computer Vision*, 24(2) :137–154, 1997.
- [114] U. Vovk, F. Pernus, and B. Likar. A review of methods for correction of intensity inhomogeneity in mri. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 26(3) :405–421, March 2007.
- [115] M.B. Wallace, L.T. Perelman, V. Backman, J.M. Crawford, M. Fitzmaurice, M. Seiler, K. Badizadegan, S.J. Shields, I. Itzkan, R.R. Dasari, J. Van Dam, and M.S. Feld. Endoscopic detection of dysplasia in patients with Barrett’s esophagus using light-scattering spectroscopy. *Gastroenterology*, 119(3) :677–682, 2000.
- [116] L. Wang, S.L. Jacques, and L. Zheng. MCML - Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 47 :131–146, 1995.
- [117] A.J. Welch, C. Gardner, R. Richards-Kortum, E. Chan, G. Criswell, J. Pfefer, and S. Warren. Propagation of Fluorescent Light. *Lasers in Surgery and Medicine*, 21 :166–178, 1997.
- [118] B.C. Wilson and G. Adam. A Monte Carlo model for the absorption and flux distribution of light in tissue. *Medical Physics*, 10 :824–830, 1983.
- [119] Y. Wu and J.Y. Qu. Autofluorescence spectroscopy of epithelial tissues. *Journal of Biomedical Optics*, 11(5) :1–11, 2006.
- [120] Z. Yaniv and L. Joskowicz. Long bone panoramas from fluoroscopic x-ray images. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 23(1) :26–35, 2004.
- [121] Y. Yuan and P. Relue. Enzymatic degradation of human skin dermis revealed by fluorescence and reflectance spectroscopy. *Optics Express*, 16(13) :9857, June 2008.

-
- [122] H. Zeng, C. MacAulay, D.I. McLean, and B. Palcic. Spectroscopic and microscopic characteristics of human skin autofluorescence emission. *Photochemistry and Photobiology*, 61(6) :639–645, 1995.
- [123] H. Zeng, C. MacAulay, D.I. McLean, and B. Palcic. Reconstruction of *in vivo* skin autofluorescence spectrum from microscopic properties by Monte Carlo simulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 38(2-3) :238–240, 1997.
- [124] W. Zheng, W. Lau, C. Cheng, K.C. Soo, and M. Olivo. Optimal excitation-emission wavelengths for autofluorescence diagnosis of bladder tumors. *International Journal of Cancer*, 104 :477–481, 2003.
- [125] Yo. Zhou, M. Wan, and H. Xue. A tunable incremental factor augmented inverse image alignment method in fundus angiogram registration and mosaicing. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 28 :219–224, 2004.
- [126] Yo. Zhou, H. Xue, and M. Wan. Inverse image alignment method for image mosaicing and video stabilization in fundus indocyanine green angiography under confocal scanning laser ophthalmoscope. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 27 :513–523, 2003.
- [127] C. Zhu, Q. Liu, and N. Ramanujam. Effect of fiber optic probe geometry on depth-resolved fluorescence measurements from epithelial tissues : a Monte Carlo simulation. *Journal of Biomedical Optics*, 8(2) :237–247, 2003.
- [128] A. Zomet and S. Peleg. Efficient super-resolution and applications to mosaics. In *In Proceedings of the 15th International Conference on Pattern Recognition (ICPR'00)*, volume 1, pages 579–583, 2000.

BIBLIOGRAPHIE

Troisième partie

Production scientifique et Sélection
d'articles

Chapitre I

Production scientifique

I.1 Indices quantitatifs

TABLE I.1 – Tableau récapitulatif des indices quantitatifs de production scientifique : nombre de publications par période, type de revues avec Impact Factor, thèses encadrées

Publications	Nombre par période			Impact Factor (2007)
	1999 2002	2003 2008	Total (99-08)	
Revues internationales à comité de lecture (cf. §I.2.1)	8	10	18	
Technology and Health Care	1		1	-
Clinical Haemorheology and Microcirculation	3	1	4	0.98
Recent Research and Development in Optical Engineering	1		1	-
IEEE Transactions on Biomedical Engineering	1	2	3 ^a	1.62
Rheologica Acta	1		1	1.11
Biorheology	1		1	1.5
Journal of Biotechnology		1	1	2.56
Biotechniques		1	1	2.76
Bio-Medical Materials and Engineering Journal		1	1	0.79
Journal of Biomedical Optics		2	2 ^b	3.5
Computerized Medical Imaging and Graphics		1	1 ^c	0.85
European Journal of Physics – Applied Physics		1	1 ^d	0.78
Revues nationales à comité de lecture (cf. §I.2.2)	1	2	3	
Journal des Maladies Vasculaires	1		1	0.22
Innovation et Technologie en Biologie et Médecine		1	1	-
Traitement du signal		1	1 ^e	-
Conférences internationales à comité de lecture (cf. §I.2.3)	10	17	27 ^f	
Conférences nationales (cf. §I.2.4)	1	16	17	
Ouvrages Scientifiques et divers (cf. §I.2.5)	2		2	
Brevets (cf. §I.2.6)		1	1	
Thèses co-encadrées ou co-dirigées (soutenues) (cf. §I.2.7)	-	6(3)	6(3)	

^aarticles en intégralité pages 115, 163 et 197, ^barticles en intégralité pages 207 et 223, ^carticle en intégralité page 179, ^darticle en intégralité page 235, ^earticle en intégralité page 127, ^fdont 2 articles en intégralité pages 149 et 155.

I.2 Liste des publications

I.2.1 Revues internationales à comité de lecture

NOTER : Les références [RI14, RI15, RI16, RI17, RI18] renvoient à des articles acceptés en révisions majeures et mineures (comme indiqué pour chacun d'eux) et consultables en intégralité dans le chapitre III page 177, par souci de transparence.

- [RI1] T. Gigout, W. Blondel, J. Didelon, V. Latger, D. Dumas, F. Schooneman, and J.F. Stoltz. Development and evaluation of an automatic method for the study of platelet osmotic response. *Technology and Health Care*, 7 :371–380, 1999.
- [RI2] D. Dumas, V. Latger, M.L. Viriot, W. Blondel, and J.F. Stoltz. Membrane fluidity and oxygen diffusion in cholesterol-enriched endothelial cells. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 21 :255–261, 1999.
- [RI3] D. Dumas, J.J. Padilla, V. Latger, S. Woodard, M.C. Carré, W. Blondel, F. Baros, M.L. Viriot, and J.F. Stoltz. New trends in optical bioengineering : applications to cell biology. *Recent Research and Development in Optical Engineering*, 2 :295–315, 1999.
- [RI4] W.C.P.M. Blondel, B. Lehalle, G. Maurice, X. Wang, and J.F. Stoltz. Rheological properties of fresh and cryopreserved human arteries tested *in vitro*. *Rheologica Acta*, 39 :461–468, 2000.
- [RI5] J. Didelon, W.C.P.M. Blondel, P. Mazon, S. Muller, T. Gigout, M. Gentils, G. Cauchois, and J.F. Stoltz. Validation of a test of the red cell membrane osmotic resistance. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 23 :31–42, 2000.
- [RI6] W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, G. Maurice, J.P. Carteaux, X. Wang, and J.F. Stoltz. Investigation of 3d mechanical properties of blood vessels using a new in vitro tests system. results on sheep common carotid arteries. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 48 :1–10, 2001.
- [RI7] J.F. Stoltz, W.C.P.M. Blondel, D. Bensoussan, B. Lehalle, X. Wang, and V. Labrador. New trends in vascular engineering. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 24 :263–272, 2001.
- [RI8] W.C.P.M. Blondel, B. Lehalle, M.-N. Lercher, D. Dumas, and J.-F. Stoltz. Rheological properties of healthy and atherosclerotic human arteries. *Biorheology*, 40 :369–376, 2002.
- [RI9] C. Choserot, E. Péry, J.C. Goebel, D. Dumas, J. Didelon, J.F. Stoltz, and W.C.P.M. Blondel. Experimental comparison between autofluorescence spectra of constrained fresh and cryopreserved arteries. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 33 :235–242, 2005.
- [RI10] M. Abbaci, M. Barberi-Heyob, J.-R. Stinès, W. Blondel, D. Dumas, F. Guillemin, and J. Didelon. Gap junctional intercellular communication capacity by gap-frap technique : a comparative study. *Biotechnology Journal*, 2(1) :50–61, 2007.
- [RI11] R. Miranda-Luna, C. Daul, W.C.P.M. Blondel, Y. Hernandez-Mier, and D. Wolf. Image mosaicing of endoscopic video sequences : registration algorithm and endoscope calibration. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 55(2) :541–553, 2008.
- [RI12] M. Abbaci, M. barberi heyob, W. Blondel, F. Guillemin, and J. Didelon. Assaying the molecular permeability of gap junctional intercellular communication. *Biotechniques*, Sous presse / Under publication, 2008.

- [RI13] M. Amouroux, W.C.P.M. Blondel, F. Granel-Brocard, F. Marchal, and F. Guillemin. A preliminary study on skin phantoms to test spatially resolved - diffuse reflectance spectroscopy as a tool to help diagnose cutaneous melanoma : a non-invasive measurement of breslow index. *Bio-Medical Materials and Engineering Journal*, Sous presse / Under publication, 2008.
- [RI14] E. Pery, W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, and F. Guillemin. Simultaneous characterization of optical and rheological properties of carotid arteries via bimodal spectroscopy : experimental and simulation results. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Accepté (révision mineure) / Accepted for publication (minor revision), 2008.
- [RI15] E. Pery, W.C.P.M. Blondel, C. Thomas, and F. Guillemin. Monte carlo modeling of multi-layer tissues with multiple fluorophores : simulation algorithm and experimental validation on phantoms. *Journal of Biomedical Optics*, En révision / Under revision, 2008.
- [RI16] M. Amouroux, G. Diaz-Ayil, W.C.P.M. Blondel, G. Bourg-Heckly, A. Leroux, and F. Guillemin. Classification of ultra-violet irradiated mouse skin histological stages by bimodal spectroscopy (multiple excitation autofluorescence and diffuse reflectance). *Journal of Biomedical Optics*, Accepté pour publication / Accepted for publication, 2008.
- [RI17] Y. Hernandez-Mier, W.C.P.M. Blondel, C. Daul, F. Guillemin, and D. Wolf. Fast construction of panoramic images for cystoscopic exploration. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, En révision / Under revision, 2008.
- [RI18] G. Diaz-Ayil, M. Amouroux, W.C.P.M. Blondel, G. Bourg-Heckly, Y. Granjon, and F. Guillemin. In vivo diagnosis of mouse skin precancerous stages using autofluorescence and diffuse reflectance bimodal spectroscopy : instrumentation, spectral feature extraction and linear classification. *European Physical Journal - Applied Physics*, Accepté pour publication / Accepted for publication, 2008.

I.2.2 Revues nationales à comité de lecture

- [RN1] J.F. Stoltz, B. Lehalle, W.C.P.M. Blondel, D. Bensoussan, and F. Paulus. Introduction to vascular engineering. *Journal des Maladies Vasculaires*, 26(3) :183–190, 2001.
- [RN2] J.-R. Stinès, M. Abbaci, W. Blondel, M. Barberi-Heyob, D. Dumas, F. Guillemin, and J. Didelon. Instrumental optimisation of gap-frap technique related to gap junctions functionality for different cell types. *ITBM-RBM*, 26 :279–281, 2005.
- [RN3] W. Blondel, Ch. Daul, S. Vilette, R. Miranda-Luna, Y. Hernandez-Mier, G. Bourg-Heckly, and D. Wolf. Autofluorescence endoscopic spectro-imaging and 2D-cartography for *in situ* localisation and diagnosis of cancerous lesions. *Traitement du Signal*, 23 :213–233, 2006.

I.2.3 Conférences internationales à comité de lecture

- [CI1] G. Maurice, P. Waché, X. Wang, L. Canteri, W. Blondel, and J.F. Stoltz. Influence of the non linear properties of the venous vascular wall on the deformation of vasa-vasorum. In *Applied Mechanics and Engineering (ICER'99)*, volume 4, pages 145–150, Zielona Gora, Poland, June 27-30 1999.
- [CI2] W.C.P.M. Blondel, B. Lehalle, J. Didelon, D. Dumas, L. Canteri, and J.F. Stoltz. In vitro measurements of static mechanical properties of segments of cryopreserved and pathological human arteries using a new instrumental set-up. In *International Conference*

- on *Medical Diagnostic Techniques and Procedures (ICMDTP)*, Madras, India, December 15-17 1999.
- [CI3] W.C.P.M. Blondel, B. Lehalle, D. Dumas, L. Canteri, X. Wang, and J.F. Stoltz. In vitro measurements of residual stresses and strains in cryopreserved and pathological human arteries. In *International Conference on Medical Diagnostic Techniques and Procedures (ICMDTP)*, Madras, India, December 15-17 1999.
- [CI4] D. Dumas, V. Latger, Viriot, W.C.P.M. Blondel, and J.F. Stoltz. Permeability oxygen through endothelium by time resolved fluorescence microscopy. influence of plasma viscosity on tissue hypoxia. In *Proceedings of the Microscopy and Microanalysis - MSA.MAS*, volume 5, Portland, OR, USA, August 1-5 1999.
- [CI5] W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, J.P. Carteaux, X. Wang, and J.F. Stoltz. Evaluation of a novel instrumental set-up to measure static and dynamic mechanical properties of segments of blood vessels in vitro - preliminary results. In *IEEE Proceedings of the First Joint BMES/EMBS Conference*, volume 2, page 1344, Atlanta, GA, USA, October 13-16 1999.
- [CI6] W.C.P.M. Blondel, G. Maurice, B. Lehalle, L. Canteri, X. Wang, and J.F. Stoltz. Differences of 3d rheological properties between fresh and cryopreserved human arteries tested in vitro. In *12th Conference of the European Society of Biomechanics (ESB2000)*, Dublin, Irlande, August 27-30 2000.
- [CI7] G. Maurice, W.C.P.M. Blondel, and B. Lehalle. Fissuring of the arterial wall during cryogeny. In *Euromech 4th European Solid Mechanics Conference (ESMC4)*, Metz, France, June 26-30 2000.
- [CI8] L. Canteri, W.C.P.M. Blondel, J.F. Stoltz, and X. Wang. Mechanical properties of thick walled blood vessels : orthotropic effects. In *Euromech 4th European Solid Mechanics Conference (ESMC4)*, Metz, France, June 26-30 2000.
- [CI9] M.N. Lercher, W.C.P.M. Blondel, B. Lehalle, G. Maurice, X. Wang, and J.F. Stoltz. Can duplex scanning predict degeneration of arterial allografts? In *19th World Congress of the International Union of Angiology*, Ghent, Belgium, May 1-5 2000.
- [CI10] W.C.P.M. Blondel, B. Lehalle, M.-N. Lercher, G. Maurice, and J.F. Stoltz. Case comparison : Stress-strain distribution in pathological and healthy artery wall. In *Euromech Colloquium 420 : Mechanics of Cells and Tissues*, Nancy, France, Avril 24-26 2001.
- [CI11] J.-R. Stinès, D. Dumas, W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, and F. Guillemain. Discrimination normal-cancerous cells by gap-frap : feasibility in endoscopy. In *SPIE International Symposium Photonics Europe*, pages 5459–56, Strasbourg, France, April 26-30 2004.
- [CI12] R. Miranda-Luna, Y. Hernandez-Mier, C. Daul, W.C.P.M. Blondel, and D. Wolf. Mosaicing of medical video-endoscopic images : data quality improvement and algorithm testing. In *ICEEE/CIE 2004 IEEE First International Conference on Electrical and Electronics Engineering and Tenth Conference on Electrical Engineering*, pages 530–535, Acapulco Guerrero, Mexico, September 8-10 2004.
- [CI13] R. Miranda-Luna, W.C.P.M. Blondel, C. Daul, Y. Hernandez-Mier, R. Posada, and D. Wolf. A simplified method of endoscopic image distortion correction based on grey-level registration. In *IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)*, volume 5, pages 3383–3386, Singapore, October 24-27 2004.
- [CI14] E. Pery, W.C.P.M. Blondel, J.C. Goebel, J. Didelon, and F. Guillemain. Spectral (optical) and mechanical responses of fresh and cryopreserved issued arteries. In *SPIE Photonics*

- West Biomedical Optics (BiOS 2005)*, volume 5695-12, pages 66–74, San Jose, California, USA, January 22-27 2005.
- [CI15] E. Pery, L. Bauer, W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, and F. Guillemain. Monte carlo simulation of diffuse reflectance spectroscopy in arterial tissues. In *EMBEC'05 3rd European Medical and Biological Engineering Conference*, volume 11, pages 1–5, Prague, Czech Republic, November 20-25 2005.
- [CI16] Y. Hernandez-Mier, W.C.P.M. Blondel, C. Daul, and D. Wolf. Constructing panoramic views of internal walls of a bladder from cystoscopic image sequences. In *EMBEC'05 3rd European Medical and Biological Engineering Conference*, volume 11, pages 1–6, Prague, Czech Republic, November 20-25 2005.
- [CI17] R. Miranda-Luna, Y. Hernandez-Mier, W.C.P.M. Blondel, C. Daul, and D. Wolf. Mosaicing of video-endoscopic images and evaluation of the resulting cartography. In *Imaging for medical and life sciences Symposium (IMVIE2)*, Strasbourg, France, March 1-3 2005.
- [CI18] M. Abbaci, J.R. Stinès, M. Barberi-Heyob, W.C.P.M. Blondel, D. Dumas, F. Guillemain, and J. Didelon. In vitro characterization of gap junctional intercellular communication by gap-frap technique. In *European Conference on Biomedical Optics (SPIE-ECBO)*, volume 5859-09, Munich, Germany, June 12-16.
- [CI19] Y. Hernandez-Mier, W.C.P.M. Blondel, C. Daul, D. Wolf, and G. Bourg-Heckly. 2d panoramas from cystoscopic image sequences and potential application to fluorescence imaging. In *IFAC Modelling and Control in Biomedical Systems*, pages 291–296, Reims, France, September 20-22 2006.
- [CI20] E. Péry, W.C.P.M. Blondel, C. Thomas, J. Didelon, and F. Guillemain. Diffuse reflectance spectroscopy monte carlo modelling : elongated arterial tissue optical properties. In *IFAC Modelling and Control in Biomedical Systems*, pages 41–46, Reims, France, September 20-22 2006.
- [CI21] E. Pery, C. Thomas, W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, S. Berrahmoune, and F. Guillemain. Bimodal spectroscopy : an application to an orthotopic rat bladder model. In *European Optical Society (EOS) Annual Meeting*, pages 104–105, Paris, France, October 16-19 2006.
- [CI22] E. Pery, C. Thomas, W. Blondel, M.A. D'Hallewin, and F. Guillemain. Cancerous tissue discrimination using autofluorescence and light scattering spectroscopies on a tumor model in rat bladder : preliminary results. In *First Jordanian International Conference on Biomedical Engineering*, Amman, Jordania, November 4-8 2007.
- [CI23] G. Diaz-Ayil, M. Amouroux, W. Blondel, G. Bourg-Heckly, E. Pery, Y. Granjon, F. Guillemain, and O. A'Amar. Instrumentation for in vivo bimodal spectroscopy (autofluorescence and diffuse reflectance) : experimental validation and preliminary results. In *First Jordanian International Conference on Biomedical Engineering*, Amman, Jordania, November 4-8 2007.
- [CI24] S. Olijnyk, Y. Hernandez-Mier, W. Blondel, C. Daul, and D. Wolf. Combination of panoramic and fluorescence endoscopic images to obtain tumor spatial distribution information useful for bladder cancer detection. In *European Conferences on Biomedical Optics (SPIE-ECBO)*, volume 6631, pages 66310X–9, Munich, Germany, June 17-21 2007.
- [CI25] M. Amouroux, G. Diaz-Ayil, E. Pery, W. Blondel, and F. Guillemain. Diffuse reflectance spectroscopy's sensitivity to melanic layer thickness variations : an in vitro study on skin

phantoms. In *European Conferences on Biomedical Optics (SPIE-ECBO)*, volume 6628, pages 66280Y–9, Munich, Germany, June 17-21 2007.

- [CI26] M. Abbaci, M. Barberi-Heyob, W. Blondel, D. Dumas, F. Guillemain, and J. Didelon. gap-frap technique applied on spheroid three-dimensional model with the confocal scanning laser microscope. In *International Gap-junction Conference*, Helsingor, Denmark, August 4-9 2007.
- [CI27] E. Pery, M. Amouroux, G. Diaz-Ayil, W. Blondel, G. Bourg-Heckly, M.-A. D'Hallewin, A. Leroux, and F. Guillemain. Multimodality point spectroscopy : interests, development and application to in vivo diagnosis of bladder and skin cancers. In *16th Mediterranean Conference on Control and Automation (IEEE-MED08)*, Ajaccio, France, June 25-27 2008.

I.2.4 Conférences nationales

- [CN1] W.C.P.M. Blondel, B. Lehalle, G. Maurice, X. Wang, and J.F. Stoltz. Propriétés mécaniques 3d d'artères saines et athéromateuses testées in vitro. In *XXXIVe Congrès du Collège Français de Pathologie Vasculaire - Journal des Maladies Vasculaires*, volume 25, page 84, Paris, France, March 15-17 2000.
- [CN2] J.-R. Stinès, W. Blondel, D. Dumas, J. Didelon, and F. Guillemain. Analyse de l'activité des jonctions communicantes de cellules cancéreuses par la technique de frap. In *Colloque Paris Biophotonique 2003*, Paris, France, October 22 2003.
- [CN3] E. Pery, J.-C. Goebel, W. Blondel, J. Didelon, V. Chalau, and F. Guillemain. Caractérisation expérimentale des propriétés optiques et rhéologiques de tissus artériels par spectroscopie bimodale. In *Colloque national Diagnostic et Imagerie Optique en Médecine/Biologie (OPTDIAG)*, Paris, France, Mai 11-13 2004.
- [CN4] M. Abbaci, J.-R. Stines, J. Didelon, W. Blondel, D. Dumas, and F. Guillemain. Etude des connexines et analyse de l'activité des jonctions communicantes par la technique de frap. In *Colloque national Diagnostic et Imagerie Optique en Médecine/Biologie (OPTDIAG)*, Paris, France, Mai 11-13 2004.
- [CN5] Y. Hernandez-Mier, R. Miranda-Luna, W.C.P.M. Blondel, C. Daul, and D. Wolf. Fast reconstruction of mosaics from video-endoscopic images using phase correlation registration. In *Journées Sciences Technologies et Imagerie en Médecine (JSTIM)*, pages 88–89, Nancy, France, March 21-23 2005.
- [CN6] E. Pery, W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, and F. Guillemain. Are the spectral characteristics of arterial tissues modified with mechanical constraints? In *Journées Sciences Technologies et Imagerie en Médecine (JSTIM)*, pages 140–141, Nancy, France, March 21-23 2005.
- [CN7] J.R. Stinès, M. Abbaci, W.C.P.M. Blondel, M. Barberi-Heyob, D. Dumas, F. Guillemain, and J. Didelon. Instrumental optimisation of gap-frap technique related to gap junctions functionality for different cell types. In *Journées Sciences Technologies et Imagerie en Médecine (JSTIM)*, pages 167–168, Nancy, France, March 21-23 2005.
- [CN8] E. Pery, W.C.P.M. Blondel, C. Thomas, J. Didelon, and F. Guillemain. Propriétés optiques de tissus artériels sous contraintes : Modélisation monte-carlo en spectroscopie de diffusion élastique résolue dans l'espace. In *Journée Annuelle de la Recherche Médicale de la faculté de médecine de Nancy*, Nancy, France, October 7 2006.

- [CN9] Hernandez-Mier, W.C.P.M. Blondel, C. Daul, and D. Wolf. Construction automatique d'images panoramiques à partir de séquences vidéo-endoscopiques et application potentielle à l'imagerie de fluorescence. In *Journée Annuelle de la Recherche Médicale de la faculté de médecine de Nancy*, Nancy, France, October 7 2006.
- [CN10] M. Abbaci, M. Barberi-Heyob, W.C.P.M. Blondel, F. Guillemain, and J. Didelon. Application de la technique de gap-frap en mode monophoton sur modèle tridimensionnel de sphéroïdes. In *XIème congrès de l'Association Française de Cytologie (AFC)*, Bruges, Belgium, October 18-20 2006.
- [CN11] W.C.P.M. Blondel, Emilie Péry, Cédric Thomas, Marine Amouroux, and Gilberto Diaz. Modélisation des interactions lumière-tissus : les composantes spectrales. In *Journée Thématique de l'Association Française de Cytologie (AFC : Imagerie et analyse spectrale en microscopie)*, Paris, France, June 08 2006.
- [CN12] G. Diaz-Ayil, M. Amouroux, W. Blondel, G. Bourg-Heckly, E. Pery, Y. Granjon, F. Guillemain, and O. A'Amar. Instrumentation pour la spectroscopie bimodale (autofluorescence et diffusion élastique) in vivo. In Hermès-Lavoisier, editor, *4ème Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation (C2I)*, pages 445–453, Nancy, France, October 17-19 2007.
- [CN13] G. Diaz-Ayil, M. Amouroux, E. Pery, W. Blondel, G. Bourg-Heckly, and F. Guillemain. Système d'excitation pour spectroscopie bimodale (autofluorescence et réflectance diffuse) : application à la détection in vivo de cancers de la peau. In *Colloque national Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine (OPTDIAG)*, Paris, France, May 15-16 2007.
- [CN14] G. Diaz-Ayil, M. Amouroux, E. Pery, W. Blondel, F. Guillemain, O. A'Amar, and G. Bourg-Heckly. Instrumentation de spectroscopie bimodale (autofluorescence et réflectance diffuse) : développement et application à la détection de stades précoces de carcinomes cutanés uv-induits sur souris skh-1. In *Journée Claude Huriet de la Recherche Médicale du CHU et de la faculté de médecine de Nancy*, page 41, Nancy, France, November 23 2007.
- [CN15] M. Amouroux, G. Diaz-Ayil, E. Pery, W. Blondel, and F. Guillemain. Sensibilité de la spectroscopie de réflectance diffuse aux variations d'épaisseur d'une couche mélanique : étude in vitro sur fantômes de peau. In *Colloque national Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine (OPTDIAG)*, Paris, France, May 15-16 2007.
- [CN16] M. Amouroux, W. Blondel, F. Granel-Brocard, F. Marchal, and F. Guillemain. Evaluation non-invasive de l'indice de breslow par spectroscopie de réflectance diffuse résolue spatialement : étude préliminaire sur fantômes de peau. In *Journée Claude Huriet de la Recherche Médicale du CHU et de la faculté de médecine de Nancy*, page 38, Nancy, France, November 23 2007.
- [CN17] S. Olijnyk, Y. Hernandez-Mier, W. Blondel, C. Daul, and D. Wolf. Superposition d'images endoscopiques panoramiques en lumière blanche et en fluorescence et extraction automatique de paramètres de distribution spatiale des mesures. In *Colloque national Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine (OPTDIAG)*, Paris, France, May 15-16 2007.

I.2.5 Ouvrages Scientifiques et divers

- [Ou1] W.C.P.M. Blondel, B. Lehalle, J. Didelon, G. Maurice, D. Dumas, D. Bensoussan, L. Canteri, X. Wang, and J.F. Stoltz. *Medical Diagnostic Techniques and Procedures*,

chapter In vitro measurement of mechanical properties of healthy, cryopreserved and pathological human arteries using a new experimental device, pages 453–462. New Dehli, 1999.

- [Ou2] D. Dumas, C. Wendling, W. Blondel, V. Latger, and J.F. Stoltz. Microscopie à sectionnement optique : applications aux cellules vivantes en biologie. Festival du film du chercheur CNRS, 2000.

I.2.6 Brevets

- [Br1] J.-L. Contet-Audonneau, F. Math, W. Blondel, G. Pauly, G. Perie, and V. Gillon. Analysis of skin reactivity and hypersensitivity. Patent FR2845265(A1)-EP1551295(A1)-WO2004032739(A1), April 22 2004.

I.2.7 Masters Recherche et Doctorats

- [Th1] M. Abbaci. Etude de l'implication des jonctions communicantes pour des modèles de lignées cellulaires saines et tumorales : Application de la technique de frap et modèle comportemental. Master's thesis, Ecole Doctorale BioSE, UHP Nancy 1, DEA Bioingénierie - Biomatériaux, january-july 2004.
- [Th2] J.-C. Goebel. Caractérisation expérimentale des propriétés optiques et rhéologiques de tissus vasculaires - etude en régime statique. Master's thesis, Ecole Doctorale BioSE, UHP Nancy 1, DEA Bioingénierie - Biomatériaux, january-july 2004.
- [Th3] H. Liu. Caractérisation de tissus biologiques in vivo par spectroscopie multi-modalités : instrumentation et analyse de spectres. Master's thesis, Ecole Doctorale IAEM, INPL, Master Recherche IS-EEAPR (Ingénierie Système en Electronique, Electrotechnique, Automatique, Productique, Réseaux) - Spécialité ADSB (Automatique, Diagnostic, Signal et Bio-Imagerie), september 2008.
- [Th4] A. Monnier. La sous unité protéique cx 43 : Etude de son expression et localisation par traitement d'images et modélisation comportementale. Master's thesis, Ecole Doctorale BioSE, UHP Nancy 1, DEA - Bioingénierie - Biomatériaux, january-august 2005.
- [Th5] Y. Burdin. Projet imageur multibande endoscopique : calcul de l'erreur de mosaïquage. Master's thesis, Ecole Doctorale IAEM, INPL, DEA - Contrôles Signaux et Communication, march-september 2005.
- [Th6] Vadzim Chalau. *Spectroscopie in vivo de diffusion élastique résolue dans l'espace en combinaison avec la spectroscopie de fluorescence : application en cancérologie*. PhD thesis, Ecole Doctorale IAEM, Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, October 2004.
- [Th7] R. Miranda-Luna. *Contribution au mosaïquage d'images endoscopiques d'organes creux pour l'aide au diagnostic du cancer en phase précoce*. PhD thesis, Ecole Doctorale IAEM, Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, mars 2005.
- [Th8] E. Pery. *Spectroscopie bi-modale en diffusion élastique et autofluorescence résolue spatialement : instrumentation, modélisation des interactions lumière-tissus et application à la caractérisation des tissus biologiques ex vivo et in vivo pour la détection de cancers*. PhD thesis, Ecole Doctorale IAEM, Doctorat de l'Institut Polytechnique de Lorraine, October 31 2007.

- [Th9] Y. Hernandez-Mier. *Construction rapide d'images panoramiques applicables à l'exploration cystoscopique et à l'endoscopie de fluorescence en cancérologie*. PhD thesis, Ecole Doctorale IAEM, Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, October 22 2007.
- [Th10] M. Abbaci. *Suivi de la fonctionnalité des jonctions communicantes par la technique de gap-FRAP sur des modèles in vitro (2-D, 3-D) et ex vivo : Intérêt pour le diagnostic du cancer*. PhD thesis, Ecole Doctorale BioSE, Doctorat de l'Université Henri Poincaré – Nancy 1, 21 octobre 2008.
- [Th11] M. Amouroux. *Caractérisation de la transformation néoplasique de la peau par spectroscopies optiques sur fantôme de mélanome et carcinome épidermoïde murin photo-induit*. PhD thesis, Ecole Doctorale BioSE, Doctorat de l'Université Henri Poincaré – Nancy 1, 7 octobre 2008.
- [Th12] G. Diaz. *Spectroscopie fibrée in vivo multimodalités (autofluorescence, diffusion élastique, Raman) : instrumentation, extraction de caractéristiques et classification*. PhD thesis, Ecole Doctorale IAEM, Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, Soutenance prévue début 2009 2009.

Chapitre II

Sélection d'articles publiés

CETTE partie rassemble 5 articles de revues et de congrès. J'ai choisi un échantillonnage présentant 1 article en revue internationale (IEEE TBE, 2001) concernant mes travaux de thèse, 1 article en revue nationale (TS, 2006) concernant les différents aspects du projet de recherche SpID mené en spectroscopie et en imagerie depuis 2003, 2 articles de conférences internationales (ICIP et IFAC, 2006) et 1 article en revue internationale (IEEE TBE, 2008), présentant des éléments détaillés des travaux réalisés et des résultats obtenus en imagerie endoscopique panoramique et en spectroscopie bimodale.

II.1 IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2001, 48 :1–10

Investigation of 3D Mechanical Properties Of Blood Vessels Using A New *In Vitro* Tests System. Results On Sheep Common Carotid Arteries.

Walter C.P.M. Blondel, Jacques Didelon, Gerard Maurice, Jean-Pierre Carteaux*, Xiong Wang and Jean-François Stoltz

Abstract—In order to investigate the 3D mechanical properties of blood vessels, a new experimental device is described allowing *in vitro* static and dynamic measurements on segments of arteries with high technical performances. Static tests are applied to sheep common carotid arteries. Considering a thick-walled cylindrical model of orthotropic material under large deformations, a classical 3D approach based on strain energy density is used to calculate the resulting mechanical behaviour law in radial and circumferential directions and stresses distribution throughout the wall thickness. Results are presented with reference to unloaded and zero-stress initial state thanks to simple measurements of inner and outer circumferences. A particular ratio relating the two main stresses (circumferential and longitudinal) is calculated that put into the forth the progressive modifications in the direction of the predominant stress in the wall and the specific radial location where these changes occurs. We observe that this point location is a function of the test conditions of the specimen i.e. stretching length and level of pressure.

Index terms— *In vitro* instrumentation, blood vessels, biorheology, large strains, anisotropy.

I. INTRODUCTION

On a clinical point of view, the mechanical properties of the arterial wall [34] are responsible for the blood pressure wave propagation and play an important role in cardiovascular diseases [9,27] (like hypertension, aneurysm development or atherosclerosis). The three-dimensional mechanical properties of human allografts need also to be investigated in order to determine how they may be modified by cryopreservation. On this point, recent studies did not collect enough data to formally assess that cryopreservation of arteries has no effects on their mechanical properties [30]. Mechanical behaviours of vascular prosthesis [18], allografts [25] and pathological human vessels need thus to be compared in order to determine helpful parameters in clinical diagnosis.

On a more theoretical aspect, the expression of a mechanical model of the vascular wall [4,38,40] taking into accounts the inhomogeneity, the anisotropy, the non-linearity and the visco-elasticity of the material, is an actual problem of great complexity and interest that needs further experimental parameters to be introduced. Furthermore, data obtained from cylindrical segments are more informative and realistic than tests on flat specimens [20]. The mechanical behaviour law characterising such three-dimensional structures is defined by stresses and strains relations taking all directions into consideration. Associated to limit conditions, initial stress and/or zero-stress state of the material [15] are also needed to determine the true stresses state of the structure.

In order to investigate those fields and to calculate behavioural mechanical parameters, it is necessary to collect experimental data using an accurate and reliable system of measurement. Based on previous studies [3,6,11,13,18,20,22,35,39...], we developed a new experimental set-up allowing the real-time (static or dynamic) measurement of diameter, transmural pressure and longitudinal force of cylindrical segments of blood vessels, *in vitro*.

One of the problems in surgical implantation of allografts (on a mechanical aspect) concerns the difficulty in evaluating an “appropriate” length of longitudinal stretching for the arterial graft, while preserving a good pulsatility. It would therefore be interesting to investigate the interrelation of longitudinal and transversal elastic properties of segments of arteries, their interpretation and the comparison to the results existing in the literature. These factors depend on the protocol definition and the experimental conditions, particularly in the case of *in vitro* tests. Consequently, the aim of this study was to:

- present the experimental system and methods, and evaluate the technical performances of the device,
- test and discuss the *in vitro* mechanical behaviour of segments of sheep common carotid arteries, in static conditions, using this apparatus,
- calculate and compare the main resulting three-dimensional mechanical parameters in radial, circumferential and longitudinal directions, taking into consideration unloaded and zero-stress initial states,
- discuss the interest of the results obtained in front of more clinical applications.

Manuscript received ... 1999; revised

W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, G. Maurice, X. Wang and J.F. Stoltz are with the Laboratory of Energetics and Theoretical and Applied Mechanics (LEMTA), Angiohematology-Hemorheology Department, UMR CNRS 7563 and IFR CNRS W0070, Faculté de médecine, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France (e-mail: walter.blondel@biomed.u-nancy.fr).

*J.P. Carteaux is with the Laboratory of Experimental Surgery, Faculté de médecine, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Publisher Item Identifier ...

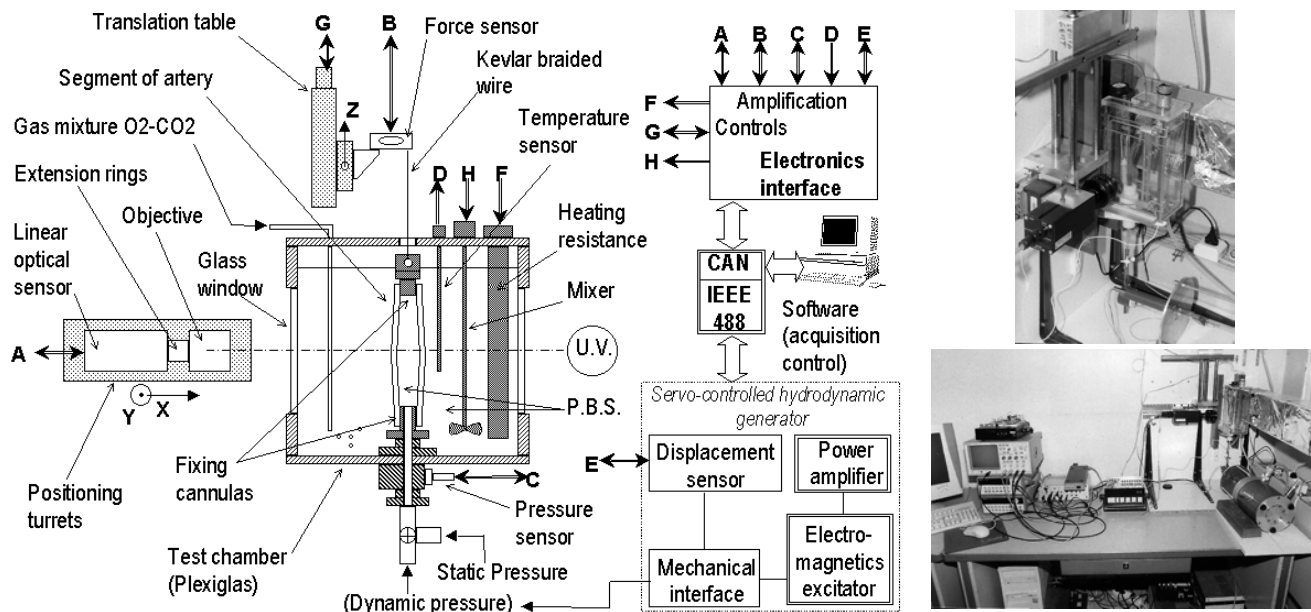


Fig.1 Schematics representation and photos (large and close view) of the experimental testing device

II. MATERIALS AND METHODS

A. Biological Materials

Segments of common carotid arteries (CCA) were *post-mortem* surgically dissected from seven female sheep, following an overdose of Phenobarbital. All animals in this study received human care in compliance with the European Convention on animal care. These sheep (INRA 401, EARL BIMA, Pulligny-France) were 2 to 3 years old with a mean weight of 40 to 45 kg. The *in vivo* length of each segment of artery was systematically measured before sampling, using two clamps and a wire. The segments of CCA obtained were then temporarily stored at 4°C in M199 medium (GIBCO BRL) supplemented with penicillin, kanamycin and fungizone, until *in vitro* tests started.

B. Description Of The Experimental System

The experimental device (Fig.1) mainly consists of:

1. A vertical watertight test chamber built in Plexiglas and filled with phosphate buffer saline (PBS). Two glass windows (3mm thick) situated on the optical path of the diameter detection were realized in order to avoid any degradation due to time (aging process), biological contamination or light (photosensitivity).
2. A high resolution vented gage pressure transducer 0-350 mbar (XTC-190M-0.35BARVG, KULITE, Inc.) measuring the internal pressure at the entrance of the vessel referred to ambient atmospheric pressure. This sensor allows static and dynamic measurements of the pressure in a wide typical frequency bandwidth from 0 to 160kHz. It can operate in corrosive environment and is temperature compensated. The resulting transmural pressure exerted on both side of the segment of artery in the bath is constant along the vertical length and

calculated when taking into accounts the height of the bath.

3. A fast linear CCD sensor (FZS1024, SENSO PART UK Ltd) coupled with extension rings of different lengths and a 50mm objective. This Video dimension Analyser (VDA) is fixed on micro-metrics turrets to allow for positioning adjustment in X (focal length) and Y (transversal cut of the vessel) directions. The line pixels back-lighted with high frequency UV source are scanned at a frequency of 1MHz resulting in a frame frequency of 100Hz. The resolution is better than 0.1% of the optical field width.
4. A force sensor 0-20N (DOERLER MESURES, France) based on a full strain-gauges bridge fixed on a stainless steel testing body. It is fixed on a micro-metrics translation table allowing to stretch the segment at specific lengths while measuring the longitudinal force exerted. A Kevlar braided wire was chosen to connect the upper part of the vessel segment to the testing body because of its high elastic Young's modulus (4.10^9N/m^2 obtained by uniaxial traction test) and to electrically isolate the sensor from the test chamber bath (electrolyte). Nevertheless, the assembly allows the tested segment to freely elongate on one end.
5. A precise temperature regulation based on immersed heater and resistive temperature sensor (PT1000) allowing the bath to be maintained at temperature ranging from ambient to 40°C. A mixer is activated to regularly homogenize the temperature of the bath.
6. An acquisition-control-storage system based on 12 bits AD/DA board (PCADC12B8V/D, DIGIMETRIE, France) in a microcomputer (PC PentiumII®) and specific electronics and software interfaces developed in the lab.
7. A hydrodynamics generator used to perform further dynamic tests. An electromagnetic exciter (EX303C-

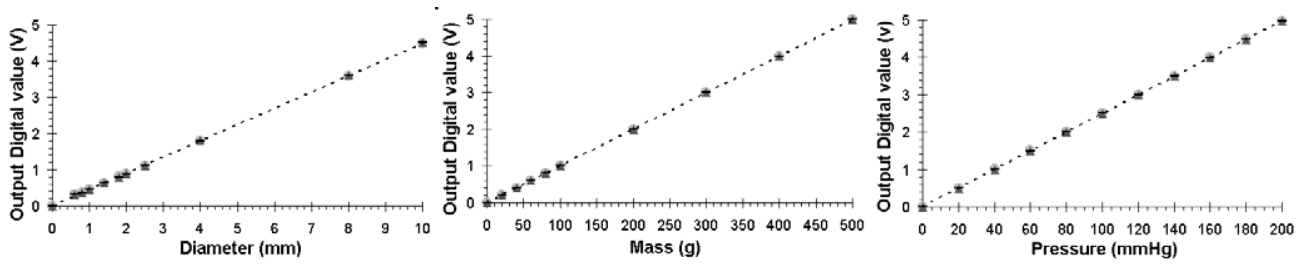


Fig.2 Experimental Transfer curves of Output Digital values vs. calibrated Diameter (left), Mass (middle) and Pressure (right) :

- Increasing values of Diameter, Mass or Pressure,
- ▲ Decreasing values of Diameter, Mass or Pressure,
- Mean values of Diameter, Mass or Pressure,
- ... Mean straight line calculated from linear regression using least squares method.

50N, PRODERA, France) in series with a proportional-integrated-derivative (PID) controller are feedback with a linear variable differential sensor or LVDT (1000 MHR S/N845, SCHAEVITZ ENG., Pennsauken, N.J.) for perfused liquid volume (displacement) servo-control. The system is designed to generate any output volume or pressure waveform in the frequency range of interests 0Hz (DC) to 50Hz using the IEEE488 instrumentation bus. This actually functional generator was developed after the present study (static tests on sheep CCA) was undertaken.

C. Calibration

The evaluation of metrological performances in terms of accuracy, linearity, reproducibility for each acquisition channel (including sensing, analog amplification and analog-to-digital conversion) was first undertaken. It was also important to verify if no hysteresis due to electronics acquisition channel was superimposed to mechanical hysteresis phenomenon (visco-elasticity or thixotropy) exhibited by the blood vessels. Concerning pressure measurements, successive increasing and decreasing values of pressure ranging from 0 to 200mmHg were imposed to both the pressure sensor and a mercury manometric column. The evaluation of the force acquisition channel was realised by means of standard mass with weigh ranging from 0 to 500g by steps of 20g increasingly and decreasingly applied to the force sensor. For diameter measurements, calibrated stainless steel cylinders (18/10 stretched with tolerances $-2\mu\text{m}/-14\mu\text{m}$) with diameter values in the range of 0.1mm to 10mm were immersed by successive increasing and decreasing values, in the place of a segment of vessel along the same vertical central axis.

Afterwards, the calibration of the channels appending before each test of artery was simply realised by adjusting the output minimal and maximal numerical values respectively to minimal and maximal loads imposed. The slopes resulting from the three characteristics obtained were used for calculations of pressure, force and diameter absolute values.

D. Protocol Of Tests

In order to perform the mechanical tests, each cylindrical specimen of artery was non-traumatically mounted on

specifically designed polyvinyl chloride (PVC) cannulas using 0 nonabsorbable braided suture wire, collaterals were collapsed using 6-0 nonabsorbable suture wire and watertightness was verified. Retracted axial length of the vessel segment was measured between fixing wires. The specimen was first filled with PBS solution in order to avoid the presence of any air bubble in the lumen, then immersed inside the housing chamber also filled with PBS maintained at 37°C. The vessel was stretched vertically between the lower drilled cannula fixed for fluid perfusion inside the vessel and the upper one connected to the force transducer.

In this study, external diameter, longitudinal force and internal pressure were continuously measured under static conditions (steps of pressure). For each segment, sets of measurements were systematically performed after preconditioning (application of mean pressure of 120 to 130 mmHg during about 15 minutes followed by 4 to 5 cycles from 0 to 180 mmHg at slow rate) at 3 different lengths below ($L_{FV} - 3\%$) and above ($L_{FV} + 3\%$) the “*in vivo* pre-stretching” length L_{FV} determined by trial and error so that axial force is independent of pressure [4,10], and stated to correspond to *in vivo* length L_{FV} .

After completing the tests, the specimens were cut in slices (about 1mm in length) and acquisition/processing image system (SONY camera and Visilog[®] software) then provided us with the geometrical dimensions of unloaded rings and zero-stress state open rings (unloaded rings after radial cut) images.

E. Calculation Of The Mechanical Parameters

The diameter was continuously measured around mid-length of the tested vessel (far from the borders of fixing cannulas). Edge effects were thus neglected for calculations of parameters in circumferencial and radial directions.

The tested segments were considered as uniform, circular, cylindrical and incompressible thick-walled tubes. We also assume the CCA wall to behave as an orthotropic, non-linear elastic continuum and homogeneous material.

In order to characterise the mechanical behaviour of the vascular wall, a three dimensional approach [8,23,35,37] is used for stresses calculation based on a classical four parameters form of strain energy density function W [14,16,40] :

Tab.1 Values of fitting coefficients for the 5 specimens with reference to unloaded and zero-stress states.

Specimen	Initial State	c (10 ³ N/m ²)	a ₀₀	a _{zz}	a _{0z}	R ²
N°1	Unloaded	6.4337	0.7472	1.6372	-0.2631	0.976
	Zero-Stress	5.5062	1.5622	1.7065	-0.3811	0.974
N°2	Unloaded	7.7858	0.7146	1.7079	-0.3401	0.968
	Zero-Stress	6.1663	1.3488	1.8317	-0.4912	0.966
N°3	Unloaded	2.9046	2.4395	5.0126	-1.8778	0.949
	Zero-Stress	2.3131	3.1979	5.4961	-2.3256	0.949
N°4	Unloaded	8.1020	0.4124	7.4422	-0.7203	0.967
	Zero-Stress	0.7506	0.7940	7.7405	-1.0588	0.967
N°5	Unloaded	3.8816	1.3931	1.9270	-0.4131	0.949
	Zero-Stress	3.2884	1.9589	2.0411	-0.5416	0.947

$$\bullet W = \frac{c}{2} \cdot (e^Q - 1) ; Q = a_{00} E_{00}^2 + a_{zz} E_{zz}^2 + a_{0z} E_{00} E_{zz} \quad (1)$$

where c , a_{00} , a_{zz} and a_{0z} are the material coefficients and E_{00} and E_{zz} are circumferential and longitudinal strains.

The Cauchy's stress tensor σ was used to describe the rheological behaviour inside the wall with shear stresses vanishing because the artery is in axisymmetric plane strain state under applied loads. Normal components can thus be expressed as a function of strain energy as follows :

$$\bullet \sigma_{ii} = \lambda_{ii}^2 \cdot \frac{\partial W}{\partial E_{ii}} + P_H = \lambda_{ii}^2 \cdot S_{ii} \quad i = r, \theta, z \quad (2)$$

where S_{ii} are Kirchhoff stresses appropriate for stress-strain relationships representation, and P_H is the hydrostatic pressure due to incompressibility [7].

A theory of large elastic deformations based on the Green's strain tensor [16,36,39] was therefore used with normal components in radial, circumferential and longitudinal directions defined as :

$$\bullet E_{ii} = \frac{1}{2} (\lambda_{ii}^2 - 1) \quad i = r, \theta, z \quad (3)$$

where stretching ratios λ_{ii} are functions of r :

$$\bullet \lambda_{00}(r) = \frac{C}{C_x} ; \quad \lambda_{zz}(r) = \frac{L}{L_x} \quad (4)$$

In these expressions, L is the longitudinal length and C is the circumferential length ($\pi \times$ diameter), both in the deformed state. L_x and C_x are the respective longitudinal and circumferential lengths in the initial state of reference ie. unloaded ($x = u$) and zero-stress ($x = 0$), with $L_u = L_0$, and C_0 corresponding to the measured length of inner or outer arc of the opened-up ring.

Incompressibility assumption leads to the complementary relations:

$$\bullet \lambda_{rr}(r) = \frac{1}{\lambda_{00} \cdot \lambda_{zz}} \quad (5)$$

$$\bullet V_w = L_u \cdot \pi \cdot h_u \cdot (D_u - h_u) = L \cdot \pi \cdot h \cdot (D_e - h) \quad (6)$$

with V_w volume of the vessel wall, D_e external diameter, h thickness, L length of the specimen, and D_u , h_u , L_u respectively D , h , L of the segment in unloaded state.

The expression of stress differences allows to eliminate the hydrostatic pressure from equation (2) [23,37]:

$$\bullet \sigma_{ii} - \sigma_{rr} = \lambda_{ii}^2 \cdot \frac{\partial W}{\partial E_i} \quad i = \theta, z \quad (7)$$

from which circumferential and longitudinal stresses will be calculated.

The non-zero local equilibrium relation allows to obtain the third stress equation as :

$$\bullet \sigma_{rr}(r) = -P_i + \int_{R_i}^r \lambda_{00}^2 \cdot \frac{\partial W}{\partial E_{00}} \cdot \frac{1}{r} \cdot dr \quad (8)$$

where R_i and R_o are inner and outer radius respectively.

Boundary condition leads to the expression linking the physical parameter of transmural pressure P_T measured :

$$\bullet P_T = P_i - P_e = \int_{R_i}^{R_o} (\sigma_{00} - \sigma_{rr}) \cdot \frac{dr}{r} = \int_{R_i}^{R_o} \lambda_{00}^2 \frac{\partial W}{\partial E_{00}} \frac{dr}{r} \quad (9)$$

Furthermore, the axial force F exerted for different extensions and on a segment of vessel closed on one end is expressed as follows :

$$\bullet F = 2\pi \int_{R_i}^{R_o} \sigma_{zz} r dr = \pi \int_{R_i}^{R_o} \left(2\lambda_{zz}^2 \frac{\partial W}{\partial E_{zz}} - \lambda_{00}^2 \frac{\partial W}{\partial E_{00}} \right) r dr \quad (10)$$

The determination of the constants of the theoretical expression of energy density function was performed through Levenberg-Marquardt nonlinear regression (including statistical weights) of P_T and F to experimental data. Performance of the fitting is given by the coefficient of multiple determination r^2 . Integral parts were calculated using the Gauss method with 4 points. In our experiments, P_T was varied from 0 to 180 mmHg with 11 incremental steps and for 3 values of F corresponding to the 3 lengths aforementioned, in order to model the global behaviour of the segment around its reference length L_{FV} . Therefore, we obtained 66 simultaneous equations.

Based on equations 8 and 7, distributions of stresses in the wall were calculated at 10 equally spaced points between R_i and R_o .

Because of their potential interest in clinical field, complementary classically referenced parameters [19,28,30,31] were also calculated such as the pressure-strain elastic modulus E_p , the wall stiffness β and the sectional compliance or compliance per unit length C_{pul} defined as follows :

$$\bullet E_p = \frac{\Delta P_T}{\Delta D / D_{diast}} = \frac{P_{syst} - P_{diast}}{(D_{syst} - D_{diast}) / D_{diast}} \quad (11)$$

$$\bullet \beta = \frac{\ln(P_{syst} / P_{diast})}{(D_{syst} - D_{diast}) / D_{diast}} \quad (12) \quad \bullet C_{pul} = \frac{1}{L} \cdot \frac{\Delta V_{il}}{\Delta P_T} \quad (13)$$

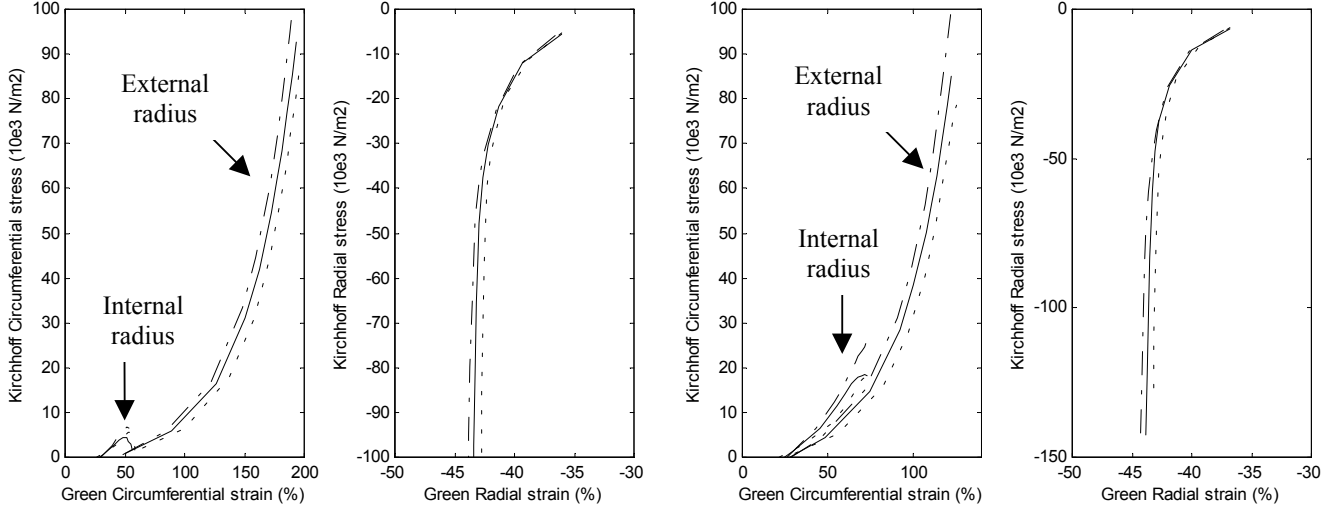


Fig.4 Circumferential and radial stress-strain relationships with reference to unloaded (left) and zero-stress (right) initial states. Dotted, continuous and dashed lines correspond to $L_{FV} - 3\%$, L_{FV} and $L_{FV} + 3\%$ respectively. Circumferential stress-strains curves are given at internal and external radius.

where D_{syst} , D_{diast} are external diameters respectively at representative values of systolic and diastolic transmural pressures P_{syst} , P_{diast} , and V_{il} is the intra-luminal volume.

The geometrical dimensions (D_u , h_u , L_u) were calculated as the mean average of 8 values of diameter and 16 values of thickness measured on each image of unloaded ring and for 3 adjacent rings (around the site of observation) of every specimen. V_w was then determined allowing to calculate h from the values of D as a function of transmural pressure P_T and *in vitro* length L of the segment.

Finally, in order to investigate the residual strains in the vascular wall [7,17,26], the inner and outer arc lengths and the thickness were measured from digital images of zero-stress state open rings of arteries. Arcs measurement of the open sectors was approximated for each image by 16 segments of lines (error less than 1%).

III. RESULTS

A. Performances Of The Experimental Device

A resolution better than 0.1% of Full Scale (FS) was achieved with a high linearity for every channel as shown on Fig.2 (coefficient of regression $r^2 > 0.999$ for a linear regression using least squares method). Very good reproducibility and high precision were obtained considering the low spreading-out of systematic (absolute) and random errors ($n = 16$, Standard Deviation $SD < 0.1\%$). Results from 4 hours loading studies showed overall errors levels of less than 1%.

B. Mechanical Properties Of Common Carotid Arteries

1) Residual Strains

In this study, the average measured wall thickness of the tested segments of CCA in unloaded state was $0.98 \text{ mm} \pm 0.18 \text{ mm}$ for an average external diameter value of $5.3 \text{ mm} \pm 0.8 \text{ mm}$. A mean longitudinal stretching ratio $\lambda_{zz} = L_{FV}/L_u$

of 1.43 ± 0.2 was obtained from the initial dissected segments while a mean stretching ratio of 1.58 ± 0.08 for $\lambda_{zz} = L_{FV}/L_u$ was measured from the tests conditions for L_{FV} lengths of 32, 33, 42, 67 and 82 mm.

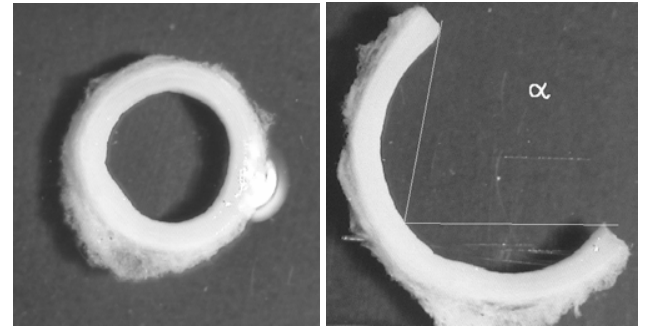


Fig.3 Images of a ring of a tested sheep CCA in unloaded state (left) with $h_u = 0.97 \text{ mm}$, $C_u = 10.95 \text{ mm}$ (inner) and 18.48 mm (outer), and in zero-stress state (right) with $\alpha = 80^\circ$, $h_0 = 1.23 \text{ mm}$, $C_0 = 13.01 \text{ mm}$ (inner) and 17.16 mm (outer).

Fig.3 above presents an example of images of a ring in unloaded state (used for the measurement of thickness h_u and diameter D_u) and of the same ring in zero-stress state (after radial cut) characterised by an opening angle of $\alpha = 80^\circ$. The average value of opening angle obtained from 22 rings of CCA was $\alpha = 85^\circ \pm 27^\circ$ (mean \pm SD). Mean circumferential stretching ratios $\lambda_{\theta\theta} = C_u/C_0$ of 0.88 ± 0.05 and 1.07 ± 0.03 were measured at inner and outer surfaces respectively. A mean radial (thickness) stretching ratio of 0.93 ± 0.1 for $\lambda_{rr} = h_u/h_0$ was also found.

2) Stress-Strain Relationships

The values of fitting coefficients obtained from the optimisation process are provided in Table 1. The comparison of their values for each specimen between unloaded and zero-stress initial reference states shows a

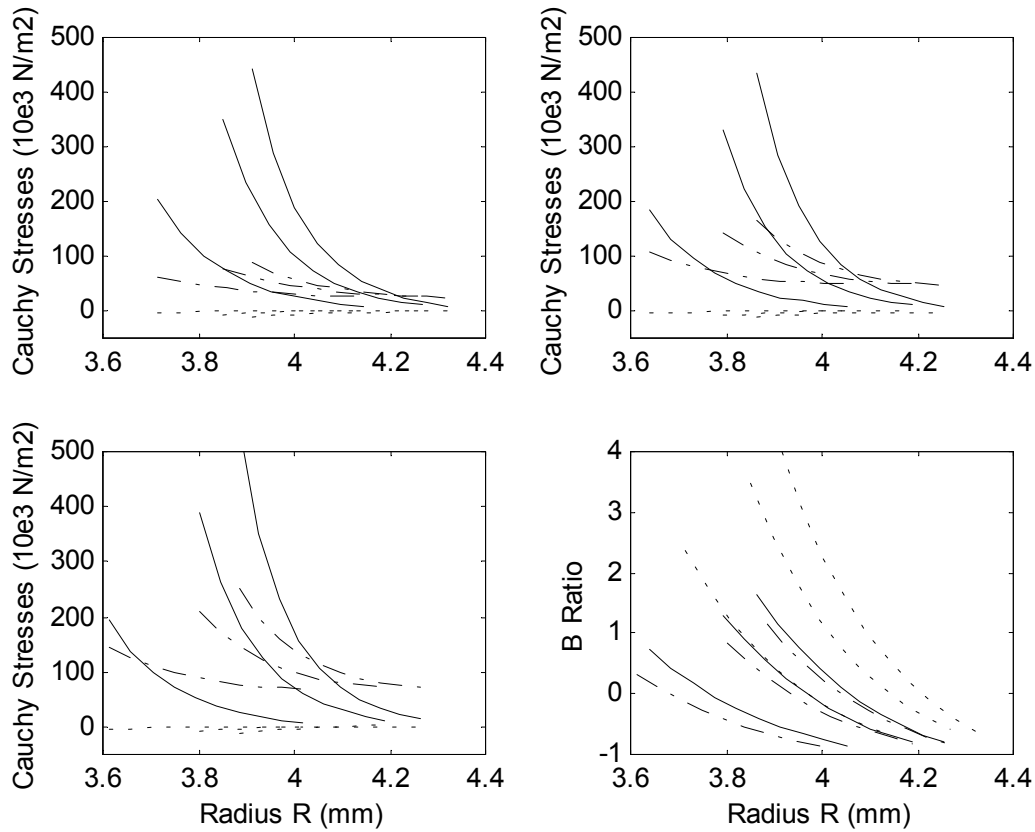


Fig.5 : Distribution of Cauchy stresses in the wall of a sheep CCA with reference to unloaded state
 Radial (dotted lines), longitudinal (dashed lines) and circumferential (continuous lines) stresses curves are represented at 60 mmHg (top left), 100 mmHg (top right) and 140 mmHg (bottom left) for the 3 different lengths of test $L_{FV} - 3\%$, L_{FV} , $L_{FV} + 3\%$ (sets of curves shifted to the right)
 B ratio curves are plotted (bottom right) for the corresponding values of pressure and lengths $L_{FV} - 3\%$ (dotted lines), L_{FV} (continuous lines) and $L_{FV} + 3\%$ (dashed lines)

similar variation tendency with c and a_{0z} decreasing, a_{zz} increasing slightly and $a_{\theta\theta}$ being multiplied by a factor of 1.2 to 2.

Based on these parameters values, circumferential and radial stress-strain relationships were obtained. From the example of specimen N°1, they are plotted in Fig.4 for the 3 lengths of tests and the characteristics in circumferential direction are represented at internal and external radius. As far as Kirchhoff stresses are concerned, they are of the same order of magnitude in circumferential and radial directions. Maximum circumferential stress at outer surface is about 20 times higher than maximum stress at inner surface with unloaded reference while this ratio falls to about 5 with zero-stress reference (stress level at external radius slightly decreased and stress level at internal radius widely increased). Circumferential strains are reduced by nearly a half at the external surface and increased by 50% at the internal surface from unloaded to zero-stress initial configuration, while radial strains stay the same. The increasing length ($L_{FV} - 3\%$, L_{FV} , $L_{FV} + 3\%$) of the tested specimen is expressed by a diminution of the circumferential strains and a slight increase of the radial ones.

3) Stresses And Strains Distribution In The Wall

Cauchy stresses radial distribution in radial, circumferential and longitudinal directions are drawn at each length of test and for 3 values of pressure (60, 100 and 140 mmHg) in Fig.5 (unloaded reference state) and Fig.6 (zero-stress reference state). As shown on Fig.5, at internal radius, high values of circumferential stress are obtained ($200 \times 10^3 \text{ N/m}^2$ to $500 \times 10^3 \text{ N/m}^2$ depending on pressure and length), and values of longitudinal stress are lower ($75 \times 10^3 \text{ N/m}^2$ to $250 \times 10^3 \text{ N/m}^2$) but increase significantly with longitudinal stretch and pressure in comparison to circumferential stress. The maximal amplitudes of radial stress represent less than a tenth of the two other components. In the case of zero-stress initial state (Fig.6), we may notice similar global tendencies but lowered values of internal circumferential and longitudinal stresses ($125 \times 10^3 \text{ N/m}^2$ to $375 \times 10^3 \text{ N/m}^2$ and $50 \times 10^3 \text{ N/m}^2$ to $200 \times 10^3 \text{ N/m}^2$ respectively), and increased (non zero) external stresses, particularly for circumferential ones (of the order of about $50 \times 10^3 \text{ N/m}^2$ to $75 \times 10^3 \text{ N/m}^2$). Radial stresses still represent the same small proportion.

In order to compare the two major stress components i.e. the longitudinal and the transversal elastic behaviour, we also defined the *B ratio* (which radial distribution is

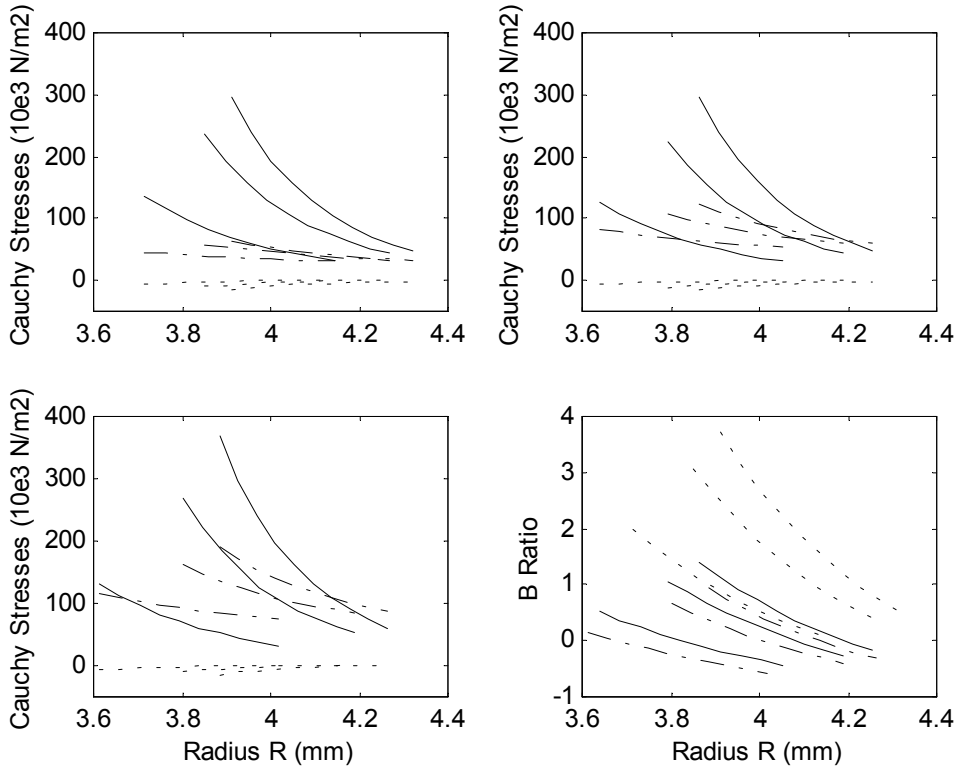


Fig.6 : Distribution of Cauchy stresses in the wall of a sheep CCA with reference to zero-stress state
Radial (dotted lines), longitudinal (dashed lines) and circumferential (continuous lines) stresses curves are represented at 60 mmHg (top left), 100 mmHg (top right) and 140 mmHg (bottom left) for the 3 different lengths of test $L_{FV} - 3\%$, L_{FV} , $L_{FV} + 3\%$ (sets of curves shifted to the right)
B ratio curves are plotted (bottom right) for the corresponding values of pressure and lengths $L_{FV} - 3\%$ (dotted lines), L_{FV} (continuous lines) and $L_{FV} + 3\%$ (dashed lines)

represented on both figures 5 and 6) as the ratio of the difference between circumferential and longitudinal stresses to the longitudinal stress. We may observe that all *B ratio* curves vary non-linearly in the same way, that is to say mainly from positive to negative values.

Of a particular interest, the zero-crossing point highlights the spatial place in the wall where the circumferential stress (decreasing from inner to outer radius) starts to be lower than the longitudinal stress (also decreasing from inner to outer radius but to a lower level). For example, if we consider the curves at 100 mmHg pressure, we may observe that this point is situated at about $R_i + 0.7h$ for $L_{FV} - 3\%$ and L_{FV} , and $R_i + 0.5h$ at $L_{FV} + 3\%$. Considering the corresponding curves with reference to the zero-stress state, this point does not exist for $L_{FV} - 3\%$ and is situated at about $R_i + 0.7h$ for L_{FV} , and $R_i + 0.5h$ at $L_{FV} + 3\%$. Similar observation can be made when comparing the effect of different levels of pressure at L_{FV} only; the zero-crossing point is located at about $R_i + 0.7h$ for 60 and 100 mmHg, and $R_i + 0.5h$ at 140 mmHg, while taking the zero-stress initial state into consideration leads to a location at $R_i + 0.8h$, $R_i + 0.7h$ and $R_i + 0.45h$ for respective pressures 60, 100 and 140 mmHg.

4) Complementary Parameters

Numerical results are summarised in Tab.2. Values of the pressure-strain elastic modulus E_p are in the same order of magnitude than estimated values of the slopes of the linear higher parts of the circumferential stress-strain curves in Fig.4, i.e. between $100 \times 10^3 \text{ N/m}^2$ and $150 \times 10^3 \text{ N/m}^2$. The values of C_{pul} are not significant enough to distinguish between the various lengths of test. On the contrary, mean value of wall stiffness β is observed to significantly decrease (17.2 to 15.2) with increasing length.

IV. DISCUSSION

Several experimental devices have been built up to apply normal forces to a segment of blood vessel. Most of them used one end-closed specimens of arteries in horizontal test chambers. In those studies, diameter detection measurements were mainly performed by means of a VDA, whereas in open circuit configurations sonomicrometer [30], laser [3] or strain gages [37] were preferred. The longitudinal force [11,35] and extension [22] were measured in some works [6,13,18] but with ends of the segment non-free from natural extension under inflation tests. Inflation protocols were mainly based on static (step by step) pressure or dynamic pressure in the sense of 1Hz sinusoidal (systolic-diastolic) pressure. Only few work was reported [30] on

Tab.2. Mean values of the mechanical parameters of the tested arteries with reference to initial zero-stress state
Numerical values are calculated at transmural pressure P_T between 70mmHg and 100mmHg and given \pm S.D.
(Standard Deviation)

Mechanical Parameters	$L_{FV} - 3\%$	L_{FV} (constant F)	$L_{FV} + 3\%$
λ_{ZZ} longitudinal stretching ratio	1.53 ± 0.08	1.58 ± 0.08	1.63 ± 0.09
$^\circ E_p$ pressure-strain elastic modulus ($10^3 \cdot \text{N/m}^2$)	191 ± 136	173 ± 93	170 ± 88
$^\circ C_{pul}$ Compliance per unit length ($10^{-3} \cdot \text{ml/mm/mmHg}$)	0.53 ± 0.27	0.44 ± 0.15	0.50 ± 0.25
$^\circ \beta$ wall stiffness	17.2 ± 12	15.7 ± 8.5	15.2 ± 7.8

large frequency bandwidth tests (0-200Hz) and none combined all the measurements parameters above-mentioned. As shown in this static study, our vertical set-up offer the tested segments to extend freely under inflation tests while measuring all useful parameters (external diameter, pressure, longitudinal force, temperature) with high precision and reliability. Technological performances of the various components were chosen to allow further dynamic tests in a wide frequency bandwidth.

Mean opening angles measured ($\alpha=85^\circ$), assessing the presence of residual stress and strain in the tested segment, are the same order of magnitude than other published results on rabbit CCA [26] with reported mean values of $\alpha=95^\circ$. In the present study, the residual strains were quantified by simply measuring the retracted axial length, the inner and outer length of arcs, and the thickness of the open sector rings; consequently, they were directly fed into the stretching ratio expressions. The results obtained in the pressure range of test confirm [8,23,35] the role of residual strains in reducing the transmural gradients in strains and stresses, *in vivo*. However, limitations in terms of quantifying the “true” residual state are firstly, the radial distribution of circumferential residual strains is considered as uniform linearly and secondly, radial and circumferential residual stresses are not measured experimentally.

The mean longitudinal stretching ratio $\lambda_{zz}=1.6$ at L_{FV} is somewhat higher than the one calculated from direct excision $\lambda_{zz}=1.43$. Such a difference could be explained by partly, the difficulty of precise measurement of the *in vivo* length of a segment before excision (curvatures) and mainly, the better conformity of L_{FV} to an intrinsic property of the material than to the true *in vivo* length of a segment that is *in situ* constrained by surrounding tissues.

Concerning the values of the fitting parameters determined in this work, they are in good agreement (same order of magnitude) with the values of similar parameters published for bovine [37], dogs [35] or rabbits [8] CCAs. We may add that the introduction of the zero-stress initial state leads to a uniform variation of all parameters. The more significantly affected coefficient is $a_{\theta\theta}$ which increase should compensate the large diminution of maximum circumferential strain values (outer radius).

Numerous reported results from tests (mainly *in vitro*) on canine [3,9,10,12,32,35], rabbit [13,26], rat [5,27,39] and human [18,24,30] CCA are not easy to compare due to differences in mechanical assumptions chosen, expressions of parameters or tests conditions. However, global

tendencies show that *in vivo* extension ratio λ_{zz} is of the order of about 1.6 to 1.7, $E_{\theta\theta}$ is 0.5 to 0.6 *in vitro*, $\sigma_{\theta\theta}$ (mean stress) is 70 to $100 \times 10^3 \text{N/m}^2$ at mean transmural pressure ($400 \cdot 10^3 \text{N/m}^2$ max) and elastic modulus is about 0.5 to $2 \times 10^6 \text{N/m}^2$ *in vitro*. Some of the few mechanical results published on sheep CCA (*in vivo*) reported $\beta=13.6$, $E_p = 160 \times 10^3 \text{N/m}^2$ [28] and $\sigma_{\theta\theta} = 70 \times 10^3 \text{N/m}^2$ [29] at mean transmural pressure. Our results are therefore in good agreement with the fact that arteries become stiffer as they are distended [11] with $17.2 > \beta > 15.2$, $190 > E_p (10^3 \text{N/m}^2) > 170$ for $L_{FV}-3\% < L_{FV} < L_{FV}+3\%$, and 50 (inner radius) $< \sigma_{\theta\theta} (10^3 \text{N/m}^2) < 250$ (outer radius).

Our values of corresponding parameters of more clinical interest are in good correlation with those results; however, we may add that β is observed to be less pressure dependant than C_{pul} , thus giving more discriminating indications on the mechanical behaviour of the artery at different longitudinal extensions, in the physiological range. It can be noticed that relatively high values of SD reflect the natural variability typically observed for such biological specimens.

The three-dimensional approach used allowed us to express the behaviour law in terms of stress-strain relationships in circumferential and radial directions. Our results show that the non-linear region of the stress-strain curves obtained corresponds to the physiological range of pressure, and that the sheep CCA is in general anisotropic (slopes of circumferential and radial stress-strain characteristics are in a ratio of 100) confirming other studies [40]. Beside this, as these segments of arteries undergo large deformations, the corresponding mechanical theory thus needs to be used even if geometrical variations are more difficult to appreciate because of its non-linearity. Results in terms of stresses distribution in the wall confirm the levels of stress are predominant in circumferential and longitudinal direction with non-linear repartition throughout the thickness. We also observed that taking the residual strains into consideration leads to reducing the transmural gradients in stress in both directions.

Among the major results in this study, the *B ratio* allowed us to identify specific spatial location of change in direction of the predominant stress in the wall. Circumferential stress is acting predominantly at the inner surface but its intensity decreases more quickly than the longitudinal stress intensity, therefore implying every unitary volume element radially distributed in the wall to be under these normal stresses with a predominant direction of influence

(amplitude) changing progressively. We observed that the longitudinal stress may become higher (at outer surface) than the circumferential one and the location where this change happens may widely vary from about $R_i + 0.5h$ (higher transmural pressure or longer axial length) to outside the wall (lower pressure or shorter axial length) i.e. no change in major stress direction. These observations could be of particular interest in considering their effects on shear stress in the wall modelled as a multiple layers structure, or on fissuring directions and depths observed in the wall of arteries after specific treatment like cryopreservation [25], one of the possible reasons for rupture of some implanted allografts length determination of allografts.

V. CONCLUSION

On a metrological point of view, priority was to validate performances in static conditions. The experimental system designed allowed the real-time measurement of static parameters according to the need of precision, reproducibility and reliability. The technology used will allow next coming tests to be undertaken in dynamic conditions.

The results obtained in terms of 3D mechanical behaviour and stresses distribution in the sheep CCA artery wall allowed us to highlight and characterise the particular modifications in relative amplitudes of longitudinal and circumferential stresses applied and their location throughout the wall thickness, with reference to unloaded and zero-stress states.

Work is in progress on the application of these tests to human healthy, diseased or cryopreserved (allografts) arteries and their correlation to *in vivo* data obtained from clinical echography.

VI. ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank C. Duvivier, V. Regnault and A. Gerard for their technical help and advice. This work was partly supported by a grant of "Région de Lorraine" (Bioengineering Programme). Referees are also acknowledged for their constructive comments.

VII. REFERENCES

- [1] R.L. Armentano, J.G. Barra, J. Levenson, A. Simon and R.H. Pichel, "Arterial wall mechanics in conscious dogs." *Circ. Res.*, Vol. 76, no. 3, pp. 468-478, 1995.
- [2] W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, J.P. Carteaux, X. Wang and J.F. Stoltz, "Evaluation of a novel instrumental set-up to measure static and dynamic mechanical properties of segments of blood vessels *in vitro* - Preliminary results," in *IEEE Proc. First Joint BMES/EMBS Conf.*, 1999, p. 1344.
- [3] A.M. Brant, V.G.J. Rodgers and H.S. Borovetz, "Measurement *in vitro* of pulsatile arterial diameter using a helium-neon laser," *J. App. Physiol.*, Vol. 62, no. 2, pp. 679-683, 1987.
- [4] L.J. Brossollet, and R.P. Vito, "An alternative formulation of blood vessel mechanics and the meaning of the *in vivo* property." *J. Biomech.*, Vol. 28, no. 6, pp. 679-687, 1995.
- [5] L. Caputo, A. Tedgui, P. Poitevin and B.I. Lévy, "In vitro assessment of diameter-pressure relationship in carotid arteries from normotensive and spontaneously hypertensive rats," *J. Hypertens.*, Vol. 10, suppl. 6, pp. S27-S30, 1992.
- [6] D.V. Carmines, J.H. MacElhaney and R. Stack, "A piece-wise non-linear elastic stress expression of human and pig coronary arteries tested *in vitro*," *J. Biomech.*, Vol. 24, no. 10, pp. 899-906, 1991.
- [7] H.R. Chaudhry, B. Bukiet, A. Davis, A.B. Ritter and T. Findley, "Residual stresses in oscillating thoracic arteries reduce circumferential stresses and stress gradients," *J. Biomech.* Vol. 30, no. 1, pp. 57-62, 1997.
- [8] C.J. Chuong and Y.C. Fung, "Three-dimensional stress distribution in arteries," *Trans. ASME*, Vol. 105, pp. 268-274, 1983.
- [9] R.H. Cox and R.J. Bagshaw, "Effects of hypertension and its reversal on canine arterial wall properties," *Hypertens.*, Vol. 12, pp. 301-309, 1988.
- [10] R.H. Cox, "Comparison of arterial wall mechanics using ring and cylindrical segments," *Am. J. Physiol.*, Vol. 244, pp. H298-H303, 1983.
- [11] P.B. Dobrin, T.H. Schwarcz and R. Mrkvicka, "Longitudinal retractive force in pressurised dog and human arteries," *J. Surg. Res.* Vol. 48, pp. 116-120, 1990.
- [12] P.B. Dobrin, "Biaxial anisotropy of dog carotid artery : estimation of circumferential elastic modulus." *J. Biomech.*, Vol. 19, no. 5, pp. 351-358, 1986.
- [13] K. Fronek, G. Schmid-Schoenbein and Y.C. Fung, "A noncontact method for three-dimensional analysis of vascular elasticity *in vivo* and *in vitro*," *Journal of Applied Physiology*, Vol. 40, no. 4, pp. 634-637, 1976.
- [14] Y.C. Fung, K. Fronek and P. Patitucci, "Pseudoelasticity of arteries and the choice of its mathematical expression," *Am. J. Physiol.*, Vol. 237, pp. H620-H630, 1979.
- [15] Y.C. Fung, "What are the residual stresses doing in our blood vessels?," *Ann. Biomed. Eng.*, Vol. 19, pp. 237-249, 1991.
- [16] Y.C. Fung, *Biomechanics - Mechanical properties of living tissues*. Second Edition, Springer-Verlag, 1993.
- [17] S.E. Greenwald, J.E. Moore, A. Rachev, T.P.C. Kane and J.J. Meister, "Experimental investigation of the distribution of residual strains in the artery wall," *J. Biomech. Eng. - Trans. ASME*, Vol. 119, pp. 438-444, 1997.
- [18] B.S. Gupta and V.A. Kasyanov, "Biomechanics of human common carotid artery and design of novel hybrid textile compliant vascular grafts," *J. of Biomed. Mat. Res.*, Vol. 34, pp. 341-349, 1997.
- [19] F. Hansen, D. Berqvist, P. Mangell, A. Rydén, B. Sonesson and T. Länne, "Non-invasive measurement of pulsatile vessel diameter change and elastic properties in human arteries : a methodological study," *Clin. Physiol.*, Vol. 13, pp. 631-643, 1994.
- [20] K. Hayashi, "Experimental approaches on measuring the mechanical properties and constitutive laws of arterial walls," *J. Biomech. Eng.*, Vol. 115, pp. 481-488, 1993.
- [21] F.P.K. Hsu, A.M.C. Liu, J. Downs, D. Rigamonti and J.D. Humphrey, "A triplane video-based experimental system for studying axisymmetrically inflated biomembranes," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, Vol. 42, no. 5, pp. 442-450, 1995.
- [22] J.D. Humphrey, T. Kang, P. Sakarda and M. Anjanappa, "Computer-aided vascular experimentation : a new electromechanical test system," *Ann. Biomed. Eng.*, Vol. 21, pp. 33-43, 1993.
- [23] J.D. Humphrey, "Mechanics of the arterial wall : review and directions," *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, Vol. 23, pp. 1-262, 1995.
- [24] T. Länne, F. Hansen, P. Mangell and B. Sonesson, "Differences in mechanical properties of the common carotid artery and abdominal aorta in healthy males," *J. Vasc. Surg.*, Vol. 20, pp. 218-225, 1994.
- [25] B. Lehalle, C. Geschier, G. Fiévé and J.F. Stoltz, "Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts," *J. Vasc. Surg.*, Vol. 25, pp. 751-2, 1997.
- [26] X. Li and K. Hayashi, "Alternate method for the analysis of residual strain in the arterial wall," *Biorheol.*, Vol. 55, no. 6, pp. 439-449, 1996.
- [27] O. Lichtenstein, M.E. Safar, E. Mathieu, P. Poitevin and I. Levy, "Static and dynamic mechanical properties of the carotid artery from normotensive and hypertensive rats," *Hypertens.*, Vol. 32, pp. 346-350, 1998.
- [28] P. Mangell, T. Länne, B. Sonesson, F. Hansen and D. Berqvist, "Regional differences in mechanical properties between major arteries - an experimental study in sheep," *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, Vol. 12, pp. 189-195, 1996.

- [29] M. Pagani, I. Mirsky, H. Baig, W.T. Manders, P. Kerkhof and S.F. Vatner, "Effects of age on aortic pressure-diameter and elastic stiffness-stress relationships in unanesthetized sheep," *Circulation Research*, Vol. 44, pp. 420-429, 1979.
- [30] E. Rosset, C. Brunet, R. Rieu, P. Rolland, J.F. Pelissier, P.E. Magnan, P. Foulon, A. Drizenko, M. Laude, A. Branchereau and A. Friggi, "Viscoelastic properties of human arteries. Methodology and preliminary results," *Surg. Radiol. Anat.* Vol. 18, pp. 89-96, 1996.
- [31] G.S. Schajer, S.I. Green and A.P. Davis and Y.N.H. Hsiang, "Influence of elastic nonlinearity on arterial anastomotic compliance," *J. Biomech. Eng.*, Vol. 118, pp. 445-451, 1996.
- [32] F.H. Silver, D.L. Christiansen and C.M. Buntin, "Mechanical properties of the aorta : a review," *Crit. Rev. Biomed. Eng.* , Vol. 17, no. 4, pp. 323-358, 1989.
- [33] H. Stinnett, J. Wheelton and M.L. Hennes, "Dynamic intra vascular pressure harmonic analysis," *ISA Biomed. Sci. Inst.*, Vol. 93, no. 056, pp. 443-450, 1993.
- [34] J.H. Storkholm, O. Frobert and H. Gregersen, "Static elastic wall properties of the abdominal porcine aorta in vitro and in vivo," *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, Vol. 13, pp. 31-36, 1997.
- [35] K. Takamizawa and K. Hayashi, "Strain energy density function and uniform strain hypothesis for arterial mechanics," *J. Biomech.*, Vol. 20, no. 1, pp. 7-17, 1987.
- [36] R.N. Vaishnav and J. Vossoughi, "Incremental formulations in vascular mechanics," *J. Biomech. Eng.*, Vol. 106, pp. 105-111, 1984.
- [37] W.W. Von Maltzahn and W.F. Keitzer, "Experimental measurements of elastic properties of media and adventitia of bovine carotid arteries," *Journal of Biomechanics*, Vol. 17, no. 11, pp. 839-847, 1984.
- [38] D.A. Vorp, K.R. Rajagopal, P.J. Smolinski and H.S. Borovetz, "Identification of elastic properties of homogeneous, orthotropic vascular segments in distension," *J. Biomech.*, Vol. 28, no. 5, pp. 501-512, 1995.
- [39] H.W. Weizsacker and J.G. Pinto, "Isotropy and anisotropy of the arterial wall," *Journal of Biomechanics*, Vol. 21, no. 6, pp. 477-487, 1988.
- [40] J. Zhou and Y.C. Fung, "The degree of nonlinearity and anisotropy of blood vessel elasticity," *P. N. A. S. USA*, Vol. 94, pp. 14255-14260, 1997.



Walter C.P.M. Blondel was born in Nancy, France. He received the engineer degree in electrical engineering from National College of Electrical Engineering in Rouen (ESIGELEC), the MSc degree in optoelectronics from University of Hertfordshire (England) and the PhD degree in Biological and Medical Engineering from the University Henri Poincaré-Nancy1, France.

He is currently a qualified school teacher (agrégé) at the UHP-Nancy1. His research interests are in optoelectronics and systems, and vascular wall rheology.

Jacques Didelon France. He received the biological engineering Polytechnical Institute France.

He is currently a the Laboratory of Instrumentation in in Nancy. His research cells rheology and



was born in Nomeny, PhD degree in from National of Lorraine (INPL),

technical manager of Automated Medical Cancerology (IMAC), interests are in blood photodynamics therapy.



Gérard Maurice was born in Nancy, France. He received the PhD degree in mechanics from National Polytechnical Institute of Lorraine (INPL), France.

He is currently a professor at INPL and in charge of the Department of mathematics at

European College in Material Engineering (EEIGM). His research interests are in numerical mechanics and biomechanics.



Jean-Pierre Carteaux was born in Luxeuil, France. MD. He received the PhD degree in biology and health (cellular biology) from University Henri Poincaré-Nancy1, France.

He is currently a cardiac surgeon at the University Hospital of Nancy and his research interests are in cardiovascular physiology and cardio-pulmonary bypass.



Xiong Wang was born in Chengdu, China. He received the BS degree in fluid mechanics from the University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui province and the PhD degree in mechanical engineering from the National Polytechnical Institute of Lorraine (INPL), France.

He is currently a senior researcher (chargé de recherche) at French National Scientific Research Center (CNRS) and his research interests are in biomechanics and vascular engineering.



Jean-François Stoltz was born in Clermont-Ferrand, France. He received the PhD degree in physics from University of Nancy, France.

He is currently a professor of haematology and bioengineering at Faculty of medicine. He is also director of the University Professional Institute of Health Engineering, in charge of the PhD Biology School of Lorraine and of the department of cell therapy and tissues at the teaching hospital of Nancy. His research interests are mainly in the field of biomechanics, vascular diseases and thrombosis.

II.2 Traitement du Signal, 2006, 23 :213–233

Spectro-imagerie endoscopique d'autofluorescence et cartographie 2D pour la localisation et le diagnostic *in situ* de lésions cancéreuses

Autofluorescence endoscopic spectro-imaging
and 2D-cartography for *in situ* localisation and diagnosis
of cancerous lesions

W. C. P. M. Blondel^{1,2}, Ch. Daul^{1,2}, S. Villette³,
R. Miranda-Luna^{1,2}, Y. Hernandez-Mier^{1,2}, G. Bourg-Heckly³
et D. Wolf^{1,2}

¹ Nancy Université, ² CRAN UMR 7039 CNRS-INPL-UHP, 2 avenue de la forêt 54500 Vandœuvre - Lès-Nancy, France, ³ BioMoCeTi UMR 7033
CNRS-UPMC – génopôle Campus 1, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry Cedex
{walter.blondel,christian.daul,didier.wolf}@ensem.inpl-nancy.fr
g.bourg-heckly@ccr.jussieu.fr

Manuscrit reçu le 8 juillet 2005



Résumé et mots clés

Le diagnostic précoce est le moyen le plus efficace de lutte contre le cancer. Parmi toutes les techniques possibles, les méthodes optiques (photodiagnostic du proche UV au proche IR) présentent des caractéristiques importantes recherchées par les médecins : grande sensibilité, radiations non ionisantes et mesures atraumatiques. Elles sont particulièrement bien adaptées à la détection des cancers des organes creux, par nature superficiels et difficilement décelables en endoscopie classique. Cet article décrit une approche méthodologique fondée sur l'exploitation de l'autofluorescence tissulaire, applicable en endoscopie clinique, et conduisant à l'élaboration d'indicateurs diagnostiques issus des paramètres spectraux. Après un état de l'art sur les méthodes spectroscopiques (LIFS) et d'imagerie endoscopique d'autofluorescence, nous montrons l'efficacité de la LIFS fibrée en terme de sensibilité et de spécificité pour le diagnostic de lésions cancéreuses de l'œsophage (étude clinique sur 25 patients). Nous présentons ensuite les caractéristiques technologiques et le calibrage du prototype d'imageur endoscopique d'autofluorescence développé. Une seconde partie traite du pré-traitement, du recalage et du mosaïquage des images endoscopiques appliqués à la construction automatique d'une image panoramique (cartographie) à partir de séquences vidéos des zones explorées de l'organe. Finalement, en exploitant les informations de fluorescence fournies par l'imageur, la faisabilité d'une superposition des informations spatiale et spectrale est validée sur fantôme.

Spectroscopie *in vivo*, pré-traitement et recalage d'images endoscopiques, mosaïquage, autofluorescence, instrumentation, cancer.

Abstract and key words

Early diagnosis is the most efficient way to struggle against cancer. Among all the existing techniques, optical methods (photodiagnosis from NUV to NIR) show important characteristics required by the physicians : high sensitivity,

non-ionising radiations and non-traumatic measurements. They are particularly well suited to the detection of cancers in hollow organs, that are usually superficial and hardly visible with classical endoscopy. This paper describes a methodological approach based on the use of tissue autofluorescence, applicable in clinical endoscopy, and leading to the definition of diagnosis indicators from the spectral parameters. Following a state-of-the-art on autofluorescence spectroscopic (LIFS) and endoscopic imaging methods, we present the efficiency of fibered LIFS in terms of sensitivity and specificity for the diagnosis of esophagus cancerous lesions (clinical study over 25 patients). We then present the technological characteristics of an autofluorescence endoscopic imaging prototype developed in our labs as well as its calibration. A second part is devoted to endoscopic image registration and mosaicing and to optics aberration correction in perspective of the automatic construction of a panoramic image (cartography) of the organ's explored areas. Finally, exploiting the fluorescence data provided by the imager, the feasibility of the superimposition of spatial and spectral information is validated with a phantom.

In vivo Spectroscopy, endoscopic image registration and pre-processing, mosaicing, autofluorescence, instrumentation, cancer.

Remerciements

Les auteurs remercient Jean-Marie Munier pour sa contribution précieuse à l'ingénierie du dispositif d'imagerie, Yann Burdin pour son aide au recueil des images et Céline Frochot (DCPR – UMR CNRS 7630, Nancy) pour la fourniture du marqueur fluorescent. Les auteurs remercient également le CNRS (département STIC), la Région Lorraine et l'UHP (BQR), ainsi que la ligue régionale de lutte contre le cancer (CD54, CD52) pour leur soutien financier substantiel.



1. Introduction

1.1. Contexte et enjeux médico-économiques

L'ensemble des cancers représente la deuxième cause de mortalité dans les pays industrialisés. Plus de 85 % des cancers prennent naissance dans les couches superficielles (épithélium) des organes du corps humain dont 50 % au sein des muqueuses des organes creux, [Skala, Backman]. Dans ce cas, l'endoscopie est indiquée pour l'examen et la détection des lésions des voies aériennes (trachée, bronches) et digestives supérieures (œsophage, estomac, duodénum) et basses (intestin, côlon), ainsi que des voies uro-génitales (urètre, vessie, utérus). Pour ces cancers d'origine épithéliale, la détection à un stade précoce est un enjeu majeur car elle permet une augmentation importante des chances de guérison tout en utilisant des traitements moins agressifs et aux coûts réduits. Si l'endoscopie conventionnelle en lumière blanche permet d'identifier les cancers suffisamment avancés (modification significative de l'aspect macroscopique de la muqueuse), la visualisation *in situ* des états précancéreux et cancéreux précoces est en revanche plus difficile.

Actuellement, les stratégies courantes de surveillance et de détection de ce type de lésion préconisent des endoscopies périodiques (1 à 3 ans). L'examen visuel, en lumière blanche, de l'aspect macroscopique de la surface de la muqueuse permet de

repérer les zones suspectes visibles qui seront alors biopsiées pour déterminer la nature histo-pathologique exacte du tissu. En l'absence d'anomalie remarquable, un certain nombre de biopsies est réalisé de façon plus ou moins aléatoire. Pour certaines pathologies, un quadrillage biopsique systématique est recommandé sur l'ensemble de la muqueuse (exemple : protocole Seattle, tous les 2 cm pour l'œsophage) [Kara]. Mais cette procédure lourde possède une sensibilité médiocre du point de vue clinique. Par ailleurs, certaines lésions (tumeurs de la vessie par exemple) sont par nature multifocales, ce qui rend les résections délicates car d'autres tumeurs peuvent être présentes à des endroits où elles ne sont pas encore visibles [Demos].

1.2. Intérêt du photodiagnostic

L'application de l'optique-photonique aux sciences de la vie (biophotonique), en particulier dans le domaine du spectre électromagnétique allant de l'UltraViolet (UV) à l'InfraRouge (IR), vise à exploiter les interactions de la lumière avec les tissus biologiques à des fins thérapeutiques (chirurgie laser, thérapie photodynamique, photothérapie), d'analyses biologiques (microscopies optiques, micromanipulation laser, biopuces...) et diagnostiques (caractérisation des tissus sains et pathologiques). Les méthodes de diagnostic optique (photodiagnostic) présentent des avantages par rapport aux méthodes de diagnostic clas-

siques (rayons X, IRM...), liés à leur grande sensibilité, à la nature non ionisante de la lumière et au caractère atraumatique (non invasif) de la mesure. Les propriétés optiques des tissus biologiques sont fonction de leur composition biochimique et de leur structure cellulaire et tissulaire. Les mesures optiques ont ainsi un fort potentiel de développement d'outils non invasifs de diagnostic médical *in vivo in situ* (biopsie optique) [Thueller, Rollins]. Différents types de propriétés optiques peuvent être mesurées en exploitant les phénomènes de fluorescence, d'absorption, de diffusion élastique et inélastique, qui fournissent des informations complémentaires [Bigio]. Au cours des dix dernières années, la sensibilité et la spécificité en terme de détection de néoplasies précoces ont été évaluées pour plusieurs nouvelles techniques endoscopiques de diagnostic, les plus répandues étant l'imagerie de fluorescence et d'autofluorescence et la spectroscopie d'autofluorescence et de diffusion [Benavides, Demos, Goujon].

En cancérologie, la spectroscopie ponctuelle des tissus (surface sondée de l'ordre du mm^2) a pour objectif la détection de lésions précancéreuses et cancéreuses précoces à un stade où elles sont encore non décelables pour l'endoscopie en lumière blanche. En permettant de guider les biopsies, la méthode doit conduire à une amélioration significative de la sensibilité, voire de la spécificité du diagnostic endoscopique et aider à la détermination de marges tumorales plus précises au niveau thérapeutique et chirurgical [Thueller]. Les différentes méthodes de spectroscopie optique actuellement en cours d'évaluation utilisent la fluorescence, la diffusion élastique et/ou la diffusion Raman. Historiquement la première à être utilisée à des fins diagnostiques, la fluorescence reste aujourd'hui le phénomène le plus exploité et donne lieu à la majorité des travaux de recherche en photodiagnostic, tant fondamentaux que cliniques [Ramanujam-00]. L'approche spectroscopique de par sa grande résolution spectrale, constitue une étape primordiale de caractérisation spectrale de l'émission d'autofluorescence des tissus humains aux différents stades du développement tumoral. Celle-ci permet ensuite le développement de systèmes d'imagerie (endoscopique) possédant une plus grande résolution (couverture) spatiale (surface observée de l'ordre du cm^2) et une résolution spectrale réduite (quelques bandes de longueurs d'ondes choisies). Elle permet notamment de préciser et d'optimiser le seuillage des images de rapports de bandes spectrales (vert/rouge par exemple) compte tenu des fluorophores endogènes d'intérêt [Goujon, Haringsma].

Lors d'un examen endoscopique classique de la paroi interne d'un organe creux, le praticien réalise un premier diagnostic et enregistre une ou plusieurs séquences d'images de plusieurs minutes. Cependant, ce type de support vidéo reste peu exploité en post-opératoire (très grand volume d'information, recherche fastidieuse dans les séquences, durée des séquences de plusieurs minutes, etc.). Généralement, le médecin repère les sites suspects qu'il a localisés et les biopsies effectuées en les re-dessinant sur un croquis ou une photographie de l'organe, support papier auquel il peut alors se référer pour son compte-rendu opératoire et dans le cas d'examen répétés du même

patient (contrôle de l'évolution de la maladie et/ou du traitement). Actuellement, aucune méthode n'existe pour fournir au clinicien de façon automatique un support global, pratique et combinant les informations spatiales et spectrales (sous la forme d'une carte ou de quelques cartes 2D de zones partielles de l'organe). Cette approche permettrait un gain de temps et d'efficacité substantiels, ainsi qu'une réduction des données redondantes (recouvrement spatial des images consécutives dans la séquence vidéo) [Miranda-05].

L'objectif de cet article est de présenter les résultats de travaux menés dans le domaine de la spectro-imagerie endoscopique d'autofluorescence appliquée à la détection, à la localisation et au diagnostic de lésions cancéreuses. Partant de résultats de caractérisation spectrale de tissus sains et tumoraux obtenus en spectroscopie d'autofluorescence *in vivo in situ*, nous présentons les principales caractéristiques du système d'imagerie endoscopique d'autofluorescence développé ainsi qu'une approche originale pour combiner des informations spatiale et spectrale en reconstruisant des images panoramiques de la surface des organes explorés et en y superposant les informations spectrales d'intérêt.

2. État de l'art

2.1. Caractéristiques histo-pathologiques des tissus

La structure du tissu muqueux comprend un épithélium avasculaire, constitué d'une ou plusieurs couches de cellules épithéliales jointives, reposant sur une membrane basale qui les sépare du tissu conjonctif sous-jacent, le chorion, contenant des protéines structurelles (collagène) et des vaisseaux sanguins. L'épithélium se renouvelle constamment : les cellules qui reposent sur la membrane basale donnent naissance à d'autres cellules qui se différencient à mesure qu'elles migrent et gagnent progressivement la surface où elles remplacent les cellules anciennes qui sont éliminées. Les lésions précancéreuses sont des anomalies histologiques à partir desquelles un cancer peut se développer, la cancérisation étant un phénomène le plus souvent lentement évolutif. Le principal type de lésion précancéreuse est la dysplasie qui est une altération de la différenciation épithéliale : les cellules atypiques vont progresser vers la surface de l'épithélium depuis l'assise de la membrane basale ; longtemps réversible, la dysplasie est potentiellement maligne avec plusieurs degrés : classe I ou légère, classe II ou modérée, classe III ou sévère. La dysplasie sévère (dite aussi de haut grade) représente l'aspect le plus évolué pour une lésion précancéreuse épithéliale. À ce stade, la prolifération de cellules atypiques a envahi toute l'épaisseur de l'épithélium mais sans effraction de la membrane basale donc sans contact avec le système vasculaire et sans risque de diffusion métastatique. À partir du moment où il y a rupture de la membrane basale et infiltration de cellules malignes dans le chorion, on est en présence d'un

carcinome microinvasif. L'aspect clinique des dysplasies et des carcinomes microinvasifs est très divers et, dans de nombreux cas, l'épithélium paraît normal à l'examen endoscopique en lumière blanche. C'est dans ce cadre que les techniques de détection optique prennent tout leur intérêt.

L'épaisseur des épithéliums varie de quelques dizaines de micromètres à plusieurs centaines suivant les organes (50 pour le côlon, environ 150-200 pour l'œsophage). La profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus dépend de la longueur d'onde ; elle peut aller de quelques 10 microns dans l'UV moyen à plusieurs centimètres dans le proche IR. Utilisant des longueurs d'onde d'excitation dans l'UV moyen et le bleu, la spectroscopie d'autofluorescence est donc particulièrement bien adaptée au sondage des muqueuses.

2.2. Spectroscopie de fluorescence et d'autofluorescence appliquée au diagnostic précoce

La spectroscopie de fluorescence induite par excitation lumineuse (ou LIFS acronyme pour Light Induced Fluorescence Spectroscopy) donne une information liée à la nature biochimique et structurale du tissu qui est fonction de son état pathologique. Compte tenu notamment des faibles profondeurs de pénétration des longueurs d'onde d'excitation intéressantes et utilisables en clinique (UV-visible 350-450nm), la spectroscopie de fluorescence présente un intérêt particulier dans le cadre de la détection de lésions superficielles d'organes accessibles par les voies naturelles (voies aériennes, digestives et uro-génitales). Il existe différentes approches possibles de diagnostic par fluorescence, fondées respectivement sur l'exploitation de fluorophores exogènes (administrés au patient), endogènes (naturellement présents dans les tissus biologiques) et induits de manière exogène avec un « précurseur ». Dans le premier cas, la méthode consiste à administrer au patient un fluorophore qui présente une affinité préférentielle pour les tissus tumoraux et à provoquer sa fluorescence. Dans le second cas, on exploite le fait que la fluorescence naturelle d'un tissu contient de l'information sur sa nature histologique en mesurant directement l'autofluorescence du tissu excité à une longueur d'onde particulière. Enfin, dans le dernier cas l'administration exogène d'un précurseur (tel que l'ALA ou ses dérivés) provoque une accumulation temporaire d'un fluorophore naturellement présent dans les tissus, la Porphyrine IX (PpIX), préférentiellement dans les cellules tumorales ; une excitation appropriée provoque alors la fluorescence rouge de la PpIX, révélant les zones anormales. La spectroscopie d'autofluorescence est préférentiellement mise en œuvre compte tenu des contraintes liées à l'utilisation en clinique de marqueurs (autorisations difficiles à obtenir, sélectivité moyenne, photosensibilité résiduelle). La faible intensité des signaux d'autofluorescence mesurés en émission est relativement bien compensée par la sensibilité des capteurs existants.

Le tableau 1 recense les principaux fluorophores endogènes avec différentes valeurs de couples de longueurs d'onde d'excitation – émission, sachant que les bandes totales d'absorption et d'émission sont relativement larges (de l'ordre d'une centaine de nm).

Tableau 1. Les colonnes λ_{abs} et λ_{em} donnent respectivement les domaines spectraux dans lesquels se situent les maxima d'absorption et d'émission des principaux fluorophores endogènes des tissus biologiques (références issues ou citées de [Kara, Padilla, Ramanujam-00]).

Fluorophores	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)
Collagène	270-285	310
	325-340	390-405
Élastine	260-290	340
	325-350	400-410
	425-460	490-520
NAD(P)H	290	440-460
	340-350	
Flavines	440-450	520-535
Porphyrines	400	630-635
	450	675-690
Tryptophane	275-280	350

Un grand nombre d'études a montré que les tissus normaux, métaplasiques et dysplasiques présentent des différences au niveau des spectres d'autofluorescence, d'absorption et de diffusion, dans la bande Visible – Proche IR. Ces modifications spectrales sont associées aux altérations des types, des concentrations et de la micro-distribution des constituants [Kara, Kumar, Thueller, Bigio, Kortum]. Les fluorophores ayant une localisation tissulaire et des fonctions biologiques différentes, l'autofluorescence est plus particulièrement sensible aux variations du métabolisme cellulaire entre cellules saines et cancéreuses à travers l'émission des co-enzymes flavines et NAD(P)H (formes phosphorylée et non-phosphorylée du Nicotinamide Adénine Dinucléotide), de l'organisation structurale du tissu à travers l'émission du collagène (épaississement de la muqueuse et modification de l'architecture de la matrice extra-cellulaire) et de la concentration en hémoglobine de la muqueuse liée à l'activité tumorale. Le choix des longueurs d'onde à utiliser pour sonder le tissu dépend donc de la profondeur de pénétration recherchée, du nombre de fluorophores que l'on désire exciter et des caractéristiques optiques du tissu.

La spectroscopie de fluorescence induite par excitation lumineuse monochromatique (laser ou source large bande filtrée) a été largement étudiée et mise en œuvre au moyen de systèmes de spectrofluorimétrie utilisant de petites sondes à multiples fibres optiques (1 fibre centrale pour l'excitation et plusieurs fibres pour la collecte de l'émission) amenées au contact du tissu, en passant par le canal instrumental des endoscopes (diamètre inférieur à 3 mm) [Kobayashi, Brewer, Zellweger, Ramanujam-00, Koenig, Anidjar]. Chaque spectre $S(k\lambda)$ acquis

avec ces systèmes (typiquement 400 à 1000 points) fournit une information ponctuelle sur une superficie limitée par le diamètre de la fibre optique utilisée pour l'acquisition (quelques centaines de microns) et une profondeur (quelques centaines de microns) qui dépend de la longueur d'onde d'excitation et du diamètre de la fibre. Différentes études montrent que, dans un certain nombre de cas *in vitro* et *in vivo*, la spectroscopie de fluorescence en excitation continue (résolution spectrale ou spatiale) – mesures comparatives d'intensités à des longueurs d'ondes spécifiques – est plus efficace que la spectroscopie de fluorescence résolue temporellement – mesure des durées de vie de fluorescence après excitation impulsionnelle – pour différencier de manière significative des lignées cellulaires ou des tissus normaux et des cellules ou tissus tumoraux, ou des états dysplasiques différents [Huttenberger, Pfefer, Pradhan, Zellweger]. À partir de l'analyse comparative des spectres provenant des sites tissulaires sains et tumoraux (différences d'intensité et de forme), il est possible de déterminer des indicateurs spectraux permettant de les différencier. Classiquement, les spectres d'autofluorescence *in vivo* sont tout d'abord normalisés par rapport au pic de fluorescence et/ou à l'aire sous la courbe pour tenir compte notamment des variations de la source et de la géométrie du capteur (rapport d'intensité de fluorescence à différentes longueurs d'ondes, rapport des intensités sur la surface totale sous le spectre). Afin d'améliorer le rapport signal sur bruit, chaque spectre enregistré est la moyenne de 3 à 5 spectres acquis. Le nombre de points par spectre (plusieurs centaines) et le nombre de spectres recueillis (plusieurs dizaines à plusieurs centaines en fonction du nombre de sites), parfois multiplié par le nombre de longueurs d'onde d'excitation et/ou par le nombre de mesures répétées sur le même site (suivi d'une évolution pathologique sur modèle animal par exemple) conduisent à traiter un volume de données relativement important. Jusqu'à présent, les critères de différenciation sont dans leur grande majorité fondés sur l'analyse statistique simple (tests de Student et Fischer par exemple) de ratios d'intensités à 2 longueurs d'ondes choisies dans les spectres [Zheng]. Depuis peu, différentes méthodes d'analyses statistiques et de classification sont plus largement mises en œuvre pour définir des algorithmes de diagnostic différentiel (sain/pathologique). Après une étape initiale de réduction des données par une Analyse en Composantes Principales (ACP), une sélection des composantes principales montrant les différences statistiquement les plus significatives pour différencier tissu dysplasique et sain peut être réalisée (par exemple : tests de Wilcoxon appariés et non-appariés). Quelques travaux ont été publiés autour de l'optimisation de cette classification en utilisant des méthodes comme l'Analyse Discriminante Linéaire (ADL) ou les Machines à Support Vectoriel Linéaire (MVSL) [Kara, Skala, Palmer, Ramanujam-00]. Mais les procédures pour parvenir à ces résultats sont lourdes car il faut d'une part, disposer de jeux d'entraînement et de validation de taille suffisante et d'autre part, obtenir une évaluation fiable de la procédure de référence pour la validation (« gold standard ») en l'occurrence l'analyse histopathologique.

En plus du taux de classification, les informations finales essentielles sont la sensibilité (probabilité d'un test positif en présence de lésion) et la spécificité (probabilité d'un test négatif en l'absence de lésion). Les résultats des travaux les plus récents [Svistun, Goujon, Palmer, Ferris, Bourg-Heckly, Heintzelman] ont permis d'obtenir des augmentations de sensibilité de 75 % à plus de 90 % et de spécificité de 45 % à plus de 85 % notamment en optimisant les longueurs d'onde d'excitation. Les travaux menés en LIFS à multiples longueurs d'onde d'excitation ont montré que les bandes optimales pour développer des algorithmes de diagnostic sont 280-300, 330-340, 350-380 et 400-450 nm [Chang, Coghlan], bien qu'il ne semble pas exister de différences significatives en terme de sensibilité et de spécificité pour les excitations à 337, 380 et 460 nm [Ramanujam-96]. Par contre, les excitations autour de 410 nm ou bien autour de 300 nm semblent être plus efficaces pour le diagnostic entre tissus sains et tissus dysplasiques *in vitro* [Zheng, Anidjar] comme *in vivo* sur l'animal [Skala] ou sur l'homme [Kara, Zellweger]. Plusieurs problèmes restent à résoudre dans l'application actuelle de ces techniques spectroscopiques d'autofluorescence. D'une part, leur sensibilité aux modifications tissulaires notamment inflammatoires entraîne de nombreux faux-positifs (test positif en l'absence de lésion) et d'autre part, leur capacité de détection des différents stades d'évolution dysplasique doit être améliorée. Deux approches complémentaires sont actuellement étudiées [Muller, Drezek, Georgakoudi-01]:

- l'exploitation et la combinaison de données spectrales issues d'autres modalités utilisables simultanément (spectroscopies de diffusion élastique, Raman, recouvrement de fluorescence après photoblanchiment FRAP) afin d'améliorer la spécificité de la mesure et ainsi l'efficacité du diagnostic (fusion de données),
- la modélisation des interactions de la lumière avec les tissus en vue d'identifier leurs propriétés optiques et remonter ainsi aux spectres intrinsèques des structures morphologiques [Zonios] voire des constituants d'intérêt au sein des couches tissulaires considérées (NAD(P)H et flavines dans l'épithélium, collagène dans le chorion). Certaines études récentes indiquent que l'autofluorescence provenant de la sous-surface du tissu épithélial (couche basale) semble plus informative que celle de surface [Skala]. Les méthodes actuelles consistent à simuler la distribution spatiale de l'intensité lumineuse et à la faire correspondre aux mesures expérimentales de variations spatiales de la réflectance en optimisant les valeurs des paramètres optiques : coefficients d'absorption ($\mu_a(\lambda)$), de diffusion ($\mu_s(\lambda)$) et d'anisotropie ($g(\lambda)$) en fonction de la longueur d'onde, spectres d'excitation – émission des fluorophores. Compte tenu de la complexité du milieu (multicouches) et des contraintes géométriques (faibles distances entre fibres d'excitation et d'émissions), les simulations statistiques (Monte Carlo) de propagation de photons donnent des résultats plus précis que les simulations basées sur la résolution de l'équation de diffusion, en particulier pour les milieux turbides et très absorbants [Liu].

S

2.3. Imagerie endoscopique de fluorescence multi-bandes

De la même façon que pour la biopsie mécanique, il n'est pas envisageable d'effectuer en clinique des biopsies optiques point par point (surface sondée de l'ordre du mm^2) sur toute la surface de l'organe à examiner. Il existe donc un risque de non détection d'une zone maligne lié à la faible couverture spatiale de la technique. Ce problème a motivé le développement de systèmes d'imagerie endoscopique exploitant les résultats des analyses spectrométriques pour fournir une information de nature spectrale sous la forme d'images acquises dans différentes bandes (résolution de 2 ou 3 bandes), de même taille et résolution spatiale qu'en lumière blanche classique. Typiquement, la longueur d'onde de transition en émission se situe vers 590 nm (excitation entre 400 et 450 nm) [Zellweger]. Plusieurs travaux montrent l'intérêt de l'utilisation de la fluorescence en imagerie endoscopique pour améliorer la perception de contraste entre zones saines et tumorales des muqueuses sur tissus frais excisés [Svistun] et sur tissus *in vivo in situ* [Kara, Zeng]. Sur ce point, de nombreuses études recensées par [Kara] ont déjà été menées sur l'utilisation conjointe de l'imagerie à base de fluorescence et de l'endoscopie conventionnelle pour la détection de lésions néoplasiques intraépithéliales bronchiques (plusieurs milliers de patients). L'endoscopie de fluorescence lumière-induite permet de visualiser une information spatiale de fluorescence dans le champ de vision de l'endoscope. La figure 1 représente le schéma de principe de ce type de système, constitué des éléments de base suivants :

- une ou plusieurs sources de lumière large bande (lampe Xénon généralement) associée à des filtres interférentiels passe-bande pour sélectionner une bande précise (plus ou moins étroite) de longueur d'onde d'excitation λ_{ex} .
- une ou plusieurs caméras CCD pour former les images en lumière blanche et en fluorescence associées à différents filtres passe-bande aux longueurs d'onde d'intérêt choisies.
- un filtre passe-haut placé sur la voie d'acquisition d'autofluorescence pour filtrer la lumière d'excitation rétro-diffusée.
- une colonne de vidéo-endoscopie classique (moniteur, enregistreur, fibroscope).

En principe, les systèmes exploitant les signaux d'autofluorescence (faibles intensités) nécessitent l'emploi de caméras très sensibles.

Quatre industriels associés à des équipes de recherche ont développé des solutions technologiques en imagerie endoscopique de fluorescence qui ont permis d'aboutir à la fabrication et à la commercialisation d'instruments à usage clinique : Xillix Onco-LIFE (Canada) [Kara, Takehana], Pentax SAFE-3000 (Japon) [Kakihana], Storz D-Light/AF (Allemagne) [Haussinger] et le système DAFE de la société Richard Wolf (Allemagne) [Wagnieres-00, Goujon]. Les principales caractéristiques de ces systèmes sont :

- une excitation dans le violet-bleu (380-450 nm ou 420-480nm, lampe Xénon 300 W filtrée).
- une ou deux bandes d'acquisition (500-600 nm uniquement ou vert 480-520 nm et rouge > 630 nm).

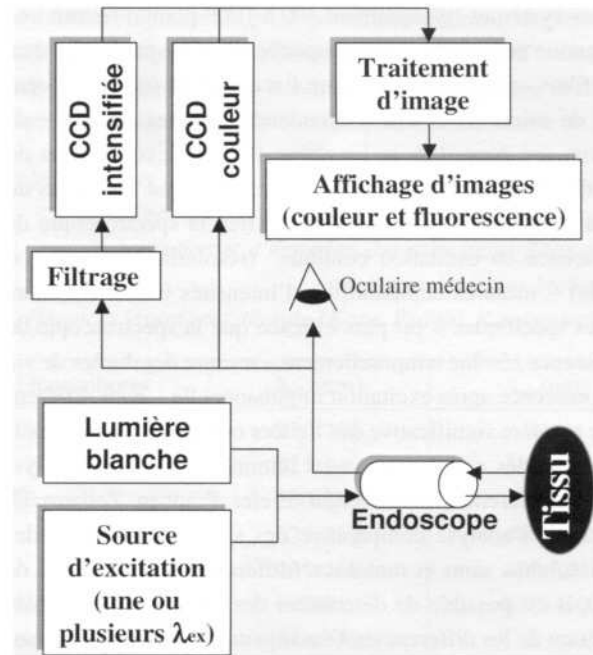


Figure 1. Schéma de principe représentatif d'un système d'imagerie endoscopique en fluorescence induite basé sur la détection multi-bandes

- l'affichage en temps réel de l'image en fausses couleurs (à partir de rapports de bandes) sur laquelle les zones anormales apparaissent en « négatif » ou en noir par rapport à l'épithélium normal.

- la commutation à la demande du mode lumière blanche au mode autofluorescence.

Pour l'instant, ces systèmes sont principalement appliqués à la détection de cancers et de lésions précancéreuses dans les bronches, la vessie et les voies digestives.

Les développements les plus récents concernent l'utilisation séquentielle d'excitations rouge, verte (réflectances) et bleue (autofluorescence) et l'exploitation des filtres standard de caméra tri - CCD pour former les images multi-bandes [Bergman]. Des améliorations du contraste sont proposées soit en utilisant une quantité optimisée de lumière rouge rétro-diffusée soit en réduisant la largeur de la bande d'excitation (contraste maximal observé pour 405 nm). Les résultats les plus significatifs obtenus pour des explorations trachéo-bronchiques chez l'homme ont permis d'atteindre une valeur prédictive positive (probabilité que le sujet au test positif soit malade) de 75 % en autofluorescence seule et de 100 % en autofluorescence et lumière blanche combinées [Goujon, Zheng]. Afin de continuer à améliorer l'efficacité de la méthode, les études en spectroscopie point à point doivent être poursuivies pour caractériser les différents stades de cancérisation.

Compte tenu de la nécessité de disposer d'une instrumentation utilisable en vidéo-endoscopie clinique, aucun algorithme de traitement d'images autre que celui effectuant le rapport pixel à pixel entre images de bandes différentes n'a été mis en œuvre jusqu'à présent, pour l'affichage en temps réel. Pourtant l'ac-

quisition « simultanée » des images en lumière blanche et en autofluorescence permet d'envisager de nouvelles formes de visualisation des données spatiales et spectrales plus pratiques pour le clinicien comme par exemple la construction d'images panoramiques partielles d'organe avec localisation des anomalies repérées ou bien la visualisation endoscopique en temps réel augmentée par la localisation de la fenêtre d'observation dans la carte de l'organe réalisée. Ces approches nécessitent la mise en œuvre de solutions de traitement d'images optimisées pour être compatibles en terme de temps de réponse avec les contraintes d'observation clinique.

3. Spectroscopie d'autofluorescence

3.1 Détection de cancers précoces *in vivo, in situ*, par spectroscopie tissulaire d'autofluorescence endoscopique

Nous nous sommes orientés vers le photodiagnostic dans l'œsophage, et tout particulièrement dans l'endobrachyœsophage (ou œsophage de Barrett) domaine sur lequel nous sommes les seuls à travailler en France. Les patients souffrant de cette pathologie présentent un risque accru (d'un facteur 30 à 125 suivant les études) de développer un cancer par rapport à la population générale et font l'objet d'une surveillance endoscopique régulière. Il existe une forte demande médicale pour accroître la sensibilité du diagnostic endoscopique, actuellement insuffisante.

Nous avons choisi une longueur d'onde d'excitation de 330 nm car elle permet d'observer l'expression de plusieurs fluorophores endogènes (collagène, élastine, NAD(P)H et flavines) et fournit donc une information spectrale plus riche, alors qu'une excitation dans le bleu concerne principalement les flavines et les éventuelles porphyrines endogènes. Nous avons conçu et construit un spectrofluorimètre à fibres destiné à l'utilisation clinique dont le schéma de principe est donné figure 2.

L'excitation lumineuse est fournie par une lampe Xénon (300 W, Eurosep) munie d'un filtre interférentiel (Andover) centré à 330 nm, de bande passante à mi-hauteur égale à 10 nm. L'acquisition des spectres tissulaires est effectuée grâce à un faisceau de fibres optiques (SEDI France) comprenant une fibre d'excitation de diamètre de cœur 500 μm et 9 fibres de diamètre de cœur 200 μm destinées à recueillir la fluorescence tissulaire. Le spectromètre (Jobin-Yvon, CP200, résolution spectrale 2 nm) est équipé d'un filtre d'émission passe-haut à 360 nm (Andover) et d'un détecteur matriciel CCD 1024 \times 256 pixels refroidi à l'azote liquide, ce qui assure une sensibilité suffisante pour acquérir un spectre en moins d'une seconde. Pour une excitation à 330 nm, chaque spectre correspond à l'exploration d'un volume tissulaire de l'ordre du dixième de mm^3 .

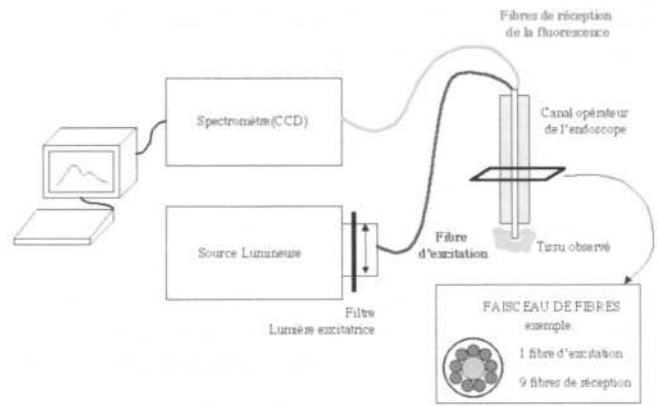


Figure 2. Schéma de principe du spectrofluorimètre développé et utilisé en clinique, comprenant : une lampe Xénon 300W filtrée (330 ± 5 nm), un capteur multifibres optiques et un spectromètre CP200 (résolution spectrale 2 nm) muni d'un filtre passe-haut à 360 nm.

Notre étude s'est déroulée dans le cadre d'un protocole clinique et a porté sur 25 patients. Les mesures sont effectuées lors de la procédure endoscopique conventionnelle. La figure 3 montre deux spectres typiques, chez un même patient, d'une muqueuse œsophagienne normale saine et d'une dysplasie sévère non visible en lumière blanche. L'analyse statistique des données expérimentales (test de Student et analyse de la variance) nous a permis de montrer que, dans le cas de l'œsophage, les modifications spectrales associées à la transformation néoplasique sont plus importantes que celles dues aux variations biologiques intra- et inter-patients. Nous avons pu ainsi déterminer un indicateur spectral, formé à partir de 2 ratios entre les intensités émises à 390 et 450 nm et à 390 et 550 nm, qui différencie les tissus sains des carcinomes intramuqueux avec une sensibilité de 97 % et une spécificité de 87 % [Bourg-Heckly].

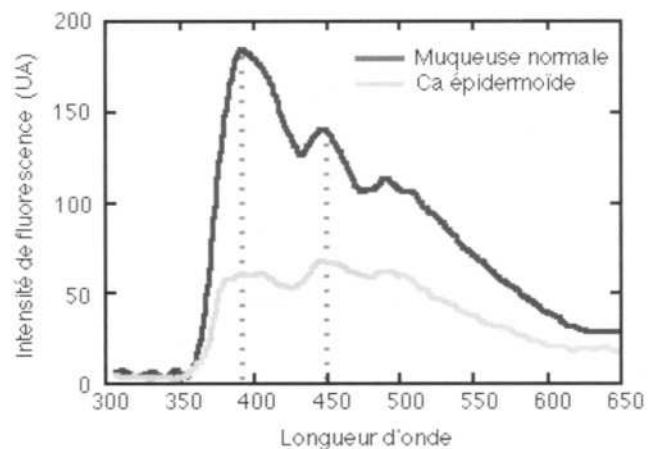


Figure 3. Exemple de spectres typiques d'une muqueuse œsophagienne saine (courbe noire) et dysplasie sévère (courbe grise) pour un même patient.

3.2. Étude de l'émission d'autofluorescence cellulaire en vue d'une quantification des spectres

La modification de l'intensité et de la forme des spectres tissulaires d'autofluorescence lors de la cancérogenèse est un fait expérimental bien établi et la possibilité d'exploiter ce phénomène à des fins diagnostiques a été démontrée par un certain nombre d'études cliniques dont celle sur l'œsophage citée au paragraphe précédent. Cependant les indicateurs permettant de différencier tissus sains et lésions cancéreuses précoces sont définis de façon empirique à partir de l'analyse comparative des spectres tissulaires et l'interprétation quantitative de ces derniers est très délicate. Plusieurs facteurs expliquent cette difficulté: le spectre d'autofluorescence tissulaire résulte du recouvrement de l'émission de plusieurs fluorophores endogènes situés à différents niveaux de profondeur de la muqueuse dont il n'est pas aisé de déterminer les contributions respectives: la fluorescence de l'épithélium est due à l'émission des coenzymes NAD(P)H et flavines impliqués dans le métabolisme cellulaire, alors que celle du chorien sous-jacent est dominée par la fluorescence du collagène et de l'élastine, protéines fibreuses qui constituent l'essentiel de la matrice extra-cellulaire du tissu conjonctif. Le spectre acquis *in vivo* ne représente pas la somme des spectres intrinsèques émis par chaque couche tissulaire tels qu'ils seraient observés dans un milieu optiquement mince. En effet, l'intensité et la distribution spectrale sont fortement affectées par les propriétés d'absorption et de diffusion de l'épaisseur de tissu traversée par la lumière avant d'atteindre la fibre collectant la fluorescence.

La quantification de l'émission d'autofluorescence à partir de la restauration des spectres intrinsèques doit permettre de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la modification spectrale, notamment en séparant les facteurs d'origine métabolique et ceux d'origine structurale, et conduire à un diagnostic plus précis.

Dans une première étape, notre objectif a été de mettre en évidence et de caractériser la part du métabolisme cellulaire dans les spectres d'autofluorescence de la muqueuse œsophagienne acquis lors de l'étude clinique pour obtenir des spectres de référence de l'émission cellulaire permettant à terme une interprétation quantitative des spectres par modélisation. À cette fin, nous avons entrepris des études comparatives portant sur des cultures cellulaires saines et tumorales. Les cellules saines n'étant pas disponibles commercialement, nous avons mis au point une procédure permettant d'obtenir des cultures primaires à partir de pièces opératoires. Les cellules tumorales sont deux lignées correspondant respectivement aux tumeurs se développant sur la muqueuse malpighienne œsophagienne (OE21) et sur la muqueuse de Barrett (adénocarcinome OE33). Deux techniques spectroscopiques ont été utilisées: la microspectrofluorimétrie confocale, dont la résolution spatiale est de l'ordre de quelques μm^3 , pour obtenir l'information sur la forme du spectre émis par une cellule unique vivante, et la spectrofluorimétrie sur cellules en suspension qui fournit un spectre résultant

de l'émission de quelques 10^5 cellules et permet d'accéder à l'intensité moyenne d'autofluorescence.

Nous avons déterminé les spectres de fluorescence intrinsèques émis par les différents types cellulaires et montré ainsi que l'intensité de fluorescence des cellules tumorales est significativement plus élevée que celle des cellules saines (contrairement à ce qui est observé sur le tissu) et que leurs distributions spectrales ne sont pas identiques (figure 4). L'analyse des spectres au niveau de la cellule individuelle a permis d'identifier les fluorophores responsables de l'émission et d'en déterminer leurs contributions relatives. Comme attendu pour une excitation dans l'UV moyen, le fluorophore prépondérant est le NAD(P)H, responsable de plus de 90% de l'émission cellulaire [Villette-04].

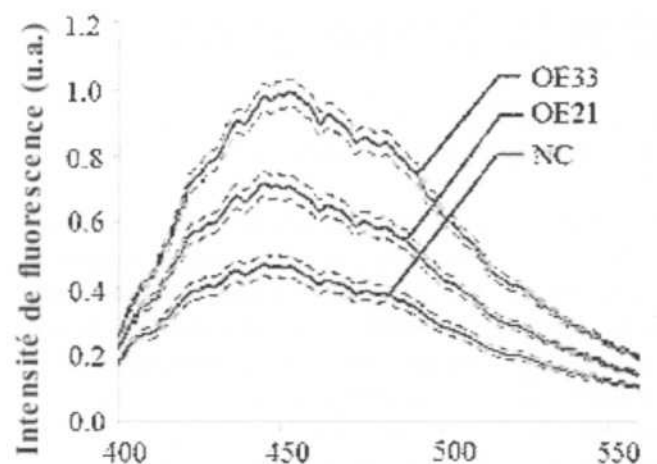


Figure 4. Spectres moyens de fluorescence pour les cellules saines NC ($n = 362$), et tumorales se développant sur la muqueuse malpighienne œsophagienne OE21 ($n = 362$) et sur la muqueuse de Barrett (adénocarcinome OE33, $n = 396$) obtenus en microspectrofluorimétrie confocale. Les intervalles de confiance sont donnés en pointillés.

Une quantification de la concentration intracellulaire du NAD(P)H effectuée par deux méthodes différentes, l'une fondée sur la comparaison des intensités de fluorescence émises par les cellules et par des solutions de NAD(P)H pur, l'autre fondée sur une analyse biochimique indépendante de la fluorescence, a conduit à des résultats cohérents. La quantité totale de NAD(P)H est plus importante dans les cellules tumorales que dans les cellules saines (plus d'un facteur 2 entre cellules d'adénocarcinome et cellules saines). L'ensemble des résultats obtenus lors de ces études cellulaires peut s'interpréter en terme de différences métaboliques entre cellules saines et tumorales en supposant que la transformation néoplasique favorise la voie métabolique anaérobie (sans oxygène) par rapport à la voie aérobie [Villette-06].

La transformation néoplasique est donc associée à une augmentation de l'intensité de l'émission du NAD(P)H, ce qui semble en contradiction avec l'observation *in vivo* où elle se manifeste

toujours par une diminution globale de l'intensité de fluorescence. L'interprétation doit prendre en compte le fait que, dans le tissu, les spectres d'émission du NAD(P)H cellulaire et du collagène provenant du chorion se superposent et subissent une déformation lors de leur propagation vers la surface. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par une équipe du MIT qui restaure les spectres intrinsèques à partir des spectres acquis *in vivo* en utilisant une méthode fondée sur la théorie de la migration de photon [Georgakoudi-02]. Ils ont montré que les spectres tissulaires intrinsèques des dysplasies sévères sur œsophage de Barrett se caractérisaient par une décroissance du collagène et une augmentation du NAD(P)H par rapport à la muqueuse non dysplasique alors même que les spectres *in vivo* étaient caractérisés par une réduction globale de l'intensité de fluorescence. Les auteurs attribuaient ce fait à une augmentation du nombre de cellules et/ou à un niveau plus élevé de l'activité métabolique cellulaire dans le tissu dysplasique. Nos résultats permettent d'affirmer que l'accroissement de l'intensité tissulaire de l'émission du NAD(P)H est la traduction en partie d'une modification de l'activité métabolique cellulaire puisque nous l'observons au niveau de la cellule individuelle. La réduction de l'émission du collagène pourrait être due à un effet d'écran provoqué par un épaississement de l'épithélium et/ou à une désorganisation de la structure de la molécule au point de masquer l'augmentation de l'émission du NAD(P)H. Ces résultats montrent la grande sensibilité de la méthode spectroscopique d'autofluorescence pour détecter des modifications des propriétés structurales et biochimiques des tissus et notamment des transformations néoplasiques à des endroits très localisés. Or cette technique de détection ponctuelle (1 mm² de surface de tissu sondé) implique un échantillonnage spatial limité pour être compatible avec la durée d'un examen clinique, donc

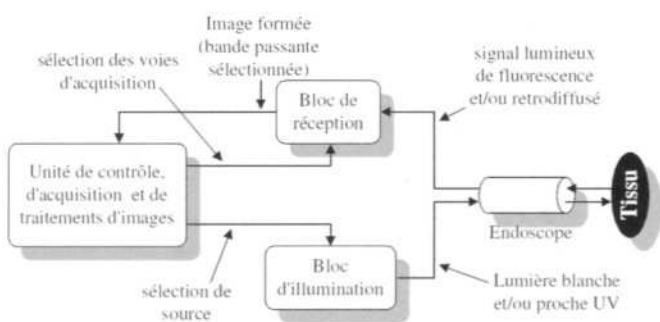


Figure 5. Schéma-bloc du système de spectro-imagerie développé (collaboration CRAN-BioMoCeTi). L'unité de contrôle synchronise la commutation des sources du bloc d'illumination (lumière blanche / excitation de fluorescence) avec la sélection des voies optiques et l'acquisition des images en lumière blanche et en fluorescence.

un nombre de points de mesure restreint et un risque plus grand de ne pas « tomber » sur un site lésé. Afin de pallier ce défaut, et aux dépens d'une résolution spectrale limitée à quelques bandes, une approche en imagerie endoscopique d'autofluorescence est développée pour améliorer la localisation spatiale macroscopique préalable des zones suspectes et guider alors efficacement la spectroscopie point à point, voire la biopsie.

4. Cartographie endoscopique multi-bandes

4.1. Prototype d'imageur d'autofluorescence multi-bandes

Le principe du système d'imagerie multi-bandes développé par notre groupe CRAN-BioMoCeTi repose sur la visualisation simultanée (en termes de perception visuelle pour le clinicien) de l'image endoscopique classique en lumière blanche et d'une image d'information spectrale de même dimension et résolution. Cette image peut être celle de l'autofluorescence des tissus dans une seule bande de longueurs d'ondes donnée ou bien une image composite « multi-bandes ». Cette dernière code en fausses couleurs les rapports d'intensités pixels à pixels entre l'autofluorescence acquise dans des bandes de longueurs d'ondes différentes et déterminées à partir des analyses spectroscopiques déjà menées. Cette information, fournie en temps réel et intégrée dans une procédure endoscopique conventionnelle, doit permettre au clinicien

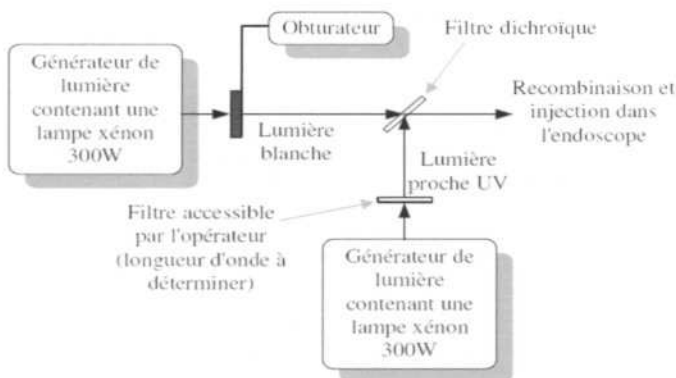


Figure 6. Schéma de principe du bloc d'illumination. L'obturateur situé sur la voie d'illumination de lumière blanche est fermé lors de l'injection de la lumière d'excitation de fluorescence obtenue après filtrage passe-bande 400 ± 20 nm (largeur à mi-hauteur) de la seconde source Xénon. Le filtre dichroïque est un passe bas en réflexion à 430 nm.

d'orienter les prélèvements biopsiques et d'accroître ainsi la sensibilité de la détection. Le prototype développé est susceptible d'être utilisé aussi bien en endoscopie souple que rigide.

Le schéma de principe du système représenté figure 5 se compose de trois blocs fonctionnels principaux : un bloc d'illumination/excitation, un bloc de réception et une unité de commande et d'acquisition des images.

Le bloc sources d'illumination (figure 6) est composé de deux lampes Xénon 300 W collimatées. La première lampe sert à former l'image en lumière blanche ; elle est munie d'un obturateur (shutter UNIBLITZ VS25, temps de réponse maximum 3 ms) fermé lors des acquisitions en excitation de fluorescence. Le spectre lumineux de la seconde lampe est filtré pour conserver une bande spectrale réduite dans le bleu servant à exciter les fluorophores endogènes d'intérêt. La sélection de cette bande

d'excitation (longueur d'onde centrale, bande passante) s'effectue grâce à l'utilisation de filtres passe-bande standard (par exemple filtre Andover 400 ± 20 nm), en fonction de l'organe à examiner et/ou de la pathologie à rechercher. Dans le cadre de notre application, nous utilisons une excitation entre 400 nm (limite due à la transmission correcte des fibres de verre du fibroscope) et 430 nm, afin d'exciter les fluorophores d'intérêt (flavines, porphyrine, élastine).

La lumière produite est acheminée au travers du canal d'illumination de l'endoscope jusqu'au tissu. Le fibroscope utilisé dans le cadre de notre étude est un appareil standard (FG 100FP, Fujinon) dont l'optique (champ de vision de 105° , intervalle de focalisation 5-100 mm) permet une visualisation des images correspondant à l'exploration d'une zone tissulaire d'une surface de l'ordre d'un à quelques centimètres carrés.

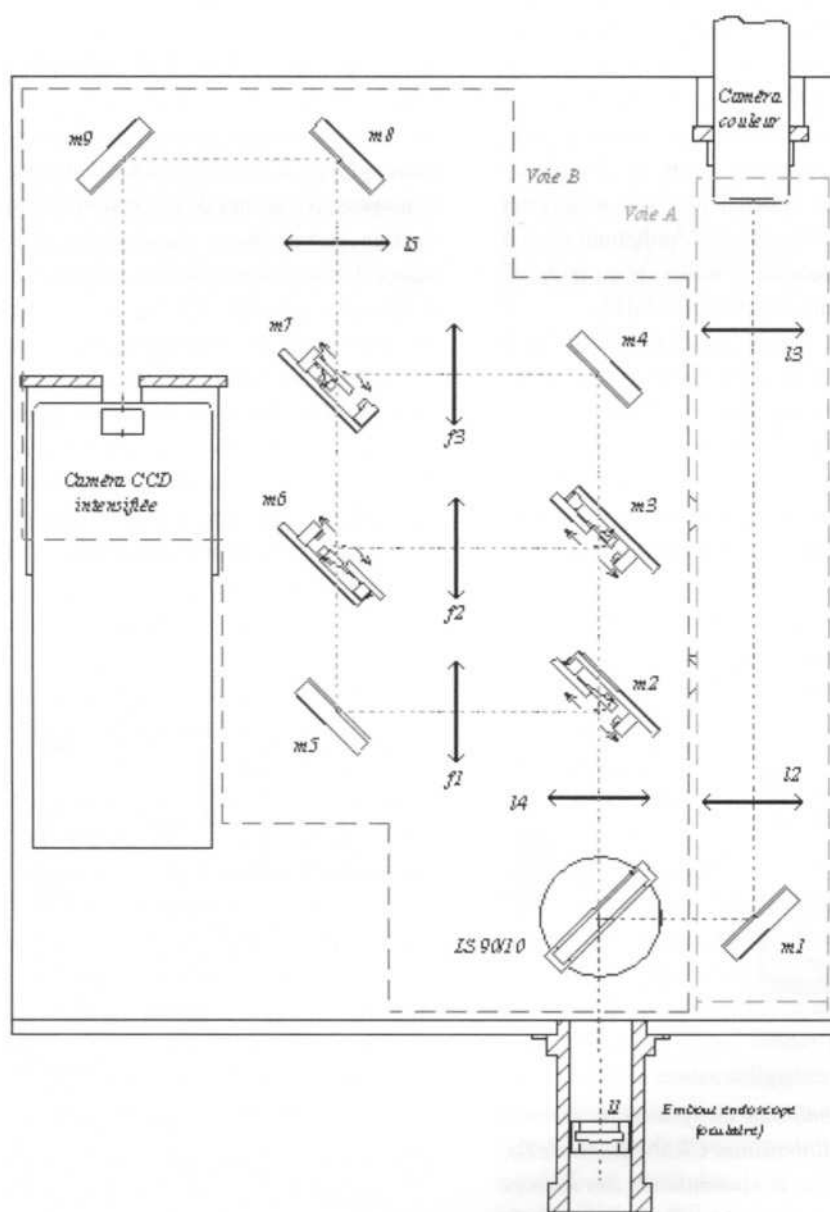


Figure 7. Schéma du bloc de réception et d'acquisition des images, avec « mi » miroirs de renvoi (m2, 3, 6, 7 avec 1 degré de liberté et m4, 5, 8, 9 avec 2 degrés de liberté), « li » lentilles de focalisation, « fi » filtres de sélection de bande et « LS » Lame Séparatrice 90/10.

La figure 7 représente le schéma de la partie réception et acquisition des images développée et réalisée. La lumière (l'image), issue de l'oculaire de l'endoscope, est séparée en deux voies par un séparateur pelliculaire de rapport 90/10: voie A (10% en réflexion) vers la caméra couleur pour former l'image en lumière blanche et voie B (90% en transmission) vers la caméra CCD intensifiée pour acquérir les images d'autofluorescence suivant trois chemins optiques (filtres $f1$, $f2$ et $f3$) commutables séquentiellement à l'aide des miroirs mobiles $m2$, $m3$, $m6$ et $m7$ fixés sur des bras d'actuateurs (GM20, General Scanning, débattement angulaire 24° , temps de réponse maximum 12 ms). La commande des dispositifs de commutation s'effectue à l'aide d'une carte d'entrées-sorties PCI-1710 (Advantech Co). La somme des temps de commutation du shutter et de changement de voie est de 20 ms environ. Le temps de traitement maximum des images est de 55 ms, il comprend le rapport pixel à pixel entre deux images acquises dans deux bandes différentes et la coloration des zones suspectes (image composite). Le cycle recommence toutes les 160 ms pour le mode le plus rapide (1 image en lumière blanche et 1 image de fluorescence) et toutes les 460 ms pour le mode le plus lent (1 image en lumière blanche, 2 images de fluorescence et calcul de l'image composite).

L'ajustement précis de chaque chemin optique est réalisé au moyen d'une part, de platines de rotation micrométriques (Standa, rotation 360° , résolution 0.017°) sur lesquelles sont fixés les miroirs mobiles $m2$, $m3$, $m6$, $m7$ et la lame séparatrice et d'autre part, de supports verticaux Trait-Point-Plan à 2 degrés de liberté (KMS/M Thorlabs, précision 3/16"-100 TPI) sur lesquels sont collés les miroirs fixes $m1$, $m4$, $m5$, $m8$, $m9$.

La caméra couleur (Sony XC-999P, CCD 1/2", $752H \times 582V$ pixels) fonctionne en continu, et acquiert une image toutes les 40 ms. De façon intercalée dans le temps, la caméra intensifiée (Lheritier LH760 ULL, CCD 2/3", 752×582 pixels, éclairage minimum 2.10^{-5} lux) réalise l'acquisition d'images d'autofluorescence dans une ou plusieurs bandes spectrales selon le

mode choisi par l'utilisateur. Tous les éléments d'optique sont traités. Pour chaque voie optique, sans filtre, environ 50% de la puissance lumineuse à l'entrée du bloc de réception parvient à la caméra intensifiée. Un système afocal est utilisé pour chaque voie afin d'adapter la taille des images aux dimensions des capteurs de chaque caméra tout en limitant au maximum l'encombrement. La numérisation des images est assurée par une carte d'acquisition Matrox Meteor II standard.

4.2. Prétraitements et calibrage

4.2.1. Précorrections par filtrage (vignettage, motif des fibres)

Du fait de la conception même des endoscopes (champ de vision circulaire, éclairage localisé), les images endoscopiques sont circulaires et affectées d'un important gradient lumineux, le centre des images étant nettement plus éclairé que les bords (vignettage). Par ailleurs, pour les endoscopes fibrés, le canal image est constitué de plusieurs milliers de fibres optiques (environ 15000 pour le Fujinon FG 100FP utilisé) qui transmettent la lumière par leur cœur, de sorte que la gaine de chacune de ces fibres (transmettant moins de lumière) fait apparaître un motif (grille en nid d'abeilles) qui se superpose à l'image. Enfin, l'optique grand angle de l'endoscope induit une forte distorsion radiale (déformation dite de « barillet ») dans les images [Asari]. Ces trois défauts illustrés figure 8 doivent impérativement être atténués (correction et choix d'une zone utile) pour obtenir un recalage fonctionnel et une carte précise [Shahidi].

Concernant les problèmes d'éclairage et de motif des fibres, nous avons tout d'abord analysé le contenu fréquentiel d'images fibroscopiques « typiques » (vessies de porc). La figure 9 montre un exemple caractéristique (a) d'image « brute » contenant l'inhomogénéité d'éclairage et le motif des fibres (dimension $N^2 = 341 \times 341$ pixels), (b) de la même image sans

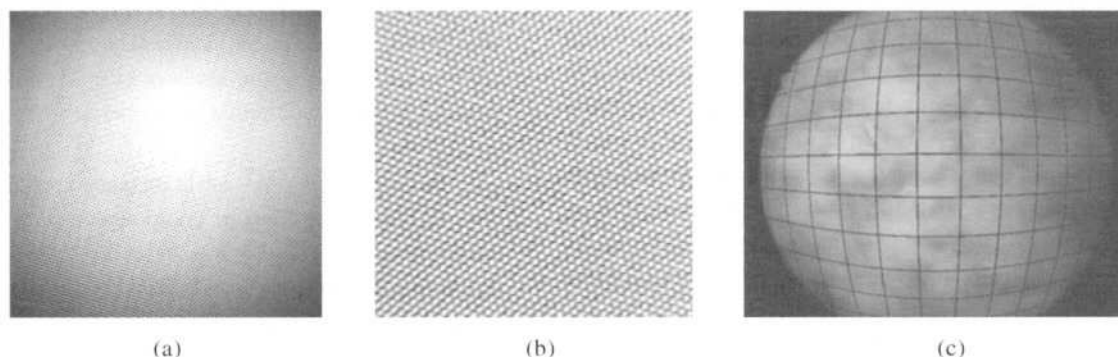


Figure 8. Images endoscopiques en niveaux de gris (a) prise à la perpendiculaire d'une surface uniformément blanche et montrant l'inhomogénéité d'illumination (taille de l'image: 768×576 pixels). (b) grossie localement et montrant le motif en nid d'abeilles dessiné par les fibres optiques du fibroscope (taille de l'image 140×140 pixels). (c) de la paroi d'une vessie sur laquelle un quadrillage a été superposé pour indiquer la déformation radiale de l'image.

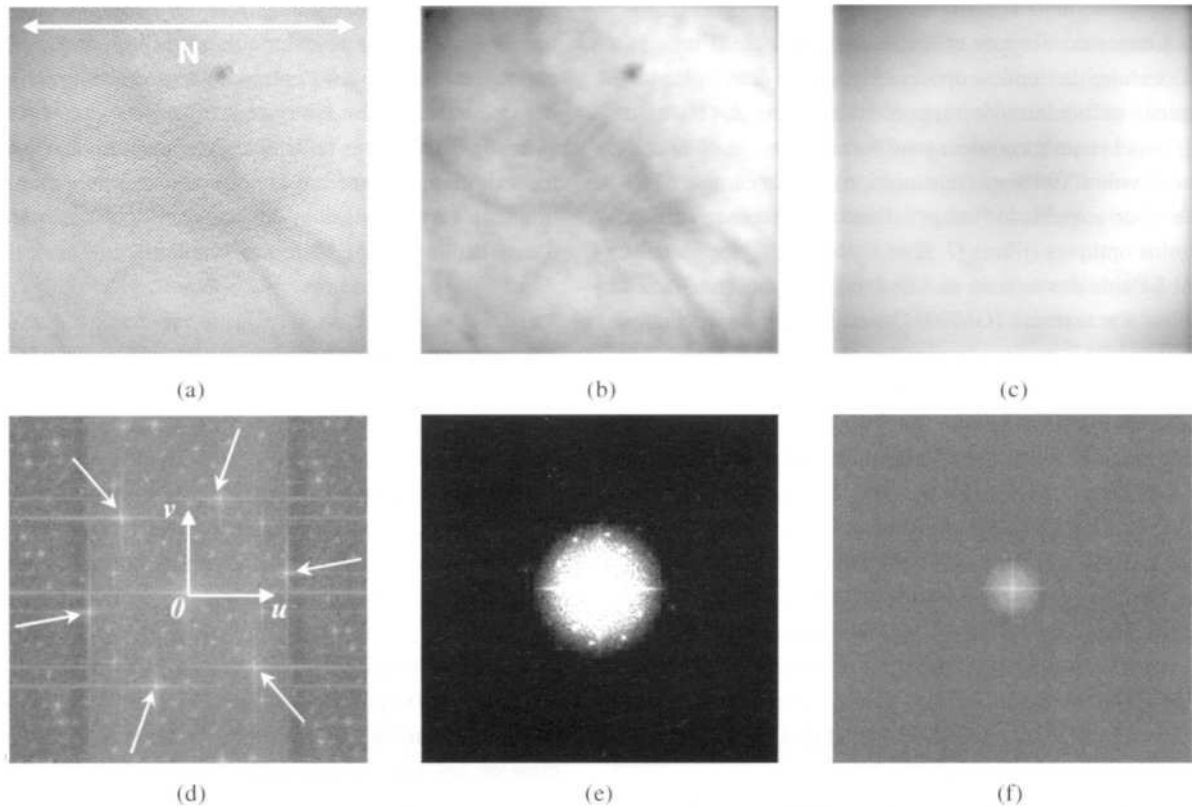


Figure 9. (a) Image endoscopique de la paroi d'une vessie de porc acquise à l'aide d'un fibroscope. (b) La même image après filtrage des composantes de haute fréquence du spectre dues au pattern de fibres. (c) Image (a) après filtrage passe-bas ne conservant que les variations de basse fréquence présents dans l'image (a). (d) (e) et (f) sont les spectres d'amplitude normalisés et centrés à l'origine en fonction des fréquences spatiales et correspondant respectivement à (a), (b) et (c). Sur l'image (d) les flèches pointent les 6 principaux pics répartis à angles égaux sur le cercle centré de rayon $0.28N$ ($N = 341$ pixels) et correspondant au dessin du motif des fibres optiques.

le motif des fibres (filtré) et (c) de la même image en ne conservant que les très basses fréquences (visualisation du gradient lumineux). En dessous de chacune de ces images, le spectre d'amplitude normalisé centré est donné en fonction des fréquences spatiales u et v entre $-(N-1)/2$ et $+(N-1)/2$. On distingue clairement en a) le dessin du motif des fibres, présent dans le plan fréquentiel sous la forme de 6 pics principaux répartis à angles égaux sur un cercle de rayon $0.28N$ et de centre ($u = 0, v = 0$). On constate également que les composantes du signal « utile » sont essentiellement inscrites à l'intérieur d'un disque de rayon $0.12N$ (images (b) et (e)) et que les composantes correspondant aux inhomogénéités d'éclairage appartiennent à un disque de rayon $0.03N$ (images (c) et (f)).

Pour compenser le gradient dû à l'éclairage inhomogène et pour atténuer la présence du motif des fibres optiques du fibroscope, nous avons donc choisi d'appliquer simplement deux filtres passe-bas spécifiques aux images acquises. L'image originale I_a est filtrée par un filtre passe-bas h_1 pour obtenir l'image I_b contenant toujours les informations utiles mais sans composantes hautes fréquences (pattern des fibres). I_b est

ensuite filtrée par un filtre passe-bas h_2 pour obtenir l'image I_c ne contenant plus que les très basses fréquences (gradient lumineux). L'image finale est obtenue par soustraction $I = I_b - I_c$ [Miranda-04a]. h_1 et h_2 sont des filtres gaussiens de fonction de transfert :

$$h(m, n) = \frac{1}{2\pi\sigma_h^2} e^{-\frac{d^2(m, n)}{2\sigma_h^2}} \quad (1)$$

où $d(m, n) = \sqrt{m^2 + n^2}$ est la distance spatiale entre le pixel sous le masque ayant pour coordonnées (m, n) et le pixel au centre du masque ($m = 0, n = 0$). $\sigma_h = N/2\pi\sigma_H$ et σ_H sont les écarts-type du masque gaussien dans les domaines spatial et fréquentiel respectivement. Pour le filtre h_1 (masque de convolution 5×5), nous avons choisi $\sigma_H = 0.125N$, soit $\sigma_h = 1.27$. Cette valeur de σ_H signifie que l'amplitude de chacune des composantes est inférieure à 15 % de leur valeur initiale au-delà d'une distance de $2\sigma_H$ (les premières composantes significatives du pattern étant situées au-delà de cette valeur) et que la partie la plus importante de l'information ($\leq \sigma_H$) est préservée. Pour le filtre h_2 (masque 11×11), nous avons fixé

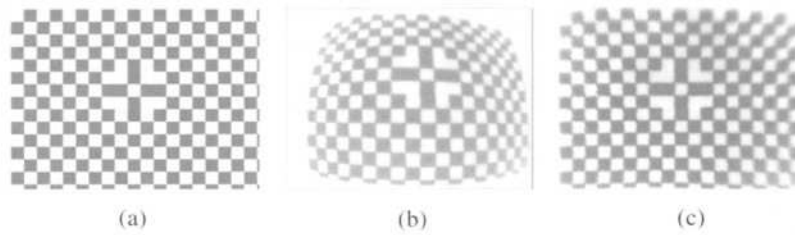


Figure 10. Mire d'étalonnage : (a) Image sans distorsion. (b) Image acquise avec l'endoscope (c) Image corrigée avec les paramètres k_i du polynôme (2) trouvés après recalage.

$\sigma_H = 0.015N$, soit $\sigma_h = 6.12$. Cette valeur de σ_H signifie que toutes les composantes du spectre qui se trouvent dans un rayon inférieur à $0.026N$ conservent au moins 60 % de leur amplitude.

4.2.2. Calibrage (correction de la distorsion en barillet)

L'algorithme de recalage développé pour le mosaïquage et décrit dans la section suivante (4.3) est également utilisé pour calculer automatiquement les paramètres de compensation des distorsions radiales de l'endoscope. Pour ce faire, une image sans distorsion d'une mire est recalée avec une image de la même mire (avec distorsion) acquise avec l'endoscope (voir figure 10). La mire sans distorsion est générée informatiquement et imprimée sur papier pour ensuite être acquise. Durant le recalage des deux images, les paramètres optimisés sont les paramètres de la projection perspective (liée à la position de l'endoscope par rapport à la mire) et ceux décrivant la distorsion, à savoir les coordonnées (C_x, C_y) de la projection du centre optique de l'endoscope dans l'image et les paramètres k_i de l'équation (2). Ce polynôme d'ordre 5 traduit l'allongement du rayon r entre le centre (C_x, C_y) et le point image de coordonnées (x, y) sachant que les variations d'erreur de correction de distorsion sont largement négligeables au-delà de cet ordre [Asari]. L'avantage de cet algorithme réside dans le fait que l'endoscope n'a pas besoin d'être maintenu perpendiculairement à la mire, de sorte que la procédure de calibrage, ne nécessitant ni mire particulière ni système précis de positionnement de l'endoscope, s'en trouve largement simplifiée pour l'utilisateur.

$$r' = \sum_{i=1}^5 k_i \cdot r^i \quad (2)$$

avec : $r = \sqrt{(x - C_x)^2 + (y - C_y)^2}$ et $k_1 = 1$

La distance moyenne entre les centres homologues des carrés noirs des images Figure 10(a) et (c) est de 1.33 pixels. Cette erreur très faible autorise des recalages précis d'images. Elle est représentative pour une inclinaison de l'axe de l'endoscope par rapport à la perpendiculaire de la mire variant de 0° à 20° (résultats montrés dans [Miranda-04b]) ; pour différents points de

vue, différentes valeurs de perspectives sont bien déterminées, avec des valeurs de paramètres optiques identiques. Tout en étant plus flexible, la méthode proposée est aussi précise que les méthodes de référence publiées sur ce sujet [Shahidi, Helferty, Sawhney, Asari].

4.3. Méthode de recalage et cartographie 2D

Le mosaïquage d'images est une technique permettant de construire une carte à partir d'une séquence d'images se recouvrant spatialement comme celles acquises en endoscopie. Il trouve de nombreuses applications dans le domaine médical, notamment pour diverses modalités telles que l'imagerie à rayons X ([Jalink, Chou]) l'imagerie ultrasonographique [Weng] ou l'imagerie microscopique [Vogt]. Cependant, pour la grande majorité de ces applications, les déplacements ou les positions du capteur sont connus. Les paramètres des transformations nécessaires pour le recalage des données peuvent être déterminés à partir de ces déplacements connus. Ceci n'est pas le cas en endoscopie clinique où le praticien manipule l'endoscope selon des trajectoires 3D sans positionnement mesurable et dépendantes du site et/ou de l'organe observé. L'ophtalmologie [Can] est un des rares domaines médicaux pour lequel le recalage est effectué automatiquement et sans connaissances *a priori* liées au déplacement du capteur. À ce jour, aucun algorithme de mosaïquage automatique n'a été recensé dans le domaine de la cartographie 2D en vision monoculaire appliquée à l'imagerie endoscopique. Pourtant, la vitesse d'acquisition (25 images/seconde) et la vitesse de déplacement de l'endoscope dans les organes creux ($< 1\text{cm/s}$) conduisent à une grande surface de recouvrement d'images consécutives (typiquement plus de 90 % de la surface des images) autorisant l'utilisation d'algorithmes de recalage.

Les algorithmes de recalage sont au cœur du processus de mosaïquage. Leur but est de trouver la transformation géométrique locale superposant deux images consécutives ($i^{\text{ème}}$ et $(i + 1)^{\text{ème}}$ images) de la séquence. Les transformations locales $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ sont ensuite utilisées pour placer les images, au fur et à mesure du recalage des paires d'images, dans un repère com-

mun $(O_{carte}, \vec{x}_{carte}, \vec{y}_{carte})$ à l'aide d'une transformation globale \tilde{T}_{i+1}^g actualisée au cours du recalage telle que :

$$\tilde{T}_{i+1}^g = \tilde{T}_i^g \tilde{T}_{i,i+1}^l = \prod_{j=1}^{j=i} \tilde{T}_{j,j+1}^l \quad (3)$$

Le processus de recalage de données est mathématiquement formulé par l'équation (4). Soient deux images I_M (modèle ou référence) et I_T (à transformer). La superposition de ces deux images consiste à trouver les paramètres de la transformation \tilde{T} au moyen d'une méthode d'optimisation ($argopt_T$) qui maximise la ressemblance (mesure de similarité S) des structures homologues extraites des images. Les fonctions f_1 et f_2 représentent les algorithmes de calcul ou de segmentation des structures homologues des images I_M et I_T .

$$\tilde{T} = arg opt_T S(f_1(I_M), T(f_2(I_T))) \quad (4)$$

Le type de la transformation géométrique T , les structures homologues $f_1(I_M)$ et $f_2(I_T)$, la mesure de similarité S et la méthode d'optimisation à employer sont à définir en fonction de l'application, des modalités d'imagerie et de la nature des images ainsi que des besoins en termes de précision, de robustesse, *etc.* Il a par exemple été utilisé dans le domaine de la cancérologie pour recaler des informations multimodales utiles au repositionnement automatique du patient en radiothérapie [Sarrut, Bansal] ou en cardiologie pour superposer des données fonctionnelles 3D de tomoscintigraphie avec des données anatomiques 2D de coronarographie [Schindler, Valet].

L'endoscope étant déplacé sans restriction particulière dans l'organe, une transformation perspective 2D-2D doit être utilisée pour recaler les images. La transformation perspective décrite par l'équation 5 déplace un pixel de coordonnée (x, y) dans l'image I_T en une position de coordonnées (x', y') . Les paramètres a_{11} et a_{22} sont sans dimension et sont notamment liés aux facteurs d'échelle agissant respectivement selon l'axe des abscisses et des ordonnées du repère image. a_{12} et a_{21} (également sans dimension) sont responsables de l'effet dit de cisaillement ou glissement. Ces quatre paramètres déterminent également la rotation 2D effectuée dans le plan de l'image. a_{13} et a_{23} sont les paramètres de translation selon l'axe des abscisses (a_{13}) et celui des ordonnées (a_{23}) de I_T . Enfin, a_{31} , a_{32} et a_{33} (sans dimension) sont les paramètres responsables de l'effet de perspective.

$$\begin{pmatrix} x' \\ y' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} u/w \\ v/w \end{pmatrix} \text{ avec } \begin{pmatrix} u \\ v \\ w \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} \quad (5)$$

Dans le cas des images endoscopiques qui nous intéressent, des primitives (contours, *etc.*) communes à toutes les images ne sont pas systématiquement visibles dans les données. Par contre, les niveaux de gris peuvent constituer des informations homologues à partir desquelles une mesure de similarité peut être dérivée. Dans ce cas de figure, une hypothèse de corrélation

liant statistiquement les niveaux de gris des images à recalcr est usuellement recherchée. Si aucun lien n'est connu entre les images en termes de niveau de gris, c'est souvent l'information mutuelle (IM) qui est choisie, ce pour des raisons de robustesse et de flexibilité [Pluim]. Ces raisons nous ont conduit à retenir l' IM comme mesure de similarité dans le cadre de notre méthode de recalage d'images endoscopiques. L'information mutuelle est déterminée avec les entropies $H(I'_M(x, y))$ et $H(I'_T(x, y))$ et avec l'entropie conjointe $H(I'_M(x, y), I'_T(x, y))$ (voir équation 6 et [Viola]), où $I'_M(x, y)$ et $I'_T(x, y)$ sont respectivement les parties communes de l'image $I_M(x, y)$ et de l'image $I_T(x, y)$ transformée avec T . $I'_T(x, y)$ est donc la partie de $T(I_T(x, y))$ qui se superpose à $I_M(x, y)$. Les entropies sont elles-mêmes calculées à l'aide des distributions des niveaux de gris données sous la forme d'histogrammes normalisés. z et z' désignent les niveaux de gris des images $I'_M(x, y)$ et $I'_T(x, y)$, et $p_M(z)$, $p_T(z')$ et $p_{MT}(z, z')$ sont respectivement les distributions des niveaux de gris de $I'_M(x, y)$ et $I'_T(x, y)$, et de l'histogramme joint des deux images.

$$IM(I'_M(x, y), I'_T(x, y)) = H(I'_M(x, y)) + H(I'_T(x, y)) - H(I'_M(x, y), I'_T(x, y)) \quad (6)$$

avec :

$$\begin{cases} H(I'_M(x, y)) = - \sum_{z=0}^{z=255} p_M(z) \ln(p_M(z)) \\ H(I'_T(x, y)) = - \sum_{z'=0}^{z'=255} p_T(z') \ln(p_T(z')) \\ H(I'_M(x, y), I'_T(x, y)) = - \sum_{z=0}^{z=255} \sum_{z'=0}^{z'=255} p_{MT}(z, z') \ln(p_{MT}(z, z')) \end{cases}$$

L'information mutuelle est maximale lorsque les deux images sont recalées. Un gradient descendant est utilisé pour obtenir la transformation \tilde{T} qui maximise l'information mutuelle. Les paramètres de la transformation perspective T sont actualisés à chaque itération de l'optimisation grâce à la relation (7). α est un pas de convergence qui diminue lorsqu'on s'approche de la solution et k est l'indice d'itération. La valeur initiale de T est la matrice identité.

$$T_{k+1} = T_k + \alpha \frac{\partial IM(I'_M(x, y), I'_T(x, y))}{\partial T_k} \quad (7)$$

avec : $I'_T(x, y) = T_k(I_T(x, y))$.

Pour une progression robuste vers la solution, la dérivée de l'information mutuelle doit être calculée précisément. Celle-ci ne doit donc pas être déterminée numériquement mais à partir d'une expression analytique des distributions des niveaux de gris. Les histogrammes des images endoscopiques sont typiquement constitués de plusieurs pics (modes). La fenêtre de Parzen est une méthode d'estimation non paramétrique à noyau gaussien qui permet, à partir d'un ensemble de fonctions gaussiennes, de modéliser précisément des fonctions exponentielles

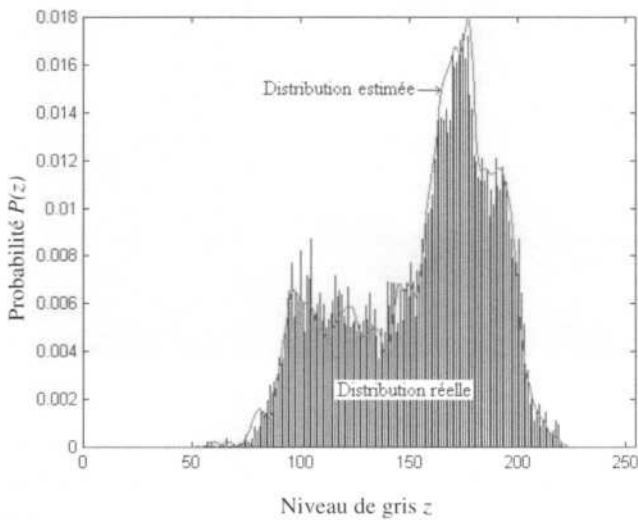
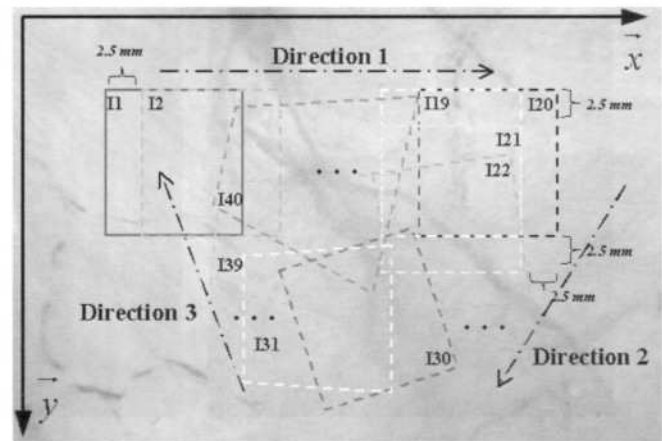


Figure 11. Distribution de la densité de probabilité des niveaux de gris réelle (histogramme de l'image) et estimée par la méthode de la fenêtre de Parzen.

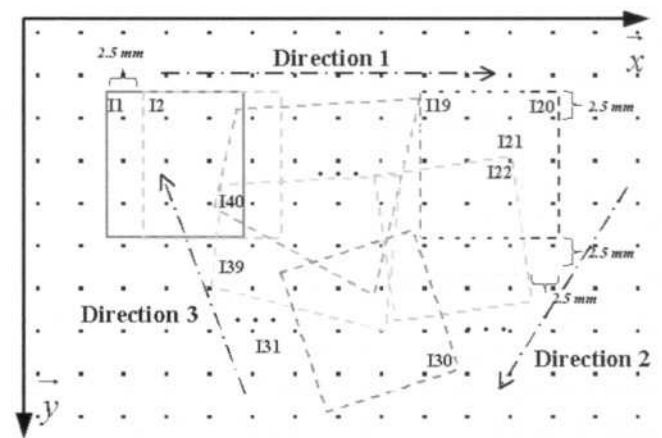
non uni-modales. Dans l'approche proposée, le même écart type σ (à déterminer) est utilisé pour toutes les gaussiennes. Deux échantillons A et B de pixels, de niveaux de gris z_a et z_b , sont tirés au sort dans l'image. Les z_a sont utilisés pour définir les valeurs moyennes des gaussiennes et les z_b pour optimiser leur écart type σ au cours du processus de recalage. Quelques dizaines de gaussiennes (ou de z_a) suffisent pour modéliser précisément les distributions (voir histogramme de la figure 11).

4.4. Validation expérimentale et évaluation quantitative de la qualité du recalage pour le mosaïquage

Pour la validation expérimentale du mosaïquage d'images endoscopiques, un dispositif de positionnement micrométrique (Newport, Contrôleur 3 axes ESP300, platines M-UMR8.51, sensibilité $1\mu m$) a été mis en œuvre pour effectuer un déplacement précis de la tête de l'endoscope. Afin de tester l'algorithme de mosaïquage, une séquence de 40 images endoscopiques d'une photographie de vessie de porc a été acquise. La position de l'endoscope pour la première acquisition et les déplacements de l'endoscope entre chaque paire d'images sont connus (voir figure 12(a)) : translations de 2.5 mm et rotations de 2 degrés entre images (dans le plan et pour la perspective). Le même protocole d'acquisition (mêmes positions de la tête d'endoscope) a été renouvelé avec une mire (en lieu et place de la photographie de vessie) montrant une grille formée de points noirs dont les coordonnées des centres sont également calculées (voir figure 12(b)). Les transformations locales $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ et globales \tilde{T}_{i+1}^g obtenues en recalant les images de vessie sont ensuite utilisées pour construire les mosaïques de la vessie de porc et de la mire. Les images (a) et (b) de la figure 13 montrent la mosaïque par-



(a)



(b)

Figure 12. Représentation schématique du parcours d'acquisition réalisé à l'identique a) sur la photographie de vessie de porc et b) sur la mire (grille de points noirs). La séquence est constituée de 40 images (I1-I40) liées entre elles par des translations uniquement (direction 1), des translations et des rotations dans le plan image (direction 2) et des changements de perspective (direction 3).

tielle de la photographie de vessie construite à partir de la totalité des 40 images acquises lors du parcours décrit précédemment, respectivement sans et avec filtrage du pattern de fibres (passe-bas) et lissage des bords des images. La méthode de lissage implémentée consiste à effectuer la moyenne pondérée des pixels superposés de chaque nouvelle image placée sur la mosaïque, avec des coefficients de pondérations suivant une gaussienne centrée sur cette nouvelle image. La mosaïque correspondante de la grille de petits disques noirs (figure 13(c)), dont les positions ont été calculées avec les transformations \tilde{T}_{i+1}^g obtenues grâce au recalage des images de la vessie, permet une première analyse qualitative. En effet, sur le plan visuel, le recalage des images est relativement juste car les centres des points sont effectivement situés sur des droites parallèles et perpendiculaires symbolisant la grille.

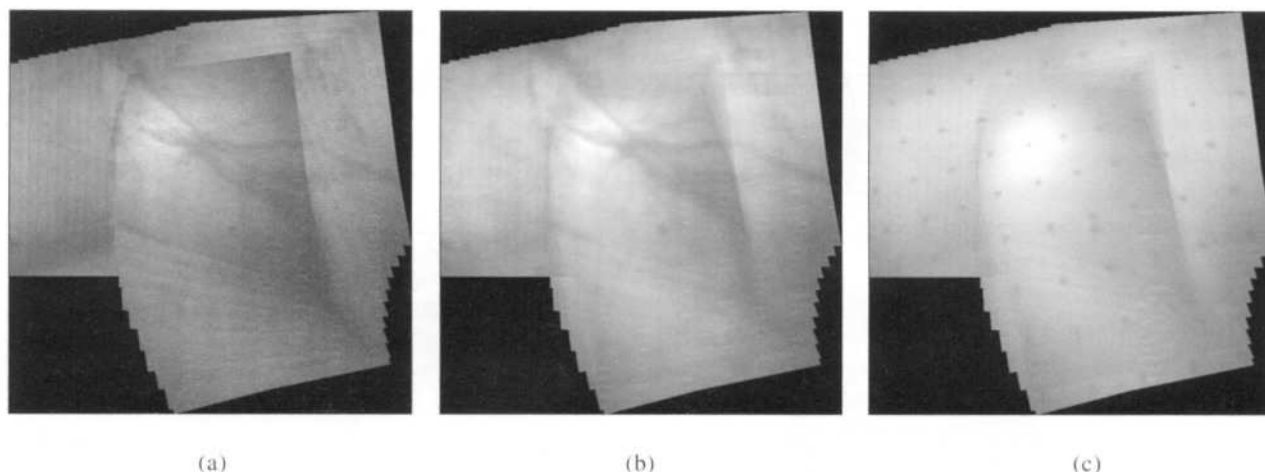


Figure 13. Mosaïque partielle de la photographie de vessie construite à partir de 40 images : (a) sans et (b) avec filtrage passe-bas du pattern de fibres et lissage des bords, et acquises lors du parcours décrit précédemment. La mosaïque correspondante de la grille de points (c) est construite avec les mêmes transformations globales (obtenues lors du recalage des images de la vessie).

Pour estimer quantitativement la précision du mosaïquage, nous avons calculé la distance euclidienne entre la position connue du centre de chaque points et celle du centre du points correspondant dans la carte reconstruite. Ces distances sont représentatives des erreurs de mosaïquage réalisées au niveau du pixel. Les petites imprécisions au niveau des paramètres des matrices $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ induisent des erreurs relativement faibles au niveau du pixel. Les erreurs moyennes réalisées au niveau des paramètres des transformations locales $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ entre paires d'images consécutives valent 0.09 pixels pour les translations selon l'axe des abscisses (a_{13}), - 0.33 pixels pour les translations selon l'axe des ordonnées (a_{23}), 0.001 pour les facteurs d'échelles selon les axes des abscisses (a_{11}) et des ordonnées (a_{22}), 0.073° pour l'angle de rotation et tendent vers 0 pour les paramètres de projection perspective (a_{31} , a_{32} et a_{33}). Ces erreurs sont plus faibles pour la première paire d'image $(i, i + 1) = (1, 2)$, se cumulent au cours du recalage et deviennent maximales pour la paire formée par la dernière ($i = 40$) et la première image ($i = 1$) (dans l'exemple présenté ici, le parcours de l'endoscope correspond à une boucle). Pour cette paire d'image $(i, i + 1) = (40, 1)$, les distances moyenne, minimale et maximale entre les positions idéales et calculées des centres valent respectivement 6.37, 1.1 et 30.1 pixels.

Environ 250 itérations sont nécessaires en moyenne pour recalculer chaque paire d'images, ce qui représente actuellement environ 80 secondes de temps de traitement (PIV 3.2 GHz, 2Go RAM) soit plus de 50 minutes de calcul pour la séquence de 40 images considérée. Ces durées limitent l'exploitation de cette méthode à une utilisation en temps différé (post-opérateur). Nous travaillons actuellement au développement d'autres approches algorithmiques de recalage et de mosaïquage afin de diminuer au maximum ces temps de calcul et pouvoir envisager

des constructions panoramiques exploitables au cours de l'examen clinique.

Les résultats présentés montrent qu'il est possible d'obtenir des mosaïques visuellement suffisamment juste pour que le médecin puisse repérer facilement un endroit donné de l'organe. Un travail est également en cours pour compenser le cumul des erreurs de recalage au cours de la séquence. L'algorithme développé permet de construire des images panoramiques à partir de séquences réelles qui semblent tout à fait correctes visuellement; la figure 14 montre un exemple de carte obtenue pour une séquence vidéo de 249 images d'une cystoscopie sur un patient. La durée moyenne de recalage par paire d'image est de l'ordre de 69 secondes soit plus de 4,75 heures pour traiter la séquence entière.

Par ailleurs, l'observation de différentes séquences vidéos de cystoscopies réalisées en clinique sur patients laisse apparaître que les images qui en sont issues possèdent un contraste supérieur à celui des séquences acquises ici sur la photographie de vessie de porc servant de fantôme. La qualité (résolution et contraste) est meilleure pour l'image vidéo réelle par rapport à l'image imprimée (moins de flou); les conditions d'illumination (et au final le rendu) sont très différentes entre l'impression papier et l'image directement acquise de la vessie. L'information en niveaux de gris contenue dans les images d'endoscopie sur patients (présence de vascularités...) semble ainsi plus riche.

Néanmoins, nous avons constaté que quelques dégradations peuvent parfois faire échouer le recalage comme notamment la présence de perturbations dans la séquence liées à la circulation dans la vessie, selon leur taille et leur vitesse, d'éléments en suspension (morceaux de tissus, sang, etc.). L'utilisateur devra donc veiller à choisir des morceaux de séquence vidéo adaptés

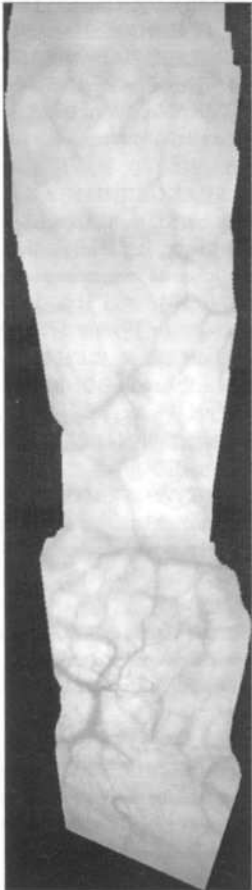


Figure 14. Image panoramique construite à partir de 249 images d'une séquence vidéo de cystoscopie sur patient ; la durée moyenne de recalage par paire d'images est de 69 secondes environ.

mais également s'assurer des conditions d'acquisition permettant d'obtenir un contraste minimum nécessaire dans les images : même si la méthode choisie (information mutuelle sur

niveaux de gris) est justement robuste dans le cas d'images peu contrastées.

4.5. Validation du principe de superposition d'une information de fluorescence sur l'image mosaïque

Pour finir, et afin de valider la faisabilité de superposition sur l'image panoramique d'une information spectrale détectée à l'aide de l'imageur, nous avons utilisé un marqueur fluorescent, invisible à l'observation en lumière blanche, et déposé à un endroit précis sur notre photographie (dont le papier fluoresce également) et sur une surface limitée (environ 1mm^2). Nous avons choisi un marqueur à base de Coumarine (coumCOOH synthétisée par le DCPR UMR CNRS 7630, Nancy), molécule pouvant être utilisée pour simuler la réponse des fluorophores de tissus biologiques compte tenu de ses larges bandes spectrales d'absorption et d'émission centrées autour de 410 et 470 nm respectivement.

Un nouveau protocole de positionnement a été appliqué pour l'acquisition séquentielle des images en lumière blanche et en fluorescence avec un filtre d'excitation à $400 \pm 20\text{nm}$ (largeur à mi-hauteur) et un filtre d'émission passe-bande $480 \pm 10\text{nm}$ (Andover). La figure 14 (a) montre l'image panoramique de vessie obtenue sous éclairage en lumière blanche. Après extraction (seuillage) de la zone fluorescente localisée dans la mosaïque des images de fluorescence correspondante (figure 14(b)), cette information est matérialisée sur l'image panoramique finale (figure 14 (c)) par une valeur particulière d'intensité des pixels concernés (gris foncé dans notre exemple).

Ces premiers résultats permettent de valider la faisabilité de l'acquisition d'images endoscopiques multi-bandes et leur exploitation pour fournir une image panoramique avec localisation de zones de fluorescence particulières. La poursuite de ces travaux de validation expérimentale est prévue dans un premier temps, sur modèles animaux et tumoraux.

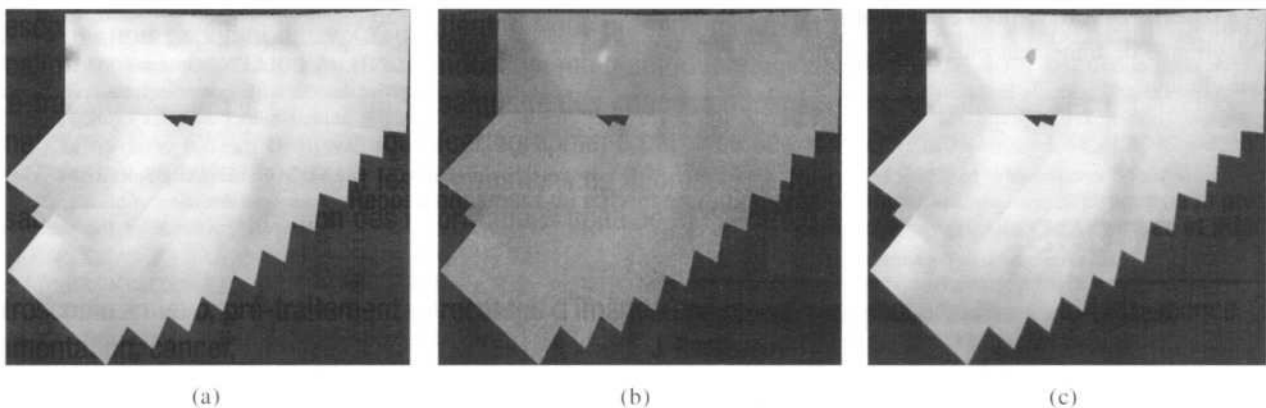


Figure 15. (a) Mosaïque d'une séquence d'images acquise sous lumière blanche. (b) Mosaïque des images de fluorescence correspondantes acquises dans la bande spectrale 470-490 nm. (c) Mosaïque en lumière blanche avec superposition de l'information spectrale (tache grise foncée résultat du seuillage de la mosaïque (b)).

5. Conclusions et perspectives

Nous avons montré l'intérêt et l'efficacité de la spectroscopie d'autofluorescence pour le diagnostic *in situ in vivo* de lésions cancéreuses précoces (œsophage). Nous avons mis en évidence et caractérisé la part du métabolisme cellulaire dans les spectres d'autofluorescence recueillis en montrant notamment que la transformation néoplasique est bien associée à une augmentation de l'intensité d'émission du NAD(P)H masquée par une diminution plus importante de celle du collagène. Les axes de recherche en cours visent à combiner les techniques spectroscopiques de fluorescence, réflectance et diffusion élastique afin d'améliorer encore l'efficacité de la détection des lésions néoplasiques précoces (spectroscopies « bi- ou tri-modales »). La mise en œuvre de ces techniques nécessite le développement de modèles théoriques adaptés auxquels nous travaillons actuellement (simulation statistique en diffusion et fluorescence, milieu multicouche) afin d'identifier des indicateurs diagnostiques pertinents.

Nous avons développé un dispositif d'imagerie endoscopique d'autofluorescence multi-bandes permettant d'acquérir les images en lumière blanche et en fluorescence dans trois bandes spectrales différentes. Nous avons montré une application originale de mosaïquage en vision monoculaire permettant de construire une image panoramique partielle à partir d'une séquence d'images endoscopiques. Les erreurs de recalage ont été quantifiées.

En exploitant les informations d'autofluorescence fournies par l'imageur dans la mosaïque construite, nous avons validé, sur fantôme, la faisabilité d'une superposition des informations spatiale et spectrale d'intérêt pour le clinicien. Le résultat obtenu peut être proposé comme un nouveau support de compte-rendu opératoire ou dans le cadre du suivi du patient.

Il nous faut à présent valider le fonctionnement du dispositif et de la méthode de recalage et mosaïquage développée sur modèles animaux et tumoraux. Avant de passer à des essais cliniques ultérieurs, nous travaillons également au développement d'un algorithme de traitement plus rapide, compatible avec la pratique clinique.

Références

- [Anidjar] M. ANIDJAR, D. ETTORI, O. CUSSENOT, P. MERIA, F. DESGRANDCHAMPS, A. CORTESE, P. TEILLAC, A. LE DUC, S. AVRILLIER "Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder tumors: dependence on the excitation wavelength", *The Journal of Urology*, Vol. 156, 1996, p.1590-1596.
- [Asari] K. ASARI, S. KUMAR, R. RADHAKRISHNAN "A new approach for nonlinear distortion correction in endoscopic images based on least squares estimation", *IEEE Transactions on Medical Imaging*, Vol. 18, 1999, p. 345-354.
- [Backman] V. BACKMAN, M. WALLACE, L. PERELMAN, J. ARENDT, R. GURJAR, M. MULLER, Q. ZHANG, G. ZONIOS, E. KLINE, T. MCGILLICAN, S. SHAPSHAY, T. VALDEZ, K. BADIZADEGAN, J. CRAWFORD, M. FITZMAURICE, S. KABANI, H. LEVIN, M. SEILER, R. DASARI, I. ITZKAN, J. VAN DAM, M. FELD "Detection of preinvasive cancer cells", *Nature*, Vol. 406, 2000, p. 35-36.
- [Bansal] R. BANSAL, L. H. STAIB, Z. CHEN, A. RANGARAJAN, J. KRISSELY, R. NATH, J. S. DUNCAN "Entropy-based, multipleportal-to-3DCT registration for prostate radiotherapy using iteratively estimated segmentation", In *Proceedings of the medical image computing and computer assisted intervention (MICCAI'99)*, Vol. 1679, Cambridge, Massachusetts, USA, 19-22 september 1999, p. 378-389.
- [Benavides] J.M. BENAVIDES, S. CHANG, S.Y. PARK, R. RICHARDS-KORTUM, N. MACKINNON, C. MACAULAY, A. MILBOURNE, A. MALPICA, M. FOLLEN "Multispectral digital colposcopy for in vivo detection of cervical cancer", *Optics Express*, Vol. 11, #10, 2003, p.1223-1236.
- [Bergman] J. BERGMAN, M. KARA, M. SMITS, W. ROSMOLEN, T. KATE, G. TYTGAT "A randomised cross-over study comparing light-induced fluorescence endoscopy (LIFE) with standard endoscopy for detection of early neoplasia in Barrett's esophagus (BE)", *Gastroenterology*, Vol. 124(suppl1), 2003, p. A-49.
- [Bigio] I.J. BIGIO, J.R. MOURANT "Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic scattering spectroscopy", *Physics in Medicine and Biology*, Vol. 42, 1997, p. 803-814.
- [Bourg-Heckly] G. BOURG-HECKLY, J. BLAIS, J.J. PADILLA, O. BOURDON, J. ETIENNE, F. GUILLEMIN, L. LAFAY "Endoscopic ultraviolet-induced autofluorescence spectroscopy of the esophagus: tissue characterization and potential for early cancer diagnosis", *Endoscopy*, Vol. 32, 2000, p. 756-765.
- [Brewer] M. BREWER, U. UTZINGER, E. SILVA, D. GERSHENSON, R. BAST, M. FOLLEN, R. RICHARDS-KORTUM "Fluorescence Spectroscopy for In Vivo Characterization of Ovarian Tissue", *Laser in Surgery and Medicine*, Vol. 29, 2001, p. 128-135.
- [Can] A. CAN, C. V. STEWARD, B. ROYSAM "Robust hierarchical algorithm for constructing a mosaic of images of the curved retina", *IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, Fort Collins, Colorado, USA, June 1999, p. 286-292.
- [Chang] S. CHANG, M. FOLLEN, M. MALPICA, U. UTZINGER, G. STAERKEL, D. COX, E. ATKINSON, C. MACAULAY, R. RICHARDS-KORTUM "Optimal Excitation Wavelengths for Discrimination of Cervical Neoplasia", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 49, #10, 2002, p. 1102-1111.
- [Chou] J. S. CHOU, J. QIAN, Z. WU, H. SCHRAMM "Automatic mosaic and display from a sequence of peripheral angiographic images", *Proceedings of the SPIE Medical Imaging: Image Processing*, Newport Beach, CA, USA, Vol. 3034, april 1997, p. 1077-1087.
- [Coghlan] L. COGHLAN, U. UTZINGER, R. DREZEK, D. HEINTZELMAN, A. ZULUAGA, C. BROOKER, R. RICHARDS-KORTUM, I. GIMENEZ-CONTI, M. FOLLEN "Optimal fluorescence excitation wavelengths for detection of squamous intra-epithelial neoplasia: results from an animal model", *Optics express*, Vol. 7, #12, 2000, p. 436-446.
- [Demos] S.G. DEMOS, R. GANDOUR-EDWARDS, R. RAMSAMOOJ, R. DEVERE WHITE "Spectroscopic detection of bladder cancer using near-infrared imaging techniques", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 9, #4, 2004, p. 767-771.
- [Drezek] R. DREZEK, K. SOKOLOV, U. UTZINGER, I. BOIKO, A. MALPICA, M. FOLLEN, R. RICHARDS KORTUM "Understanding the contribution of NAD(P)H and collagen to cervical tissue fluorescence spectra: Modeling, measurement, and implications", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 6, #4, 2001, p. 385-396.
- [Ferris] D.G. FERRIS, R.A. LAWHEAD, E.D. DICKMAN, N. HOLT-ZAPPEL, J. MILLER, S. GROGAN, S. BAMBOT, A. AGRAWAL, M. FAUPEL "Multimodal Hyperspectral Imaging for the Noninvasive Diagnosis of Cervical Neoplasia", *Journal of Lower tract Disease*, Vol. 5, #2, 2001, p. 65-72.

- [Georgakoudi-01] I. GEORGAKOUDI, B. JACOBSON, J. VAN DAM, V. BACKMAN, M. WALLACE, M. MULLER, Q. ZHANG, K. BADIZADEGAN, D. SUN, G. THOMAS, L. PERELMAN, M. FELD "Fluorescence, reflectance, and light-scattering spectroscopy for evaluating dysplasia in patients with Barrett's esophagus", *Journal of Lower tract Disease*, Vol. 5, #2, 2001, p. 65-72.
- [Georgakoudi-02] I. GEORGAKOUDI, B. JACOBSON, M. MULLER, E. SHEETS, K. BADIZADEGAN, D. CARR-LOCKE, C. CRUM, C. BOONE, R. DASARI, J. VAN DAM, M. FELD "NAD(P)H and collagen as *in vivo* quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes", *Cancer Research*, Vol. 62, 2002, p. 682-687.
- [Goujon] D. GOUJON, M. ZELLWEGER, A. RADU, P. GROSJEAN, B.C. WEBER, H. VAN DEN BERGH, P. MONNIER, G. WAGNIERES "In vivo autofluorescence imaging of early cancers in the human tracheobronchial tree with a spectrally optimised system", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 8, #1, 2003, p. 17-25.
- [Haringsma] J. HARINGSMA, G. TYGTAT, H. YANO, H. LISHI, M. TATSUTA, T. OGIHARA, H. WATANABE, N. SATO, N. MARCON, B. WILSON, R. CLINE "Autofluorescence endoscopy: feasibility of detection of GI neoplasms unapparent to white light endoscopy with an evolving technology", *Gastrointestinal Endoscopy*, Vol. 53, #6, 2001, p. 642-650.
- [Haussinger] K. HAUSSINGER, F. STANZEL, R.M. HUBER, J. PICHLER, H. STEPP "Autofluorescence Detection of Bronchial Tumors with the D-Light/AF", *Diagnostic and Therapeutic Endoscopy*, Vol. 5, 1999, p. 105-112.
- [Heintzelman] L.D. HEINTZELMAN, U. UTZINGER, H. FUCHS, A. ZULUAGA, K. GOSSAGE, A. GILLENWATER, R. JACOB, B. KEMP, R. RICHARDS-KORTUM "Optimal excitation wavelengths for *in vivo* detection of oral neoplasia using fluorescence spectroscopy", *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 72, #1, 2000, p. 103-113.
- [Helferty] J.P. HELFERTY, C. ZHANG, G. MACLENNAN, W.E. HIGGINS "Videoscopic distortion correction and its application to virtual guidance of endoscopy," *IEEE Transactions in Medical Imaging*, Vol. 20, pp. 605-617, 2001.
- [Hüttenberger] D. HUTTENBERGER, T. GABRECHT, G. WAGNIERES, B. WEBER, A. LINDER, H.G. FOTH, L. FREITAG "Autofluorescence detection of tumors in the human lung - comparison between *in vivo* and *in vitro* measurements", In *SPIE-ECBO European Conference on Biomedical Optics*, Munich, Allemagne, 12-16 juin, 2005.
- [Jalink] A. JALINK, J. Mc ADOO, G. HAMALA, H. LIU "Mosaic techniques for large-field digital mammography" *IEEE Transactions on Medical Imaging*, Vol. 15, #3, 1996, p. 260-267.
- [Kakihana] M. KAKIHANA, K.K. IL, T. OKUNAKA, K. FURUKAWA, T. HIRANO, C. KONAKA, H. KATO, Y. EBIHARA "Early Detection of Bronchial Lesions Using System of Autofluorescence Endoscopy (SAFE) 1000", *Diagnostic and Therapeutic Endoscopy*, Vol. 5, 1999, p. 99-104.
- [Kara] M. KARA, R.S. DACOSTA, B.C. WILSON, N.E. MARCON, J. BERGMAN "Autofluorescence-based detection of early neoplasia in patients with Barrett's esophagus", *Digestive Diseases*, Vol. 22, 2004, p. 134-141.
- [Kobayashi] M. KOBAYASHI, K. SHIBUYA, H. HOSHINO, T. FUJISAWA "Spectroscopic analysis of the autofluorescence from human bronchus using an ultraviolet laser diode", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 7, #4, 2002, p. 603-608.
- [Koenig] F. KOENIG, F.J. MCGOVERN, H. ENQUIST, R. LARNE, T. DEUTSCH, K. SCHOMACKER "Autofluorescence Guided Biopsy for the Early Diagnosis of Bladder Carcinoma", *The Journal of Urology*, Vol. 159, 1998, p. 1871-1875.
- [Kortum] R. RICHARDS-KORTUM, R. RAVA, R. PETRAS, M. FITZMAURICE, M. SIVAK, M. FELD "Spectroscopic diagnosis of colonic dysplasia", *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 53, #6, 1991, p. 777-786.
- [Kumar] D. KUMAR, M. SINGH "Characterization and imaging of compositional variation in tissues", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 50, #8, 2003, p. 1012-1019.
- [Liu] Q. LIU "Experimental validation of Monte Carlo modelling of fluorescence in tissues in the UV-visible spectrum", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 8, #2, 2003, p. 223-236.
- [Miranda-04a] R. MIRANDA-LUNA, Y. HERNANDEZ-MIER, Ch. DAUL, W. BLONDEL, D. WOLF "Mosaicing of medical videoendoscopic images: data quality improvement and algorithm testing", *IEEE International Conference on Electrical and Electronics Engineering (ICEEE) and Tenth Conference on Electrical Engineering (CIE 2004)*, Acapulco Guerrero, Mexico, September 2004, p. 530-535.
- [Miranda-04b] R. MIRANDA-LUNA, W. BLONDEL, Ch. DAUL, Y. HERNANDEZ-MIER, R. POSADA, D. WOLF "A simplified method of video-endoscopic image barrel distortion correction based on grey-level registration", *IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)*, Singapore, October 24-27 2004, p. 3383-3386.
- [Miranda-05] R. MIRANDA-LUNA, Y. HERNANDEZ-MIER, W.C.P.M. BLONDEL, C. DAUL, D. WOLF "Mosaicing of videoendoscopic images and evaluation of the resulting cartography" In *Imaging for medical and life sciences Symposium (IMVIE2)*, Strasbourg, France, March 1-3, 2005.
- [Müller] M.G. MULLER, T.A. VALDEZ, I. GEORGAKOUDI, V. BACKMAN, C. FUENTES, S. KABANI, N. LAVER, Z. WANG, C.W. BOONE, R.R. DASARI, S.M. SHAPSHAI, M.S. FELD "Spectroscopic Detection and Evaluation of Morphologic and Biochemical Changes in Early Human Oral Carcinoma", *Cancer*, Vol. 97, #7, 2003, p. 1681-1692.
- [Padilla] J.J.PADILLA IBARRA, "Biopsie Optique par Spectroscopie de Fluorescence des Tissus Vivants: Spectroscopie UV, Microscopie, Spectroscopie Résolue dans le Temps. Conception Instrumental, Traitement Automatique du Signal et Modélisation", Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine; Novembre 1999.
- [Palmer] G.M. PALMER, C. ZHU, T.M. BRESLIN, F. XU, K.W. GILCHRIST, N. RMANUJAM "Comparison of multiexcitation fluorescence and diffuse reflectance spectroscopy for the diagnosis of breast cancer (march 2003)", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 50, #11, 2003, p. 1233-1242.
- [Pfefer] T.J. PFEFER, D.Y. PAITHANKAR, J.M. PONEROS, K.T. SCHOMACKER, N.S. NISHIOKA "Temporally and spectrally resolved fluorescence spectroscopy for the detection of High Grade Dysplasia in Barrett's Esophagus", *Lasers in Surgery and Medicine*, Vol. 32, 2003, p. 10-16.
- [Pluim] J.P.W. PLUIM, J.B.A. MAINTZ, M.A. VIERGEVER "Mutual-information-based registration of medical images: a survey", *IEEE Transactions on Medical Imaging*, Vol. 22, #8, 2003, p. 986-1004.
- [Pradhan] A. PRADHAN, P. PAL, G. DUROCHER, L. VILLENEUVE, A. BALASSY, F. BABAI, L. GABOURY, L. BLANCHARD "Steady state and time-resolved fluorescence properties of metastatic and non-metastatic malignant cells from different species", *Journal of Photochemistry and Photobiology*, Vol. 31, 1995, p. 101-112.
- [Ramanujam-96] N. RAMANUJAM, M. MITCHELL, A. JANSEN, S. THOMSEN, G. STAERKEL, A. MALPICA, T. WRIGHT, N. ATKINSON, R. RICHARDS-KORTUM "Cervical precancer detection using a multivariate statistical algorithm based on laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths", *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 64, #4, 1996, p. 720-735.
- [Ramanujam-00] N. RAMANUJAM "Fluorescence Spectroscopy *in Vivo*", *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2000, Ed. R.A. Meyers.
- [Rollins] A. ROLLINS, M.V. SIVAK "Potential new endoscopic techniques for the earlier diagnosis of pre-malignancy", *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Vol. 15, #2, 2001, p. 227-247.
- [Sarrut] D. SARRUT, S. CLIPPE "Patient positioning in radiotherapy by registration of 2D-portal to 3D-CT images by a content-based research with similarity measures", In *Proceedings of the 14th Computer Assisted Radiology and Surgery*, Elsevier Science, USA, June 2000.
- [Sawhney] H.S. SAWHNEY, R. KUMAR "True multi-image alignment and its application to mosaicing and lens distortion correction," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Vol. 18, pp. 235-243, 1999.

- [Schindler] T. H. SCHINDLER, N. MAGOSAKI, M. JESERICH, U. OSER, T. KRAUSE, R. FISCHER, E. MOSER, E. NITZSCHE, M. ZEHNDER, H. JUST, U. SOLBACH "Fusion imaging: combined visualization of 3D-reconstructed coronary artery tree and 3D-myocardial scintigraphic image in coronary artery disease", *International Journal of Cardiac Imaging*, Vol. 15, 1999, p. 357-368.
- [Shahidi] R. SHAHIDI, M. BAX, C. MAURER, J. JOHNSON, E. WILKINSON, B. WANG, J. WEST, M. CITARDI, K. MANWARING, R. KHADEM "Implementation, calibration and accuracy testing of an image-enhanced endoscopy system", *IEEE transactions on Medical Imaging*, Vol. 21, #12, 2002, p. 1524-1535.
- [Skala] M.C. SKALA, G.M. PALMER, C. ZHU, Q. LIU, K.M. VROSTOS, C.L. MARSHEK-STONE, A. GENDRON-FITZPATRICK, N. RAMANUJAM "Investigation of fiber-optic probe designs for optical spectroscopic diagnosis of epithelial pre-cancers", *Lasers in Surgery and Medicine*, Vol. 34, 2004, p. 25-38
- [Sokolov] K. SOKOLOV, M. FOLLEN, K.R. RICHARD "Optical Spectroscopy for detection of neoplasia", *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 6, 2002, p. 665-658.
- [Svistun] E. SVISTUN, R. ALIZADEH-NADERI, A. EL-NAGGAR, R. JACOB, A. GILLENWATER, R. RICHARDS-KORTUM "Vision enhancement system for detection of oral cavity neoplasia based on autofluorescence", *Head Neck*, Vol. 26, 2004, p. 205-215
- [Takehana] S. TAKEHANA, M. KANEKO, H. MIZUNO "Endoscopic Diagnostic System Using Autofluorescence", *Diagnostic and Therapeutic Endoscopy*, Vol. 5, 1999, p. 59-63.
- [Thueller] P. THUELER, I. CHARVET, F. BEVILACQUA, M. St. GHISLAIN, G. ORY, P. MARQUET, P. MEDA, B. VERMEULEN, C. DEPEURSINGE "In vivo endoscopic tissue diagnostics based on spectroscopic absorption, scattering, and phase function properties", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 8, #3, 2003, p. 495-503
- [Valet] G. VALET, S. SANCHEZ, J. LOPEZ, Ch. DAUL, D. WOLF, G. KARCHER "Towards a new diagnosis aid of cardiovascular diseases using 2D-multimodal data registration and 3D-data superimposition", *IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)*, Singapore, October 24-27 2004, p. 1907-1910.
- [Villette-04] S. VILLETTE "Analyse spectroscopique de l'autofluorescence de cellules oesophagiennes saines et tumorales in vitro et développement d'un microspectro-imageur confocal fibré destiné à l'exploration *in vivo*", Thèse de doctorat, Université Paris 6, octobre 2004.
- [Villette-06] S. VILLETTE, S. PIGAGLIO-DESHAYES, C. VEVEBIZET, G. BOURG-HECKLY "Ultraviolet induced autofluorescence characterization of normal and tumoral esophageal epithelium cells with quantification of NAD(P)H", *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 5, 2006, p. 483-492.
- [Viola] P. VIOLA "Alignment by Maximization of Mutual Information", *PhD Thesis*. AI Technical Report No.1548, Massachusetts Institute of Technology, 1995.
- [Vogt] R. C. VOGT, J. M. TRENKLE, L. A. HARMON "Mosaic construction, processing and review of very large electron micrograph composites", *Proceedings of the SPIE*, Denver, Vol. 2847, August 1996, p. 2-15.
- [Wagnières-98] G. WAGNIERES, W.M. STAR, B.C. WILSON "In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for oncological applications", *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 68, #5, 1998, p. 603-632.
- [Wagnières-00] G. WAGNIERES, M. ZELLWEGER, N. CHAUVIN, N. LANGE, U. ZANGER, A. STUDZINSKI, H. VAN DEN BERGH "Diagnosis apparatus for the picture providing recording of fluorescing biological tissue regions" US Patent 6,148,227, November 2000.
- [Wallace] M. WALLACE, L. PERELMAN, V. BACKMAN, J. CRAWFORD, M. FITZMAURICE, M. SEILER, K. BADIZADEGAN, S. SHIELDS, I. ITZKAN, R. DASARI, J. VAN DAM, M. FELD "Endoscopic detection of dysplasia in patients with Barrett's esophagus using light-scattering spectroscopy", *Gastroenterology*, Vol. 119, 2000, p. 677-682.
- [Weng] L. WENG, A. P. TURUMALAI "Method and apparatus for generating large compound ultrasound images" US Patent 5,575,286, November 1996.
- [Zellweger] M. ZELLWEGER, P. GROSJEAN, D. GOUJON, P. MONNIER, H. VAN DEN BERGH, G. WAGNIERES "In vivo autofluorescence spectroscopy of human bronchial tissue to optimise the detection and imaging of early cancers" *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 6, #1, 2001, p. 41-51.
- [Zheng] W. ZHENG, W. LAU, C. CHENG, K.C. SOO, M. OLIVO "Optimal excitation-emission wavelengths for autofluorescence diagnosis of bladder tumors", *International Journal of Cancer*, Vol. 104, 2003, p. 477-481.
- [Zeng] H. ZENG, M. PETEK, M.T. ZORMAN, A. McWILLIAMS, B. PALCIC, S. LAM "Integrated endoscopy system for simultaneous imaging and spectroscopy for early lung cancer detection", *Optics Letters*, Vol. 29, #6, 2004, p. 587-589
- [Zonios] G. ZONIOS, R. COTHREN, J. ARENDT, J. WU, J. VAN DAM, J. CRAWFORD, R. MANOHARAN, M. FELD "Morphological model of human colon tissue fluorescence", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 43, #2, 1996, p. 113-122.



Walter Blondel

Walter Blondel est né en 1968 à Nancy. Il est ingénieur ESIGELEC (91), titulaire du Master of Science (MSc) en optoélectronique de l'université de Hertfordshire (Angleterre, 92) et du doctorat en Génie Biologique et Médical de l'université Henri Poincaré Nancy 1 (UHP, 2000). Agrégé de Génie Électrique, il est Maître de Conférences à la faculté de médecine (Nancy Université) où il enseigne l'instrumentation et le traitement des signaux en Master (Ingénierie Biomédicale). Responsable depuis 2003 du projet « Spectro-Imagerie de Diagnostic » au sein du CRAN (UMR 7039 CNRS-INPL-UHP), ses activités de recherche concernent les applications de l'instrumentation et du traitement des signaux (1D, 2D) à l'ingénierie pour la santé et en particulier aux interactions lumière – tissus biologiques (modélisation) dans le cadre du photodiagnostic .



Christian Daul

Christian Daul a obtenu un doctorat en sciences (spécialité: vision par ordinateur) de l'Université Louis Pasteur (ULP), à Strasbourg en 1994. De 1990 à 1995, il a été chercheur au Laboratoire des Sciences de l'Image, de l'Informatique et de la Télé-détection (LSIIT, ULP) avant de rejoindre l'« Institut für Techno- und Wirtschaftsmathematik » (ITWM, Fraunhofer Institut) de Kaiserslautern, Allemagne, où il était membre du groupe de traitement d'images. Depuis octobre 1999, il est chercheur au Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN UMR CNRS 7039) où il travaille dans le domaine de l'imagerie médicale. Ses principaux thèmes de recherche sont la segmentation, le recalage et la reconstruction 3D de données. Il est actuellement maître de conférences à l'Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL/EEIGM) où il enseigne dans le domaine du traitement du signal.



Sandrine **Villette**

Sandrine Villette est née en 1976, dans la Sarthe. Elle est titulaire d'un diplôme d'ingénieur en optique (École Supérieure d'Optique, Orsay). Elle a obtenu le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris 6) en 2004. Après un premier stage postdoctoral aux Pays-Bas, dans le groupe « Biophysical Engineering » de l'Université de Twente et le « Laser Centre » de l'Academic Medical Center d'Amsterdam, elle travaille actuellement au Service de Bioénergétique du CEA de Saclay, dans l'équipe de Klaus Brettel. Ses travaux de recherches sont orientés vers les applications de l'optique dans le domaine biomédical, avec une spécialisation en spectroscopie (autofluorescence, Raman, absorption).



Rosebet **Miranda-Luna**

Rosebet Miranda Luna est né en 1973 au Mexique. Il est titulaire d'un diplôme d'ingénieur en électronique (Instituto Tecnológico de San Luis Potosi). Il a obtenu le titre de « Master in Science » (MS) du « Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del IPN » (Mexique) en 2000, et le grade de Docteur en 2005 à l'Institut National Polytechnique de Lorraine (Nancy, France). Ses sujets d'intérêt sont le traitement des signaux et d'images avec application médicale, au même titre que l'automatisation et l'instrumentation.



Yahir **Hernandez-Mier**

Yahir Hernandez Mier est né en 1977 à Durango, Mexique. Il est ingénieur en électronique par l'ITCV (Mexique, 1999) et il a obtenu le Master of Science (Msc) en bioélectronique au Centre de Recherche et d'études Avancées de l'Institut Polytechnique National (CINVESTAV-IPN) (Mexique, 2003). Il fait actuellement des études de doctorat au sein du groupe Ingénierie Pour la Santé du Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN UMR CNRS 7039), où il travaille dans le domaine du traitement d'images, spécifiquement dans le mosaïquage d'images.



Geneviève **Bourg-Heckly**

Geneviève Bourg-Heckly est née en 1948 à Metz. Titulaire d'un doctorat en physique de l'université Paris 6 et HDR, elle a commencé sa carrière comme chercheur en physique de l'atmosphère. Elle a ensuite travaillé une dizaine d'années dans l'industrie du laser puis de l'imagerie médicale, avant de rejoindre l'université Paris 6 en tant que Maître de Conférences. Depuis 1996 elle développe au sein du BioMoCeTi (UMR CNRS 7033) une activité de recherche en optique biomédicale. Responsable de l'équipe « Applications Biomédicales », ses travaux concernent les nouvelles méthodes de diagnostic précoce fondées sur l'exploitation de la spectroscopie tissulaire de fluorescence et la thérapie photodynamique. Les études menées vont de l'aspect fondamental au niveau cellulaire et tissulaire à l'application clinique.



Didier **Wolf**

Didier Wolf est professeur d'Automatique à l'ENSEM-INPL, responsable du thème « Ingénierie pour la Santé » et directeur adjoint du CRAN-UMR 7039. Ses activités de recherche concernent le traitement du signal et de l'image appliqué à la radiothérapie, au photodiagnostic pré-cancéreux et à l'analyse des signaux physiologiques (EEG)

S

**II.3 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP),
2004, 5 :3383–3386**

,

A SIMPLIFIED METHOD OF ENDOSCOPIC IMAGE DISTORTION CORRECTION BASED ON GREY LEVEL REGISTRATION

R. Miranda-Luna, W.C.P.M. Blondel, C. Daul, Y. Hernandez-Mier, R. Posada and D. Wolf

CNRS UMR 7039 – CRAN (Centre de Recherche en Automatique de Nancy)
2, avenue de la Forêt de Haye, 54516 Vandoeuvre-Lès-Nancy Cedex, France.

ABSTRACT

We present a new method of endoscopic camera calibration for non-linear radial distortion correction. The algorithm implemented computes both projective (camera) and polynomial (distortion) transformations. The optimization process registers the corrected distorted pattern image with the non-distorted one. Mutual information was used as measure of similarity and stochastic gradient descent method for optimization.

The algorithm was tested with two b/w (chessboard, concentric circles) and one grey level patterns, for 3 angular positions of the endoscope (0°, 5° and 10° to perpendicular). Convergence time increased with the angle. Maximal mean correction error was less than 0.45 % with optimized distortion parameters calculated for the grey level pattern. Tested inclinations did not have significant effects on errors. Results obtained show the interest of the method proposed that requires only approximative perpendicular positioning of the endoscope and simple grey level calibration patterns without precise geometrical characteristics.

1. INTRODUCTION

Video-based endoscopic systems are viewing inspection tools used in standard clinical examination of inside body cavities and hollow organs. They permit to generate and to record images sequences, each image showing a small part of the fully scanned observed area. Therefore, a unique global image of this area should constitute a simplified and easy to use representation helpful to the clinician in post-operative observations [4]. Bi-dimensional cartographies or high resolution panoramas of the overall surface of the observed tissues can be built by mosaicing these successive overlapping images. The mosaicing process consists firstly in finding the registration parameters of two consecutive images from the sequence and secondly in combining all the registered images to build one panoramic image. To do so, a search space has to be defined. In the case of free distorted acquisition systems, a

projective transformation is a suitable model for the camera and the motion of the viewpoint between images [1,5].

However, endoscopes are instruments designed to have a small diameter examination tube and a distal tip optics allowing image acquisition over a wide field of view (FOV). Such lenses therefore produce non-linear geometrical distortion (not angular but mainly radial) named barrel distortion [2,6], which is a problem for accurate and automatic registration. Furthermore, in clinical practice, several different endoscopes are used and submitted to cleaning (decontamination) processes. This implies systematic recalculation of correction parameters for each endoscope. The correction method should therefore be easy to implement. To perform barrel distortion correction, a calibration step is needed for determining the optical distortion center and the radial distortion parameters. Most recent works on the calculation of correction parameters of endoscopes barrel distortion propose methods based on the acquisition of an image of a calibration grid with precise geometrical characteristics, with or without need of exact perpendicular positioning [1,3]. We propose a more flexible and easy to handle method to determine the coefficients of the non-linear polynomial transformation by registering a non-distorted pattern and the corresponding distorted image acquired with an endoscope. The idea is to determine during the optimisation process of the registration both, the parameters of a projective transformation matrix (extrinsic parameters) and the polynomial coefficients (intrinsic parameters). By this way, neither calibration pattern with precise geometrical characteristics nor precise positioning platform are needed. We present here our method and the results obtained for various types of pattern and for different angular position of the viewpoint.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Images acquisition and test protocol

The calibration procedure starts with the acquisition of the image of a motionless planar scene characterised by a known reference pattern. Images were acquired through a

FUJINON FG-100FP fibroscope by a b/w CCD camera (Leritier 760 ULL) and digitized using a video board Matrox Meteor-II to obtain an image size of 768 x 576.

By means of a positioning system, the viewpoint (distal tip of the endoscope) was set at a distance between 32 and 39 mm to the scene such that the image pattern filled the whole sensor's FOV. In order to evaluate the influence of perspective on the sensibility of the method to give good correction parameters, positions of the viewpoint were tested with 0°, 5° and 10° angles from the perpendicular to the pattern plane. Furthermore, in order to evaluate the efficiency of the method according to the nature of information contained in images, we tested two black and white patterns with particular shapes (chessboard and concentric circles) and one grey level image (Figure 1). The original non-distorted patterns were images stored in the computer. To reduce the processing time, all images were processed at dimension of 384 by 288 pixels, resulting in a resolution of 163 dpi.

2.2. Distortion correction and perspective models

Non linear radial distortion correction is modelled by the optical center coordinates (C_x, C_y) and a radial distortion r' expressed as the following polynomial relationship :

$$r' = \sum_{i=1}^N k_i \cdot r^i \quad \text{with } k_i=1 \quad (1)$$

where r is the radial distance between an image point of coordinates (x,y) and the optical center, k_i are correction coefficients used to obtain the undistorted image.

The number of parameters k_i to be calculated depends on the importance of the distortion and on the precision required to model it. In our case we choose $N = 5$ which was evaluate to be a good compromise between processing time and calculation precision. The model used for the 2D-2D camera-to-scene transformation takes into account translations, rotations, viewpoint and scale factor existing between the original non-distorted image U and the distorted acquired image V :

$$U = TV = T_e T_i V \quad (2)$$

where T_e is a 2D projective matrix of extrinsic parameters and T_i is the intrinsic (polynomial) parameters matrix. Since both transformation (projective and polynomial) are independents, resulting radial corrections parameters (C_x, C_y and k_i) can be isolated after the registration procedure of calibration in order to perform a systematic radial correction of all images acquired with the endoscope as long as its optics will not be modified.

2.3. Registration algorithm and parameters calculation

Our method consists in optimizing extrinsic and radial distortion correction parameters in order to registrate the

corrected distorted image to the original non-distorted pattern. We performed a 2D-2D grey-level image registration method based on mutual information. A stochastic gradient descent algorithm was implemented to optimize the computation of the parameters of both projective and polynomial transformations.

Mutual information $I(U,W)$ is a very robust measure of similarity between superimposed parts of two images U and W characterized only by grey level distributions. In order to obtain a measure less sensitive to problems of poorly informative overlapping areas (like background or no particular anatomical structures) we used the following form of definition including the entropy of each images $H(U)$, $H(W)$ and the joint entropy $H(U,W)$:

$$I(U,W) = H(U) + H(W) - H(U,W) \quad (3)$$

where $W = TV$ corresponds to a corrected distorted image. An iterative global optimisation method of stochastic gradient descent (well adapted to overcome narrow local maximum that can trap gradient techniques) was implemented to determine the parameters values of optimised transformation \tilde{T} leading to the global maximum of the mutual information function such as :

$$\tilde{T} = \arg \max_T (I(U,TV)) \quad (4)$$

Typical polynomial and projective initial parameters were: optical center = image center, $k_i = 0$, scale factor = 0.85 and initial translations and rotations = 0. The values of these parameters were updated at each iteration of the algorithm so that :

$$T(i+1) = T(i) + \lambda \frac{\partial I(U,T(i)V)}{\partial T} \quad \text{at } (i+1)^{\text{th}} \text{ step} \quad (5)$$

where λ is a convergence rate parameter that is progressively reduced when approaching the maximum.

Error of radial distortion correction was estimated on the basis of the chessboard pattern (Figure 1) by calculating euclidean distances between centre points of corresponding white squares in the binarized endoscopic image after correction and in the non-distorted image. In order to compare identical types of errors for all patterns, the correction parameters obtained for circles and grey level patterns and for all viewpoint angles were applied to their corresponding distorted chessboard images. The corrected images therefore obtained were used for errors calculation. Final errors e_{mean} and e_{max} were expressed as average and maximum errors normalized to the diameter of the FOV (449 pixels) [1].

3. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the results of the correction obtained for the three different patterns A, B, C acquired each from three angular positions of the endoscope to the pattern plane (0°, 5° and 10° deviation from perpendicular).

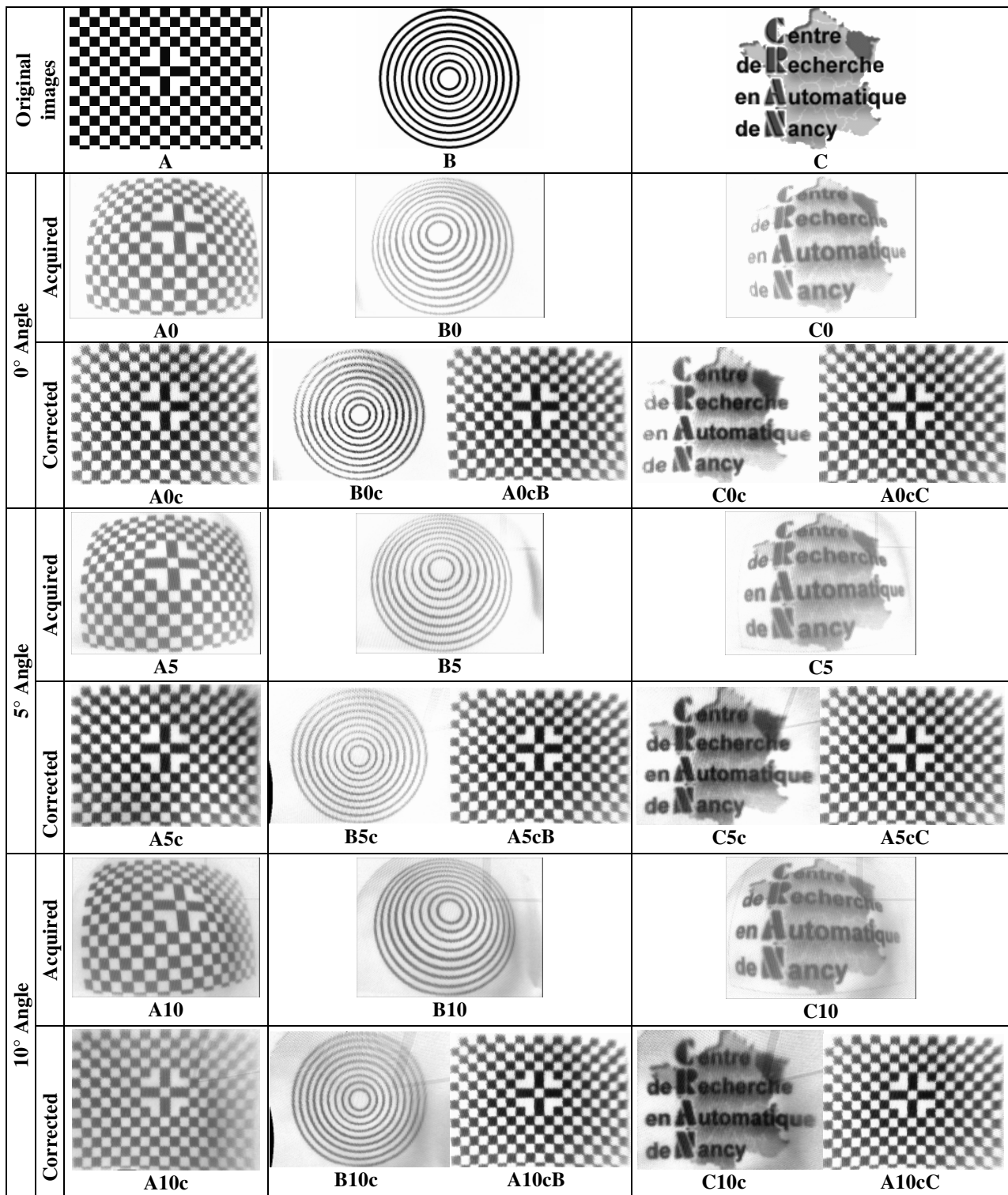


Figure 1. Visual results for 3 original patterns A, B and C.

A_i, B_i, C_i ($i=0,5,10$) – Distorted endoscopic images of A, B, C at $0^\circ, 5^\circ$ and 10° from perpendicular.

A_{ic}, B_{ic}, C_{ic} ($i=0,5,10$) – Corrected endoscopic images of A, B, C at $0^\circ, 5^\circ$ and 10° from perpendicular.

A_{icB}, A_{icC} ($i=0,5,10$) – Corrected images of A based on correction parameters of B, C at $0^\circ, 5^\circ$ and 10° from perpendicular.

Table 1. Numerical results after optimisation

k_i and $C_{x,y}$ – Radial distortion correction coefficients (dimensionless) and optical center coordinates (pixels)

e_{mean} , e_{max} – Mean and maximum errors in pixels (left col.) and normalized in % of the diameter of the FOV (right col.)

IMAGE	$k_2 \times 10^{-4}$	$k_3 \times 10^{-6}$	$k_4 \times 10^{-8}$	$k_5 \times 10^{-11}$	Cx	Cy	e_{mean}		e_{max}	
							pixels	% FOV	pixels	% FOV
A0	5.36	1.42	2.46	6.54	190.2	118.9	1.33	0.30	3.70	0.84
A5	3.12	1.92	2.69	6.18	187.7	117.5	1.52	0.34	4.73	1.07
A10	5.59	1.09	2.32	6.28	188.5	121.0	0.94	0.21	3.68	0.83
B0	3.53	1.89	2.61	5.60	190.2	122.7	1.59	0.36	3.20	0.72
B5	4.44	2.04	2.68	5.68	186.4	123.8	1.90	0.43	5.59	1.26
B10	5.08	1.94	2.50	5.25	184.9	121.9	1.80	0.41	4.98	1.13
B0	5.99	2.58	3.29	6.79	190.5	125.6	1.67	0.38	7.15	1.62
B5	3.52	2.21	3.08	6.77	187.8	123.7	2.00	0.45	4.13	0.93
B10	3.14	2.03	3.02	7.02	186.6	125.3	1.74	0.39	6.20	1.4

Convergence was normally achieved in approximately 100 iterations (about 5 minutes computation time) for images acquired with endoscope positioned perpendicularly to the pattern. When the angle of acquisition increases, the number of iterations also increases, therefore the probability of reaching a local maximum becomes greater. We also observed that the optimisation algorithm was more easily trapped around a local maximum in the case of the circles pattern, than for both others. Table 1 gives the numerical values of the parameters computed by the algorithm for experiments in Figure 1. The values of k_4 and k_5 are in the same order of magnitude whatever the angle for each pattern confirming their little importance in the correction. A larger disparity exists between the values of k_2 and k_3 for the 3 patterns at same angles. The comparison of the values of normalized errors obtained for all images allows to evaluate more exactly the influence of the pattern type and of the inclination angle. For each of the 3 images acquired with an angular position up to 10° , the inclination does not have a significant influence on the mean errors e_{mean} (0.21 to 0.34% for A, 0.36 to 0.43% for B, 0.38 to 0.45% for C). The values of e_{mean} increase from A to B to C and comparing for respective angular positions, globally of about 30 to 60%. The values of maximal errors e_{max} are systematically 2 to 4 times greater than their corresponding mean errors values. However, all the values obtained for e_{mean} are fully acceptable since the maximal mean normalized error of 0.45% (obtained for the grey level pattern with inclination) is comparable to other referenced results [3]. Consequently, a fully automated correction-calibration procedure of a video-endoscope maintained roughly perpendicular and using a grey level pattern can be performed with a fully acceptable final error. The main advantage of the method over others [1,3,4] is its simplicity; no specifically precise pattern geometry is needed and the endoscope can be held with the hand.

4. CONCLUSIONS

The method here proposed is easy to apply and flexible

since radial distortion correction parameters can be determined in few minutes using a simple good contrasted grey level pattern acquired with the endoscope roughly perpendicular to it. Results were obtained with final errors comparable to those given by other methods necessitating specific calibration grid and positioning. Further tests are conducted in order to obtain and compare more statistic results.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the financial supports from the CONACYT and the Ligue Contre le Cancer.

6. REFERENCES

- [1] R. Shahidi, M.R. Bax, C.R. Maurer, J.A. Jhonson, E.P. Wilkinson, B. Wang, J.B. West, M.J. Citardi, K.H. Manwaring, and R. Khadem, "Implementation, calibration and accuracy testing of image-enhanced endoscopy system," *IEEE Trans. Med. Imaging*, Vol.11, pp. 1524-1535, 2002.
- [2] H. Tian, T. Srikanthan, K.V. Asari, and S.K. Lam, "Study on the effect of object to camera distance on polynomial expansion coefficients in barrel distortion correction," in *Fifth IEEE Southwest symposium on Image Analysis and Interpretation SSIAT'02*, 2002.
- [3] J.P. Helferty, C. Zhang, G. McLennan, and W.E. Higgins, "Videoendoscopic distortion correction and its application to virtual guidance of endoscopy," *IEEE Trans. Med. Imaging*, Vol.20, pp. 605-617, 2001.
- [4] H.S. Sawhney, and R. Kumar, "True multi-image alignment and its application to mosaicing and lens distortion correction," *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell.*, Vol.18, pp. 235-243, 1999.
- [5] K.V. Asari, S. kumar, and D. Radhakrishnan, "A new approach for nonlinear distortion correction in endoscopic images based on least squares method," *IEEE Trans. Med. Imaging*, Vol.18, pp. 345-354, 1999.
- [6] W.E. Smith, N. Vakil, and A. Maislin, "Correction of distortion in endoscope images," *IEEE Trans. Med. Imaging*, Vol.11, pp. 117-122, 1992.

**II.4 IFAC Modelling and Control in Biomedical Systems, 2006,
41–46**

,

**DIFFUSE REFLECTANCE SPECTROSCOPY
MONTE-CARLO MODELING: ELONGATED
ARTERIAL TISSUES OPTICAL PROPERTIES**

Emilie Péry^{*,*} Walter C.P.M. Blondel^{*,**}
Cédric Thomas^{*,**} Jacques Didelon^{***}
François Guillemin^{*,**,*}**

** Centre de Recherche en Automatique de Nancy,
UMR 7039 CNRS - INPL - UHP
54516 Vandoeuvre-Lès-Nancy Cedex, France
** Université Henry Poincaré Nancy 1,
54000 Nancy, France
*** Centre Alexis Vautrin,
54511 Vandoeuvre-Lès-Nancy Cedex, France*

Abstract: Optical methods, such as reflectance and fluorescence spectroscopy, have shown the potential to characterize biological tissues. The goal of this study is to simulate the steady-state light transport in arterial tissues with optical parameters found in the literature, then to deduce optical properties of tissues through optimization and finally to experimentally verify Monte-Carlo modeling of steady-state diffuse reflectance. The optical properties found are roughly in the same order of magnitude than the optical parameters found in the literature and the results indicate that the simulated results agree reasonably well with the experimentally measured results. *Copyright © 2006 IFAC*

Keywords: Monte Carlo simulation, photon transport, optical properties, optimization problems, reflectance spectroscopy.

1. INTRODUCTION

Optical methods can be used to characterize biological tissues non-invasively. By taking simultaneously spectral readings and by correlating data from various types of method (autofluorescence, diffuse reflectance...), the differentiation degree between various types of biological tissues can be increased through the complementarity of collected information (Bigio and Mourant, 1997), (Georgakoudi *et al.*, 2001).

Light-tissue interactions may be modeled through statistical simulation methods (i. e. Monte Carlo algorithm) which aims to simulate the random walk of photons inside biological tissue. It pro-

vides a very flexible technique for investigating light propagation in tissues and has been widely used for nearly two decades (Metropolis and Ulam, 1949), (Wilson and Adam, 1983). Monte Carlo simulation has been developed to solve various physical problems besides laser-tissue interactions. This type of statistic simulation is well adapted to calculate light transmission and reflectance following absorption and diffusion in complex and multilayered structures such as the biological tissues and to solve the problem of identifying the optical properties of each layer.

In our previous studies (Choserot *et al.*, 2005), (Péry *et al.*, 2005), we used autofluorescence and elastic scattering spectroscopies to show the ex-

istence of a correlation between optical properties (spectra) and rheological properties (stress - strain characteristics) of artery rings before and after cryopreservation. The study presented here extends the experimental work through a Monte Carlo simulation.

Based on Monte Carlo algorithms already developed and published in the literature (Prahl *et al.*, 1989), (Wang *et al.*, 1995), and (Liu *et al.*, 2003), we have developed a simulation program of steady-state light transport in arterial tissues with specific features : like multiple distances of reflectance fibers (corresponding to the geometry of our probe), broad band of visible wavelength excitation and emission with 10nm sampling step. Each photon launched is propagated using the optical properties of the layers at the specific excitation wavelength. Actually, simulations developed in the literature rather use monochromatic light sources than broad band spectrum sources. Considering the whole wavelength range from 600 to 800 nm should allow to better characterize the optical contribution of the different layer constituents.

In this work, we compare optical parameters obtained by simulation to various strain states with optical parameters found in the literature.

2. MATERIALS AND METHODS

Segments of carotid arteries were harvested from four young pigs weighing between 20 and 30 kg, following a potassium injection. Each pig carotid artery segment was cut in 4 rings of about 4 mm in length: 16 rings in total. Diffuse reflectance spectra were measured for each ring in a water bath at first, just after excision and then after a one-month cryopreservation (Metropolis and Ulam, 1996) at different elongations (Choserot *et al.*, 2005).

2.1 Measurements

An uniaxial mechanical testing device was used for stretching the rings and measuring the circumferential elongation and the corresponding force. Circumferential stresses were calculated for large strains. Rings were stretched from 0% to 70% by 10% steps.

Simultaneously, in order to measure optical characteristics of the artery samples under test, an elastic scattering spectroscopy was developed for recording spatially resolved diffuse reflectance spectra mainly between 600 and 800 nm at two distances between illumination and acquisition fibers: 0.53 mm and 1.74 mm.

The light source combined three LEDs covering

600 to 800 nm and a specific seven fiber optic probe (200 mm core diameter each) was used for the experiments. The probe positioning was adjusted with a specific device to come in gentle contact with the upper surface of the arterial tissue during tests.

This device used an USB2000 spectrometer (Ocean Optics, France; pixel resolution ≈ 0.32 nm) connected to a computer and a specifically developed software to collect, process and store diffuse reflectance spectra for each strain applied.

2.2 Modeling

GENERAL PARAMETERS: The trajectories of the photons were simulated in the 600 nm to 800 nm wavelength band, considering a semi-infinite medium with three layers corresponding to the adventice, the media and the intima layers of the arterial tissue. The program calculates the energy quantities deposited with each event in each layer according to absorption and scattering coefficients $\mu_a^i(\lambda)$ and $\mu_s^i(\lambda)$. Three coordinate systems can be used in the Monte Carlo simulation at the same time. A cartesian coordinate system is used to trace photon movements; a cylindrical coordinate system to score internal photon absorption as a function of r and z , where r and z are, respectively, the radial and axial coordinates of the cylindrical coordinate system and finally, a spherical coordinate system to sample the propagation direction change of a photon.

Each layer is described by the following parameters: a thickness e , an absorption coefficient μ_a (cm^{-1}), a scattering coefficient μ_s (cm^{-1}), a refractive index n , and an anisotropy factor g (see Fig. 1). The refractive index of the ambient medium above the tissue n_1 was the one of air. The ambient medium below the tissue was an isotonic NaCl solution for which $n_2 = 1.33$. n^i , μ_a^i , μ_s^i , g^i are respectively the refractive index, the absorption coefficients, the scattering coefficients, and the anisotropy factors for the adventice ($i = A$), the media ($i = M$) and the intima ($i = I$). The tissue layers are parallel to each other.

Configuration parameters of the software include illumination and collection fiber geometries, three-dimensional light distribution in tissue multiple layers, and wavelength resolution.

We determined the experimental values of the various parameters to be used in our model like the respective thickness of the three layers of the arteries according to the histological cuts realized and images of each ring.

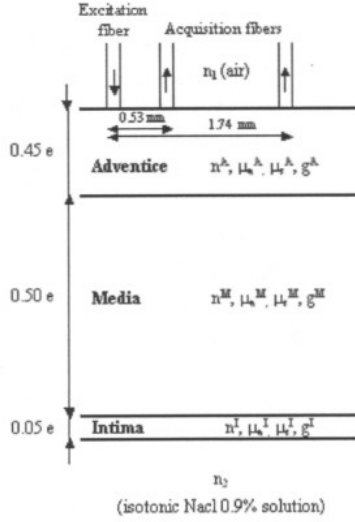


Fig. 1. Schematic representation of the three-layers model used to simulate light transport in an arterial tissue. e is the total thickness of the artery wall and n^i , μ_a^i , μ_s^i , g^i are respectively the refractive index, the absorption coefficients, the scattering coefficients, and the anisotropy factors for the adventice ($i = A$), the media ($i = M$) and the intima ($i = I$). n_1 and n_2 are the refractive index of surrounding medium, i.e. air ($n_1 = 1$) and isotonic NaCl ($n_2 = 1.33$).

The numerical values used in our simulation for the optical parameters of the intima, the media, the adventice (Table 1) and the refractive indices (Table 2) for arterial tissue were based on a combination of few references from the literature (See Ref. 1: (Cheong *et al.*, 1990) and Ref. 2: (Muller and Roggan, 1995)).

Table 1. Values of optical parameters for arterial tissue chosen from the literature and implemented in our simulation program (Ref. 1: (Cheong *et al.*, 1990), and Ref. 2: (Muller and Roggan, 1995)).

Description	λ (nm)	μ_a (cm^{-1})	μ_s (cm^{-1})	g	Ref
Intima	476	14.8	237	0.81	1
	580	8.9	183	0.81	1
	600	4	178	0.81	1
	633	3.6	171	0.85	1
	1064	2.3	165	0.97	2
Media	476	7.3	410	0.89	1
	580	4.8	331	0.9	1
	600	2.5	323	0.89	1
	633	2.3	310	0.9	1
	1064	1	634	0.96	2
Adventice	476	18.1	267	0.74	1
	580	11.3	217	0.77	1
	600	6.1	211	0.78	1
	633	5.8	195	0.81	1
	1064	2	484	0.97	2

Table 2. Values of the refractive index for arterial tissue (Ref. 2: (Muller and Roggan, 1995)).

Description	λ (nm)	n	Ref
Intima	456-1064	1.39	2
Media	456-1064	1.38	2
Adventice	456-1064	1.36	2

In order to work over a broad-band spectrum (between 600 and 800 nm), we have interpolated the five values found in the literature to determine values for the other wavelengths (20 values), one value each 10 nm. Ten million photons were launched in each simulation at random uniformly distributed locations over the diameter of the excitation fiber, i. e. 1.5 millions photons per wavelength.

SIMULATING PHOTON PROPAGATION: Step 1, the photon are injected orthogonally into the tissue at the origin and thrown from a random position in the fiber diameter. The photons emitted by the source (parameters corresponding to the light source used in our experiments) are launched with a random trajectory and are included in the surface of the emission fiber. When the photon is launched, some specular reflectance will occur if there is a refractive-index-mismatched interface between the tissue and the ambient medium. If the refractive indices of the outside medium and the tissue are n_1 and n_A respectively, then the specular reflectance, R_{sp} , is expressed by the relation 1:

$$R_{sp} = \frac{(n_1 - n_A)^2}{(n_1 + n_A)^2} \quad (1)$$

Step 2, if photons hit an interface between two layers (all-or-none method), either they are completely refracted ($n_i < n_t$ where n_i and n_t are the refractive indices of the incident and transmitted layers), or they are completely reflected ($n_i > n_t$ and $a_t > a_c$ where a_t corresponds to the angle of transmission and a_c the critical angle), or the two cases are possible ($n_i > n_t$ and $a_t < a_c$) according to the reflective coefficient. This reflective coefficient, $R(a_i)$, is calculated by Fresnel's formulas (cf. equation 2):

$$R(a_i) = \frac{1}{2} \left[\frac{\sin^2(a_i - a_t)}{\sin^2(a_i + a_t)} + \frac{\tan^2(a_i - a_t)}{\tan^2(a_i + a_t)} \right], \quad (2)$$

where a_i is the angle of incidence, and a_t the angle of transmission.

At each step, the energy deposited with each event is recorded and cumulated in each voxel, for all photons.

Step 3, when a photon is scattered, the probability distribution of the deflection angle θ is described by the scattering phase function (Henyey and Greenstein, 1941):

$$p(\cos \theta) = \frac{1}{2} \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{3/2}} \quad (3)$$

Step 4, photons can terminate in three different ways. After a photon travels, it can be counted out of the tissue by reflection or transmission. Through diffuse reflection, some photons can be collected in the diffuse reception fibers. Finally, when the energy left for a photon still in the tissue is less than a threshold value, a chance of surviving is given following the Russian roulette technique (Hendricks and Booth, 1985).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Experimental results

We compute the mean of the elastic scattering spectra collected on each channel (channel 1: 0.53 mm and channel 2: 1.74 mm) for three different strains applied to the samples. The resulting spectrum is shown in Fig. 2.

These results show us that the global intensity of spectra decreases as strains rise. These variations are less marked for channel 2 than for channel 1. The longer course that the photons must carry out between excitation fibers of the channel 2 and the reception fiber, implies more absorption by the arterial tissue, which results in a lower total intensity second group of spectra (channel 2). The spectra resulting from scattered photons

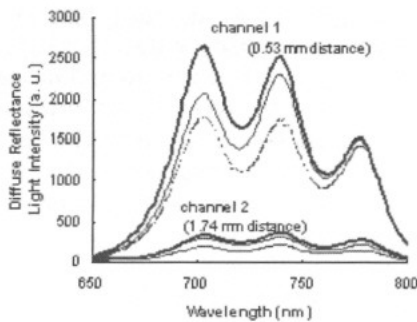


Fig. 2. Experimental results of diffuse reflectance (mean of spectra of every artery ring) for strains of 0% (full line), 30% (fine line) and 60% (dotted line) at 0.53 mm (channel 1) and 1.74 mm (channel 2) excitation-reception distances.

coming from the excitation channel 1 thus seem to be good indicators of the differences in optical behavior and in mechanical state of deformation of the samples tested. Intensity variations of the

diffuse reflectance are well correlated with elongation, i.e. structure organization modifications, thus with artery mechanical properties.

In Fig. 2, we also notice that the light intensity corresponding to the diffused photons issued from channel 2 (1.74 mm emission distance) only varies very slightly with strains for fresh as well as for cryopreserved rings.

We calculate the area under the curve for each spectrum, for each imposed strain and for each channel for fresh and cryopreserved artery and we compare these results using a statistical Student T-test (Table 3), for a risk of 5%.

Table 3. Statistical results (Student T-test) comparing of elastic scattering for the channel 1 (0.53 mm). NS means Non-Significant Difference with H_0 accepted (H_0 : null hypothesis) and DS means Significant Difference with H_0 rejected.

	T_{calc}	T	
Intra pigs: fresh (sample's number = 8)	0.11	2.45	NS
Intra pigs: cryopreserved (sample's number = 8)	0.22	2.45	NS
Intra fresh and cryopreserved (sample's number = 16)	2.34	2.14	DS

Looking at results for channel 1 (0.53 mm emission distance), we observe there is no significant difference between stretched fresh rings and between cryopreserved rings whereas there are significant differences between the two population fresh and cryopreserved rings. Similar results (not shown) are obtained for channel 2 (1.74 mm emission distance).

3.2 Simulation and optimization results

SIMULATION WITH PARAMETERS FOUND IN THE LITERATURE. Tables 1, 2: Comparing Fig. 2 and 3, we can notice that we obtain the same variations for the channel 2, i.e. the global intensity of spectra decreases as strains rise. But for the channel 1, the variations are opposite. Indeed, the propagation of light is influenced by fundamental or microscopic optical properties, in particular absorption μ_a and scattering μ_s coefficients, refractive index n and anisotropy factor g .

By looking more precisely at the optical parameters, especially μ_s and in particular the values at 1064 nm, we can observe that μ_s decreases between 400 nm and 633 nm before increasing

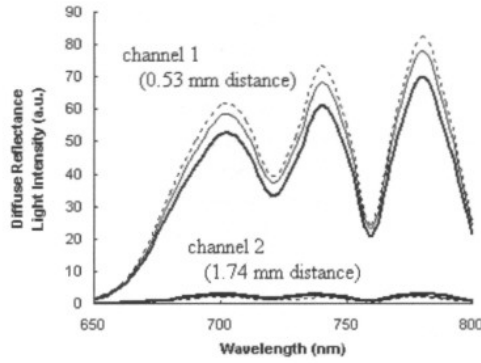


Fig. 3. Simulation results (mean of spectra of every artery ring) of diffuse reflectance spectra for strains of 0% (full line), 30% (fine line) and 60% (dotted line) at 0.53 mm (channel 1) and 1.74 mm (channel 2) excitation-reception distances.

considerably at 1024 nm. Our interpolation between 633 nm and 800 nm takes into account this last value at 1064 nm. It could affect our simulation results.

OPTIMIZATION OF OPTICAL PARAMETERS. Therefore, we decided to go through an identification process (experimental optimization of the optical parameters μ_a and μ_s for our experiments). We decided to keep the values of n (the influence of this parameter is small, but it can push the solution away from the optimum) and g as found in the literature. We searched for the values of each optical parameter for each wavelength, which minimize the error function (cf. equation 4).

$$Error(\lambda) = \sum_{\lambda} |S_m(\lambda) - S(\lambda)|^2 \quad (4)$$

with $S_m(\lambda)$ the measured diffuse reflectance spectra and $S(\lambda)$ the simulated diffuse reflectance spectra.

Exemples of values minimizing our error function are given in Tables 4 and 5 for two typical wavelength peaks of our excitation.

Table 4. Values of optical parameters for 0% strain.

Description	λ (nm)	μ_a (cm^{-1})	μ_s (cm^{-1})
Media	740	1.7	375
	780	1.7	375
Adventice	740	1.3	200
	780	1.5	207

Comparing Tables 1, 4 and 5, we can see that our optical parameters are roughly in the same order of magnitude than those found in the literature.

Table 5. Values of optical parameters for 0%, 30% and 60% strain at $\lambda = 780$ nm.

Description	Strain (%)	μ_a (cm^{-1})	μ_s (cm^{-1})
Media	0	1.7	375
	30	1.8	367
	60	1.5	393
Adventice	0	1.5	207
	30	2.5	193
	60	3.6	220

When strain rises, μ_a decreases and μ_s increases in the media, whereas in the adventice μ_a increases and μ_s seems more constant (about 5% variation max). Results seem to indicate that in average, the media, respectively the adventice, is less, respectively more, absorbed.

SIMULATION WITH OUR VALUES. We simulate the diffuse reflectance spectra for every artery ring (cf. Fig. 4). We can see that we obtain the same variations for the two channels.

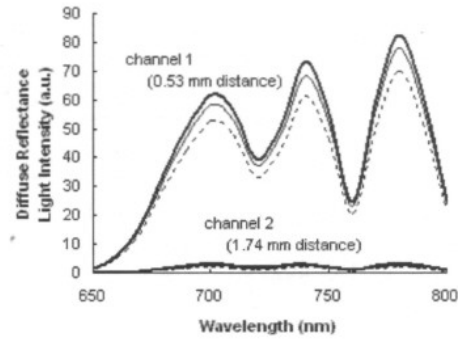


Fig. 4. Simulation results of diffuse reflectance spectra for strains of 0% (full line), 30% (fine line) and 60% (dotted line) at 0.53 mm (channel 1) and 1.74 mm (channel 2) excitation-reception distances.

In order to verify the difference between fresh and cryopreserved arteries, we use a statistical Student T-test over simulated spectra (Table 6).

Table 6. Simulation results (Student T-test) for the channel 1 (0.53 mm).

	T_{calc}	T	
Intra pigs: fresh (sample's number = 8)	1.45	2.45	NS
Intra pigs: cryopreserved (sample's number = 8)	0.97	2.45	NS
Intra fresh and cryopreserved (sample's number = 16)	2.29	2.14	DS

We can notice that for results of both experiments and simulations, the global intensity of spectra decreases as strains rise and these variations are less marked for channel 2 than for channel 1. However, a more important level of diffuse reflectance light

intensity can be observed in simulation in the red wavelength range.

4. CONCLUSION

This study highlights the existence of a correlation between rheological and optical properties of arteries before and after cryopreservation, through experimental measurements and simulation. Our simulation program takes into account absorption and diffusion of light over a broad band spectrum (600 nm - 800 nm). Few values of optical parameters are available in the literature for the artery ring and these values were deduced from different experimental conditions. That's why, the variations of spectra are opposite for the channel 1 with these parameters. So, the characterization of the optical parameters (μ_a , μ_s , and g) is very important to find the same simulated diffuse reflectance spectra than those found experimentally.

It will be of interest to continue this work with an optimization of the optical parameters including, this time, the anisotropy factor g as a function of wavelength, and with an implementation of the fluorescence in the simulation program. And finally, we think that this approach could be useful to other applications as tissue diagnosis *in vivo*, and specially, to the detection of cancerous lesions, where structural modifications of tissues are observed.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The Authors gratefully acknowledge the "Région Lorraine" and the "Ligue Contre Le Cancer (CD52, CD54)" for their financial support.

REFERENCES

Bigio, I.J. and J.R. Mourant (1997). Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy. *Phys. Med. Biol.* **42**, 803–814.

Cheong, W.F., S.A. Prahl and A.J. Welch (1990). A Review of the Optical Properties of Biological Tissues. *IEEE J. Quantum Electron.* **26**, 2166–2185.

Choserot, C., E. Péry, J.C. Goebel, D. Dumas, J. Didelon, J.F. Stoltz and W.C.P.M. Blondel (2005). Experimental Comparison between Autofluorescence Spectra of constrained Fresh and Cryopreserved Arteries. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **33**, 235–242.

Georgakoudi, I., B.C. Jacobson, J. Van Dam, V. Backman, M.B. Wallace, M.G. Muller, Q. Zhang, K. Badizadegan, D. Sun, G.A. Thomas and L.T. Perelman and M.S. Feld (2001). Fluorescence, reflectance, and light-scattering spectroscopy for evaluating dysplasia in patients with barrett's esophagus. *Gastroenterology* **120**, 1620–1629.

Hendricks, J.S. and T.E. Booth (1985). MCNP variance reduction overview. *Lect. Notes Phys.* **240**, 83–92.

Heney, L.G. and J.L. Greenstein (1941). Diffuse radiation in the galaxy. *Astrophys. J.* **93**, 70–83.

Liu, Q., C. Zhu and N. Ramanujam (2003). Experimental validation of Monte Carlo modeling of fluorescence in tissues in the UV-visible spectrum. *J. Biomed. Optics* **8**, 223–236.

Metropolis, N. and S. Ulam (1949). The Monte Carlo method. *J. Am. Statistical Association* **44**, 335–341.

Metropolis, N. and S. Ulam (1996). Effects of cryopreservation on the viscoelastic properties of human arteries. *Ann. Chir. Vasc.* **10**, 262–272.

Muller, G. and A. Roggan (1995). Laser-Induced Interstitial Thermotherapy. Vol. PM 25. Bellingham, WA.

Prahl, S.A., M. Keijzer, S.L. Jacques and A.J. Welch (1989). A Monte Carlo Model of Light Propagation in Tissue. Vol. IS 5. pp. 102–111.

Péry, E., W.C.P.M. Blondel, J.C. Goebel, J. Didelon and F. Guillemin (2005). Spectral (optical) and mechanical responses of fresh and cryopreserved issued arteries. Vol. 5695. Bellingham, WA.

Wang, L., S.L. Jacques and L. Zheng (1995). MCML - Monte Carlo modelling of light transport in multi-layered tissues'. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* **47**, 131–146.

Wilson, B.C. and G. Adam (1983). A Monte Carlo model for the absorption and flux distribution of light in tissue. *Med. Phys.* **10**, 824–830.

II.5 IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2008, 55 :541–553

Mosaicing of Bladder Endoscopic Image Sequences: Distortion Calibration and Registration Algorithm

Rosebet Miranda-Luna, Christian Daul*, *Member, IEEE*, Walter C. P. M. Blondel, Yahir Hernandez-Mier, Didier Wolf, and François Guillemin

Abstract—Cancers located on the internal wall of bladders can be detected in image sequences acquired with endoscopes. The clinical diagnosis and follow-up can be facilitated by building a unique panoramic image of the bladder with the images acquired from different viewpoints. This process, called image mosaicing, consists of two steps. In the first step, consecutive images are pairwise registered to find the local transformation matrices linking geometrically consecutive images. In the second step, all images are placed in a common and global coordinate system. In this contribution, a mutual information-based similarity measure and a stochastic gradient optimization method were implemented in the registration process. However, the images have to be preprocessed in order to register the data in a robust way. Thus, a simple correction method of the distortions affecting endoscopic images is presented. After the placement of all images in the global coordinate system, the parameters of the local transformation matrices are all adjusted to improve the visual aspect of the panoramic images. Phantoms are used to evaluate the global mosaicing accuracy and the limits of the registration algorithm. The mean distances between ground truth positions in the mosaiced image range typically in 1–3 pixels. Results given for *in vivo* patient data illustrate the ability of the algorithm to give coherent panoramic images in the case of bladders.

Index Terms—Bladder, cancer, distortion correction, fiber-scopes, image registration and mosaicing, mutual information, Parzen's window, shading correction.

I. INTRODUCTION

VIDEO endoscopic systems are classically used in clinics for the detection, surgical therapy, and follow-up of cancers or other visible tissular lesions located in hollow organs like the bladder, the oesophagus, the bronchus, the intestine, or the cervix. Fiberscopes are fibered endoscopes used in such examinations. Endoscopes generate image sequences, each image showing only a small limited part of the whole internal wall. Image mosaicing is a process by which it is possible to build a

Manuscript received July 19, 2006; revised May 29, 2007. This work was supported in part by the French association "Ligue Contre le Cancer (CD54)," the Université Henri Poincaré, and the region of Lorraine (BQR). The work of R. Miranda-Luna and Y. Hernandez-Mier was supported by the CONACYT. Asterisk indicates corresponding author.

R. Miranda-Luna was with the Nancy Université (UMR 7039 CRAN CNRS-UHP-INPL), 54516 Vandoeuvre-Les-Nancy, France. He is now with the Universidad Tecnológica de la Mixteca Carretera a Acatlima km. 2.5, Huajuapán de Leon, San Luis Potosí, Mexico (e-mail: rosemilu3@terra.es).

*C. Daul is with the Nancy Université, UMR 7039 CRAN CNRS-UHP-INPL, 2 avenue de la Forêt de Haye, 54516 Vandoeuvre-Les-Nancy, France (e-mail: christian.daul@ensem.inpl-nancy.fr).

W. C. P. M. Blondel, Y. Hernandez-Mier, and D. Wolf are all with the Nancy Université, UMR 7039 CRAN CNRS-UHP-INPL, 2, avenue de la Forêt de Haye, 54516 Vandoeuvre-Les-Nancy, France.

F. Guillemin is with the Centre Alexis Vautrin, 54511 Vandoeuvre-Les-Nancy, France (e-mail: f.guillemin@nancy.fnclcc.fr).

Digital Object Identifier 10.1109/TBME.2007.903520

unique panoramic image of an object or a scene from a number of piecewise (partial) overlapping views. We present the various motivations and conditions of our study to develop an image mosaicing approach to bladder endoscopy.

A. Clinical Motivations and Image Mosaicing

Bladder cancer is the second most common genitor urinary disease. Transitional cell carcinomas (TCC) constitute nearly 90% of all primary bladder tumors and about 30% of patients with superficial tumors develop invasive cancer. In the bladder, the follow-up of transurethral resection of urothelial carcinomas is a complex task because of their typical multifocality and recurrence characteristics. It is well known that, for bladder, the frequency of recurrence and tumor progression are influenced by grade and stage, primary or recurrent tumor, but also multifocal growth [1]. Recent works highlighted that carcinoma *in situ* (CIS) and multifocality were related to superficial recurrence [2] and that lifelong follow-up with cystoscopy is recommended after cystectomy [3]. Some other studies aim to find additional prognostic indicators to aid clinicians in adapting the therapy. For instance, microvessel density measurement (linked to tumor angiogenesis) can be used as an independent prognostic indicator for patients with invasive bladder cancer [4].

All these arguments are in favor of the development of a cystoscopy-based solution providing a unique wide area visualization of the bladder on which the observation, the clinical diagnosis, and the follow-up could be performed. Currently, the only data available to the physician performing a cystoscopy are a few photographs of particular views, his own paper sketch of the bladder (on which he locates these views), and the video-sequence of the examination. Therefore, the need of a more efficient type of support was expressed by the urologists to locate primary sites of lesions as well as neighbor sites where these or other lesions may progress, from an examination to another on the same patient.

Complementary to the anatomo-pathology analysis ("gold standard") of biopsy samples removed by the clinician, the evaluation of the evolution of a lesion is performed by comparing further cystoscopic examinations over time. In all cases, searching the few interesting images in the sequences is tedious for the clinician, especially if this task is often repeated. Moreover, from the diagnosis point of view, it is interesting for clinicians to see at once (without passing from one image to another) both the lesions and the surrounding tissue lying in a more or less wide lesion neighborhood.

One way to obtain such a hollow organ representation is to build a panoramic view (mosaiced image or map) of the internal wall. Such maps are without any redundant information, and the

data amount to be stored is also drastically reduced. In the literature, the term mosaicing refers to processes used to build unique panoramic images with several images acquired from different viewpoints. Data registration algorithms are the core of mosaicing methods. The goal of registration algorithms is to find the $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ local geometrical transformation superimposing the common parts of two images (i th and $(i+1)$ th images) obtained from two different viewpoints. $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ is the transformation matrix bringing the whole data of the source image $i+1$ in the coordinate system of the target image i . These local transformations can then be used to compute \tilde{T}_{i+1}^g global transformations placing each $i+1$ image in a global map coordinate system (e.g., coordinate system of the first image of a sequence).

B. Previous Work

An analysis of review papers dealing with medical image registration [5], [6] shows a few contributions devoted to the mosaicing of medical images. Mammography [7], ophthalmology [8], microscopy [9], and X-ray angiography [10] are among the few medical fields in which image mosaicing has been used. No contribution dealing with the mosaicing of endoscopic image sequences was found in the literature.

Endoscopes generate radially distorted images (barrel distortion). The instruments must be calibrated to obtain the optical parameters allowing for distortion correction and robust mosaicing. Unlike the mosaicing of endoscopic images, there are many contributions devoted to the calibration of endoscopes or other devices with strong distortions (e.g., fish-eye lens cameras).

In a first class of methods, several classical approaches use calibration grids or patterns with a well-known and precise geometry [11]–[14]. An image of the calibration pattern is acquired with the endoscope axis which must be, in some cases, in an exactly known position [11]. Then, different algorithms can be used to determine the geometrical link (related to the distortion parameters) between points in the nondistorted pattern image (e.g., computed images) and their homologous points in the acquired pattern image affected by barrel distortion. Even if these methods are accurate, they have a major drawback because a very precise calibration piece must be built and/or a positioning plate-form must be used to maintain the endoscope axis in a known position. In clinical situations, the endoscope must be calibrated regularly for control-quality matter. The calibration methods of the previous contributions are too constraining for practical use.

A second family of methods exploits the fact that, for perspective projections, 3-D straight line projections remain as straight lines in images without distortions [15]–[17]. The distortion parameters relate to the geometrical transformations correcting the images so that curves transform themselves in straight lines. The advantage of such approaches is that no precise endoscope positioning system is required for the calibration. Meanwhile, the methods are based on steps such as the segmentation of either some straight line points or the complete straight lines, the matching of homologous points between distorted and nondistorted images, and the fitting of curves with straight lines or curves. According to these various processing steps, the methods are more or less automated and

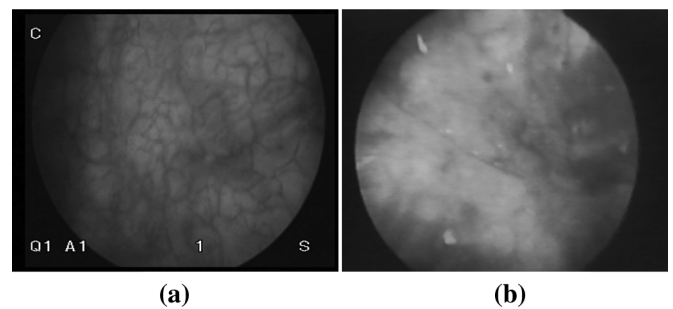


Fig. 1. Examples of typical images extracted from cystoscopic acquisitions. (a) Bladder image of a first patient. The blood vessel contours can be segmented. (b) Bladder image of a second patient. It is visible in the image that no significant contour can be extracted from the data.

precise. For interactive methods, the calibration needs operator interventions which should be avoided in clinical situations. The fully automated algorithms usually give parameters whose precision is affected by errors performed at one or several calibration steps.

At each image pair registration step, imprecision errors exist on the transformation parameter values. Although these errors are very small, they accumulate all along the image sequence when placing the images in the global mosaiced image coordinate system. This could generate, for example, significant superimposition errors between first and final images of loops. Several methods were proposed in the literature to compensate the accumulation errors during the mosaicing process. One solution to avoid such errors is to register simultaneously all spatial overlapped images (instead of a pairwise image registration). Such approaches [9], [18], [19], called global feature-based strategies, are prohibitive in terms of computation time. Davis [20] and Gonzalez [21] proposed another interesting accumulation error correction. They first register pairwise images. In a second step, they perform a global alignment of the mosaiced image by slightly changing the whole parameters of the transformations between the image pairs (the latter are supposed to be close to the ideal solution). By adjusting together all local transformation matrices, the global visual aspect of the mosaiced image can be improved while preserving the local registration quality.

C. Objectives and Application Requirements

The aim of this work lies in the development of an automated mosaicing method respecting standard acquisition protocols and the habits of the clinicians. Several conditions have to be fulfilled to reach this objective.

The endoscope has to be calibrated outside the clinical examinations. In order to minimize operator interventions and cost, the calibration must be performed without any positioning devices holding the endoscope in a precisely known position. Financial cost can also be minimized with calibration methods which do not require very accurate calibration pieces with any particular geometry, patterns, or grids.

Mosaiced images have to be built for bladders. Due to the nature and the variability of the scenes (see the examples in Fig. 1 and the explanations given in Section II-B), it is hardly difficult to use image primitives, as edges or contours, for robust image

pair registration. This is the reason why gray-level information only can be considered for the registration.

The mosaiced image must be as realistic as possible visually. Since errors accumulate during the image pair registration, the mosaiced image must be globally corrected without visually affecting the registration quality of consecutive images. A way to overcome that problem is to take advantage of the fact that 1) the clinician moves its instrument back-and-forth to the same anatomical locations (upper air bubble, orifice-like ureter, or urethra) in order to locate its position in the bladder at start of examination and 2) he usually executes closed-loop paths with the cystoscope to scan the bladder. This way of doing (which is not imposed by the mosaicing algorithm) can be exploited to improve the registration quality between first and last images (in the case they would overlap) by “back-correcting” each local transformation parameters of the full registered sequence. The $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ local transformation matrix parameters have to be adjusted all together in order to close the loops without losing a significant accuracy in terms of local registration quality. The algorithm has to take any first image automatically without any *a priori* knowledge or any manual specification or user intervention.

Because mosaiced images could be used by clinicians either for a second postoperative diagnosis or for comparing it to a second sequence (usually acquired some weeks or months after the first one), the proposed mosaicing process does not need to be performed in real time. In this work, the mosaiced image accuracy and the algorithm flexibility and robustness are privileged, the processing time being not crucial. The mosaicing has to work for both rigid (cystoscopes) and flexible (fiberscope) endoscopes.

II. MOSAICING ALGORITHM

This section starts with a brief presentation of the preprocessing step used both to compensate for the lighting gradient and to attenuate the fiber pattern seen in images acquired with fiberscopes. The registration algorithm is then detailed on the assumption that the distortions have been corrected already at this processing stage. The third part of this section presents the endoscope calibration algorithm. The latter is based on the registration algorithm. Finally, a method for compensating the error accumulation during the successive image registrations is proposed.

A. Image Preprocessing

The preprocessing step exploits the fact that the essential part of the spectral components relating to the optical fiber grid has typically higher frequencies than the spectral components of the interesting signals (internal wall texture). For this reason, filtering the original image with a low-pass Gaussian filter is sufficient to obtain an I_1 image in which the optical fiber grid was strongly attenuated. In I_1 , the essential part of the light gradient components have by far lower frequencies than the spectral components of the internal bladder wall signals. Again, filtering I_1 with a Gaussian low-pass filter leads to an I_2 image containing only the light gradient. The images without both optical fiber grid and light gradient are obtained by subtracting pixelwise I_2 from I_1 . The preprocessing algorithm and its results are detailed in [22].

B. Image Registration

The general registration process is mathematically formulated in

$$\tilde{T}_{i,i+1}^l = \arg \text{opt}_{T_{i,i+1}^l} S \left(\underbrace{f_{ta}(I_i^{ta,ov})}_{\Omega_{ta}}, T_{i,i+1}^l \left(\underbrace{f_{so}(I_{i+1}^{so,ov})}_{\Omega_{so}} \right) \right) \quad (1)$$

where $I_i^{ta,ov}$ and $I_{i+1}^{so,ov}$ are, respectively, the overlapping (*ov*) parts of the $I_i^{ta}(x, y)$ target (*ta*) image (*i*th image of the sequence) and of the $I_{i+1}^{so}(x, y)$ source (*so*) image [*(i + 1)*th image]. The registration consists in finding the parameters of the $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ local transformation which superimposes best the common regions of images *i* and *i + 1*. In many cases, Ω_{ta} and Ω_{so} homologous information (e.g., contours) can be extracted from the target and source images, respectively, with help of the segmentation algorithms f_{ta} and f_{so} . These data are properly registered when $\Omega_{ta} = \tilde{T}_{i,i+1}^l(\Omega_{so})$ is verified. The homologous structures are usually superimposed because of an optimization procedure $\arg \text{opt}_{T_{i,i+1}^l}$ which maximizes the resemblance (similarity, measure *S*) between the two homologous structures.

However, the type of the $T_{i,i+1}^l$ geometrical transformation, the Ω_{ta} and Ω_{so} homologous structures, the similarity measure *S*, and the optimization method have to be chosen according to the criteria such as the nature of the sensor, the image modalities, or the requested registration accuracy and robustness.

The transformation type of $T_{i,i+1}^l$ has to be chosen according to the two criteria: the correct projection type modeling the transfer function (TF) of the instrument (linear or non linear) and the rigidity of the acquired surface. If the surface shape changes between two consecutive acquisitions, the transformation type between two consecutive images is not linear, even if the TF of the sensor corresponds to a linear projection model.

The only “nonlinearities” of endoscopes are because of the radial distortions introduced by the optics. If these distortions can be corrected (it is effectively the case), then the TF projecting a 3-D point on a 2-D image plane is a perspective projection (linear transformation). Moreover, internal bladder walls are not rigid surfaces. However, due to the high image acquisition speed (an image acquisition takes 25 ms) the bladder surface deformation is very small and negligible between two consecutive images. Thus, between consecutive images the bladder surface can be considered as rigid. Consequently, a perspective form of transformations can be applied at a good price. The $T_{i,i+1}^l$ matrices correspond to 2-D/2-D perspective transformations and displace, in the I_{i+1}^{so} image, a pixel with coordinates (x, y) on the pixel located in (x', y') . In (2), a_{11} , a_{12} , a_{21} , and a_{22} parameters are without dimensions and they relate to the k_x and k_y scale factors, to the S_x and S_y shearing effect parameters, and to the φ 2-D angle (rotation in the I_{i+1}^{so} image plane). The x and y subscripts indicate components along the \vec{x} and \vec{y} image axes. a_{13} and a_{23} , given in pixels, are the components of translation $\vec{T} = (t_x, t_y)$. Finally, the perspective effect is due to the a_{31} , a_{32} , and a_{33} parameters which are also without dimensions.

More details concerning the effect of the 2-D/2-D perspective matrix parameters can be found in [5]

$$\begin{pmatrix} x' \\ y' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} u/w \\ v/w \end{pmatrix} \text{ with } \begin{pmatrix} u \\ v \\ w \end{pmatrix} = \underbrace{\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix}}_{T_{i,i+1}^l} \begin{pmatrix} x \\ y \\ 1 \end{pmatrix}$$

and

$$\begin{cases} a_{11} = k_x \cos(\varphi) & a_{12} = -S_x \sin(\varphi) & a_{13} = t_x \\ a_{21} = S_y \sin(\varphi) & a_{22} = k_y \cos(\varphi) & a_{23} = t_y \end{cases} \quad (2)$$

In the case of bladders, no common image primitives (e.g., edges) relating to particular anatomical characteristics are systematically visible between consecutive images of a sequence or from one sequence to another. Moreover, even if such image primitives would be available and could be extracted, their visual aspect varies too much from one patient to another for a given organ or from one organ type to another. The interpatient data variability and the fact that contours cannot be systematically extracted from the images is illustrated in Fig. 1. To be as general as possible and with concern of robustness, no segmentation algorithm [f_{ta} and f_{so} of (1)] is used. The similarity measure S is directly computed with the image gray-level values. According to the application (organ type, modality type(s), etc.), a correlation hypothesis statistically linking the gray-levels of the image pairs is usually searched. If such a link can be established, a particular statistical similarity measure can usually be easily chosen. Such a link between gray-levels is unknown in the frame of our application.

In such a situation, the mutual information is often chosen, this measure being robust and flexible [23]–[25]. As formulated in (3), the mutual information $MI(I_i^{ta,ov}, T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so,ov}))$ is computed with the gray-level entropies $H_{ta}(I_i^{ta,ov})$ and $H_{so}(T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so,ov}))$ of the overlapping parts of images $I_i^{ta}(x, y)$ and $T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so}(x, y))$ and with the joint entropy $H_{ta,so}(I_i^{ta,ov}, T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so,ov}))$. z_{ta} and z_{so} ranging in $[z_{\min}, z_{\max}]$ are the gray-levels of images $I_i^{ta}(x, y)$ and $T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so}(x, y))$, respectively. $p_{ta}(z_{ta})$ and $p_{so}(z_{so})$ are the gray-level probability density functions of the overlapping parts of images $I_i^{ta}(x, y)$ and $T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so}(x, y))$. $p_{ta,so}(z_{ta}, z_{so})$ is a joint probability density function

$$MI(I_i^{ta,ov}, T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so,ov})) = H_{ta}(I_i^{ta,ov}) + H_{so}(T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so,ov})) - H_{ta,so}(I_i^{ta,ov}, T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so,ov})) \quad (3)$$

with

$$\begin{cases} H_{ta}(I_i^{ta,ov}) = - \sum_{z_{ta}=z_{\min}}^{z_{ta}=z_{\max}} p_{ta}(z_{ta}) \ln(p_{ta}(z_{ta})) \\ H_{so}(T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so,ov})) = - \sum_{z_{so}=z_{\min}}^{z_{so}=z_{\max}} p_{so}(z_{so}) \ln(p_{so}(z_{so})) \\ H_{ta,so}(I_i^{ta,ov}, T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so,ov})) = - \sum_{z_{ta}=z_{\min}}^{z_{ta}=z_{\max}} \sum_{z_{so}=z_{\min}}^{z_{so}=z_{\max}} p_{ta,so}(z_{ta}, z_{so}) \ln(p_{ta,so}(z_{ta}, z_{so})) \end{cases}$$

The mutual information is maximal when the two images are registered, i.e., when $I_i^{ta}(x, y)$ statistically correlates with $T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so}(x, y))$ [23]. A stochastic steepest gradient

method is used to find the $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ transformation maximizing $MI(I_i^{ta,ov}, \tilde{T}_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so,ov}))$. As formulated in (4), the nine $a_{r,s}$ perspective transformation parameters of (2) are updated at each $k+1$ iteration in the optimization process. The $\partial T_{i,i+1}^{l,k}$ denominator means that the functions are successively derived with respect to each $a_{r,s}$ parameter of $T_{i,i+1}^{l,k}$

$$T_{i,i+1}^{l,k+1} = T_{i,i+1}^{l,k} + \lambda \frac{\partial MI(I_i^{ta,ov}, T_{i,i+1}^{l,k}(I_{i+1}^{so,ov}))}{\partial T_{i,i+1}^{l,k}} \quad (4)$$

with

$$\frac{\partial MI(I_i^{ta,ov}, T_{i,i+1}^{l,k}(I_{i+1}^{so,ov}))}{\partial T_{i,i+1}^{l,k}} = \frac{\partial H_{so}(T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so,ov}))}{\partial T_{i,i+1}^{l,k}} - \frac{\partial H_{ta,so}(I_i^{ta,ov}, T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so,ov}))}{\partial T_{i,i+1}^{l,k}}$$

The mutual information must be analytically expressed in order to ensure a robust and precise convergence towards the solution. Indeed, the optimization process is more accurate when using analytic partial derivatives of $MI(I_i^{ta,ov}, T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so,ov}))$ instead of purely numerical derivation methods. The fact that the gray-level histograms of bladders consist typically of several peaks [or modi, see Fig. 2(a)] is exploited here. The Parzen's window was used to model precisely such histogram shapes (nonunimodal exponential functions) with sums of Gaussian functions. In our adaptation of the Parzen's window, the same σ standard deviation (to be determined) is used for all Gaussian functions of each probability density function (σ_{ta} , σ_{so} , and $\sigma_{ta,so}$ for, respectively, $p_{ta}(z_{ta})$, $p_{so}(z_{so})$, and $p_{ta,so}(z_{ta}, z_{so})$). Two samples A and B , consisting, respectively, of N_A and N_B pixels, are randomly chosen in the overlapping parts of the images. The gray-levels of the a th pixel of A and of the b th pixel of B are, respectively, called z_A^a and z_B^b . The z_A^a values, acting as mean values of the Gaussian functions, and the z_B^b are used both to estimate the entropies and to optimize the σ_{ta} , σ_{so} , and $\sigma_{ta,so}$ values (see next paragraph). In practice, the empirical entropy $H^*(z)$, approximating $H(z)$, is computed as follows hereafter:

$$H^*(z) = -\frac{1}{N_B} \sum_{b=1}^{b=N_B} \ln \left(\frac{1}{N_A} \sum_{a=1}^{a=N_A} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(z_B^b - z_A^a)^2}{2\sigma^2}} \right). \quad (5)$$

Fig. 2(a) gives an example of an approximation of a real gray-level probability density function using 2000 Gaussian functions. It was experimentally verified that about 260 Gaussian functions (optimized at each iteration step) are systematically sufficient to converge in a robust way towards the solution.

In the proposed adaptation of the Parzen's window, the samples $A^{ta,ov}$ and $B^{ta,ov}$, consisting, respectively, of $N_A^{ta,ov}$ and $N_B^{ta,ov}$ pixels, were randomly chosen in the $I_i^{ta,ov}$ target image. Equation (5) was used to determine the empirical entropy of the target image. The $A^{so,ov}$ and $B^{so,ov}$ samples, consisting, respectively, of $N_A^{so,ov}$ and $N_B^{so,ov}$ pixels located in $T_{i,i+1}^l(I_{i+1}^{so,ov})$, comprise the homologous pixels of those included in $A^{ta,ov}$ and $B^{ta,ov}$ ($N_A^{ta,ov} = N_A^{so,ov}$ and $N_B^{ta,ov} = N_B^{so,ov}$). Equation (5) was also used to determine the empirical entropy of the source image. The gray levels of the

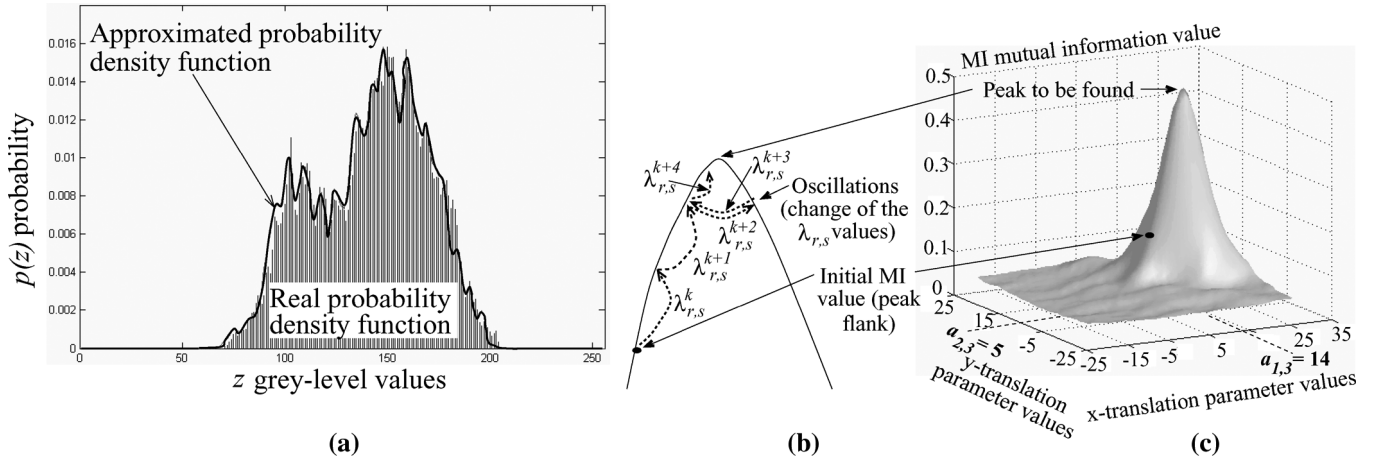


Fig. 2. Parzen's window and parameter space shape examples. (a) Real and approximated probability density functions of the gray-levels of a bladder image. (b) Convergence step evolution. $\lambda_{r,s}^k = \lambda_{r,s}^{k+1} = \lambda_{r,s}^{k+2} = \lambda_{r,s}^{k+3}$. After the oscillation detection, the $\lambda_{r,s}^{k+4}$ parameters equal 85% of the $\lambda_{r,s}^{k+3}$ parameters. (c) Mutual information space after filtering of both the fiber pattern and the light gradient and image distortion correction. In this parameter space, the two translation parameters of the perspective registration matrix are represented. The top of the peak is localized in $a_{1,3} = 14$ pixels and $a_{2,3} = 5$ pixels.

$A^{ta,ov}$, $B^{ta,ov}$, $A^{so,ov}$, and $B^{so,ov}$ samples are used to compute the joint empirical entropy using an equation which can be easily derived from (5), the 1-D Gaussian function, and the sums having simply to be replaced by a 2-D Gaussian function and double sums.

To maximize the similarity between the approximated and real probability density functions it is sufficient to minimize the entropies [24]. The principle of the implemented registration method is that, at each iteration step of the stochastic gradient, the algorithm first minimizes the gray-level entropies by adjusting the σ_{ta} , σ_{so} , and $\sigma_{ta,so}$ values using the analytic partial derivatives of $H_{ta}^*(z_{ta})$, $H_{so}^*(z_{so})$, and $H_{ta,so}^*(z_{ta}, z_{so})$ with respect to the standard deviations as given in (6). $p^*(z)$ is the empirical density probability function. The derivative of the $H_{ta,so}^*(z_{ta}, z_{so})$ joint empirical entropy can easily be obtained by replacing respectively the 1-D Gaussian function, the sum, and the $p^*(z)$ empirical probability density function of the $H^*(z)$ empirical entropy by a 2-D Gaussian function, a double sum, and the joint $p_{ta,so}^*(z_{ta}, z_{so})$ empirical probability density function

$$\begin{cases} \sigma_{ta}^{k+1} = \sigma_{ta}^k - \lambda_{ta}^k \frac{\partial H_{ta}^*(z_{ta})}{\partial \sigma_{ta}^k} \\ \sigma_{so}^{k+1} = \sigma_{so}^k - \lambda_{so}^k \frac{\partial H_{so}^*(z_{so})}{\partial \sigma_{so}^k} \\ \sigma_{ta,so}^{k+1} = \sigma_{ta,so}^k - \lambda_{ta,so}^k \frac{\partial H_{ta,so}^*(z_{ta}, z_{so})}{\partial \sigma_{ta,so}^k} \end{cases} \quad (6)$$

with

$$\begin{cases} \frac{\partial H^*(z)}{\partial \sigma} = -\frac{1}{N_B} \sum_{b=1}^{b=N_B} \left[\frac{1}{N_A \sqrt{2\pi} \sigma^2 p^*(z)} \sum_{a=1}^{a=N_A} e^{-\frac{(z_b^b - z_a^a)^2}{2\sigma^2}} \right. \\ \quad \left. \times \left(\frac{(z_b^b - z_a^a)^2}{\sigma^2} - 1 \right) \right] \\ p^*(z) = \frac{1}{N_A} \sum_{a=1}^{a=N_A} \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma} e^{-\frac{(z_b^b - z_a^a)^2}{2\sigma^2}} \right). \end{cases}$$

Then, the algorithm maximizes the *MI* mutual information by adjusting the $a_{r,s}$ transformation parameters in (4). An example of a typical mutual information surface shape is given in Fig. 2(c). The top of the unique high peak localizes the parameters $a_{r,s}$ of the transformation registering the image pair. Small local maxima affecting the mutual information surface are avoided by the stochastic steepest descent method. With the displacements between two consecutive images being small, the mutual information value of two completely overlapped images is always located on the flank of the peak. In this situation, the identity matrix can be taken as initial $T_{i,i+1}^l$ matrix. Meanwhile, to converge in a robust way towards the solution, the λ convergence step must not be the same for all $a_{r,s}$ parameters. For this reason, a different $\lambda_{r,s}$ is associated to each $a_{r,s}$. Thus, (4) can be reformulated as in (7). $p^*(z)$ is again the empirical probability of a gray level z . The $\partial z / \partial a_{r,s}$ derivatives represent gray-level variations according to $a_{r,s}$ parameter value changes. G_x , and G_y are the gray-level gradients of a (x, y) coordinate pixel in the x and y directions, respectively

$$\begin{aligned} a_{r,s}^{k+1} &= a_{r,s}^k + \lambda_{r,s}^k \frac{\partial MI \left(I_i^{ta,ov}, T_{i,i+1}^{l,k} \left(I_{i+1}^{so,ov} \right) \right)}{\partial a_{r,s}^k} \\ &= a_{r,s}^k + \lambda_{r,s}^k \frac{\partial H_{so}^* \left(T_{i,i+1}^{l,k} \left(I_{i+1}^{so,ov} \right) \right)}{\partial a_{r,s}^k} \\ &\quad - \lambda_{r,s}^k \frac{\partial H_{ta,so}^* \left(I_i^{ta,ov}, T_{i,i+1}^{l,k} \left(I_{i+1}^{so,ov} \right) \right)}{\partial a_{r,s}^k} \end{aligned} \quad (7)$$

with the equation shown at the bottom of the next page.

With the initial mutual information value being on the peak flank, the first $\lambda_{r,s}^1$ values have to be small enough so that the algorithm does not pass over the peak during the first iteration ($k = 1$). In order to control the initial displacement, the $\lambda_{r,s}^1$ values were chosen in such a way that each $a_{r,s}^1$ parameter taken individually leads to pixel displacements that does not exceed a given percentage of the diagonal of the source image. The percentage was experimentally fixed at 2% (maximal displacement due to each $a_{r,s}$ of about 10 pixels for an image side length of

341 pixels). As illustrated in Fig. 2(b), the $\lambda_{r,s}^k$ are kept constant while the algorithm is progressing towards the peak top. When the algorithm oscillates around the top, the values of the $\lambda_{r,s}^k$ are updated by diminishing their current value by 15%. The $\lambda_{r,s}^k$ are multiplied by the 0.85 coefficient each time an oscillation around the peak top is detected. The peak top is supposed to be reached when $a_{r,s}$ leads to the displacements smaller than 1 pixel.

C. Radial Distortion Correction

As formulated in (8), the barrel distortion can be modeled with the (C_x, C_y) coordinates of the projection of the optical center in the distorted image and with k_j distortion coefficients. The k_j polynomial coefficients relate to the lengthening of the radius r [distance, in an image without distortions, between (C_x, C_y) and the point with coordinates (x, y)]. r_{dist} is the lengthened radius corresponding to the distance between the coordinates (C_x, C_y) and the point displaced by the distortion from the (x, y) coordinates to the $(x_{\text{dist}}, y_{\text{dist}})$ ones

$$r_{\text{dist}} = \sum_{j=1}^n k_j r^j \text{ with } \begin{cases} k_1 = 1 \\ \text{and} \\ r = \sqrt{(x - c_x)^2 + (y - c_y)^2} \end{cases}. \quad (8)$$

A calibration image is generated with a program in order to determine the distortion parameters of (8). This image, called $I_{\text{nodist}}^{\text{ta,cal}}$, is without any distortions and is used as target in the registration scheme described in Section II-B. $I_{\text{nodist}}^{\text{ta,cal}}$ is printed on a paper sheet and acquired with the endoscope. This image ($I_{\text{dist}}^{\text{so,cal}}$), with barrel distortions, corresponds to the source data to be transformed by the registration method. During the registration, the C_x , C_y , and k_j parameters are optimized together with the $a_{r,s}$ perspective coefficients and with the σ standard deviations used for the estimation of the empirical entropies. When $I_{\text{dist}}^{\text{so,cal}}$ superimposes $I_{\text{nodist}}^{\text{ta,cal}}$, the distortion parameters are known.

It is noticeable that the optical distortion parameters are constant. Thus, an endoscope must ideally be calibrated once for all or periodically for quality reasons imposed by clinical applications. The calibration parameters do not have to be computed again during the hollow organ data registration.

Nondistorted black and white images ($I_{\text{nodist}}^{\text{ta,cal}}$) with different patterns (one with a chessboard, one with concentric circles, etc.) were generated with a computer and printed on paper sheets. $I_{\text{dist}}^{\text{so,cal}}$ distorted images were acquired with fiberscopes. Each pattern was acquired for several angles between the endoscope axis and the perpendicular on the paper sheet. These angles range in $[-20^\circ, 20^\circ]$. $(I_{\text{nodist}}^{\text{ta,cal}}, I_{\text{dist}}^{\text{so,cal}})$ gray-level image pairs were also generated for various angles. As for the black and white patterns, the $I_{\text{nodist}}^{\text{ta,cal}}$ gray-level images were not specially designed for the calibration (image of the laboratory logo, etc.). All $(I_{\text{nodist}}^{\text{ta,cal}}, I_{\text{dist},\theta}^{\text{so,cal}})$ image pairs (θ is the inclination angle) were registered. The calibration parameters obtained for each image pair were systematically used to correct the distortion of the chessboard image. The $\bar{\epsilon}$ mean distance between homologous black square centers of the chessboard in the nondistorted and the corrected distorted image pairs were computed. $\bar{\epsilon}$ is ideally null. These errors are also computed in terms of a percentage of the field of view (%FOV): $\bar{\epsilon}_{\% \text{FOV}} = 100 \times \bar{\epsilon} / N$, where N is the image diagonal length. Whatever the calibration images and acquisition angles, $\bar{\epsilon}$ and $\bar{\epsilon}_{\% \text{FOV}}$ never exceed 2 and 0.45 pixels, respectively. As experimentally verified (see Section III), such errors do not affect the visual quality of the registered image pairs and mosaics.

To sum up, the proposed method is easy to apply and flexible since radial distortion parameters can be determined using a simple good contrasted pattern acquired with an endoscope roughly perpendicular to it. Results were obtained with final errors comparable to those given by other reference methods [13], [14] requiring specific calibration grids and/or positioning devices. Details concerning the calibration algorithm and results are given in [26].

D. Image Mosaicing

Considering an orthonormal coordinate system in Euclidean plan with origin O_{map} and unitary vectors \vec{x}_{map} and \vec{y}_{map} , the \tilde{T}_i^g global transformation matrix places image i in the global map coordinate system $(O_{\text{map}}, \vec{x}_{\text{map}}, \vec{y}_{\text{map}})$ corresponding, for example, to the coordinate system of the first image of a video sequence. As formulated in (9), the $\tilde{T}_{i,i+1}^g$ matrices are used to place the whole $i^{\text{th}} + 1$ image of a sequence in

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial H^*(z)}{\partial a_{r,s}} = -\frac{1}{N_B} \sum_{b=1}^{b=N_B} \left[\frac{1}{N_A \sqrt{2\pi\sigma^3} p^*(z)} \sum_{a=1}^{a=N_A} \left(- (z_B^b - z_A^a) e^{-\frac{(z_B^b - z_A^a)^2}{2\sigma^2}} \left(\frac{\partial z_B^b}{\partial a_{r,s}} - \frac{\partial z_A^a}{\partial a_{r,s}} \right) \right) \right] \\ p^*(z) = \frac{1}{N_A} \sum_{a=1}^{a=N_A} \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} e^{-\frac{(z_B^b - z_A^a)^2}{2\sigma^2}} \right) \\ \frac{\partial z}{\partial a_{r,s}} = \begin{bmatrix} \frac{G_x x}{a_{31}x + a_{32}y + a_{33}} & \frac{G_x y}{a_{31}x + a_{32}y + a_{33}} & \frac{G_x}{a_{31}x + a_{32}y + a_{33}} \\ \frac{G_y x}{a_{31}x + a_{32}y + a_{33}} & \frac{G_y y}{a_{31}x + a_{32}y + a_{33}} & \frac{G_y}{a_{31}x + a_{32}y + a_{33}} \\ \frac{\beta x}{(a_{31}x + a_{32}y + a_{33})^2} & \frac{\beta y}{(a_{31}x + a_{32}y + a_{33})^2} & \frac{\beta}{(a_{31}x + a_{32}y + a_{33})^2} \end{bmatrix} \\ \beta = G_x(a_{11}x + a_{12}y + a_{13}) + G_y(a_{21}x + a_{22}y + a_{23}) \end{array} \right.$$

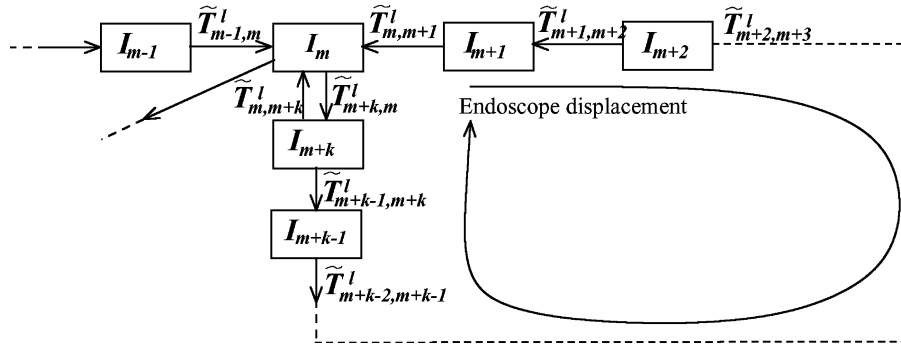


Fig. 3. Loop trajectory. I_m is the first image of the considered loop and it includes the landmark to which the clinician come back. The $\tilde{T}_{m-1,m}^l$ local transformation superimposes the last image I_{m-1} of another loop on I_m .

$(O_{\text{map}}, \vec{x}_{\text{map}}, \vec{y}_{\text{map}})$ by updating the \tilde{T}_{i+1}^g global transformation with the new local transformation given by the registration of images i and $i+1$

$$\begin{aligned} \tilde{T}_{i+1}^g &= \tilde{T}_{i,i+1}^l \times \tilde{T}_i^g = \prod_{n=0}^{n=i-1} \tilde{T}_{i-n,i-n+1}^l \\ &= \tilde{T}_{i,i+1}^l \times \dots \times \tilde{T}_{2,3}^l \times \tilde{T}_{1,2}^l. \end{aligned} \quad (9)$$

It is recalled that the endoscope trajectory consists of loops, with the clinician coming back regularly to landmarks. Even if the registration errors between two consecutive images are small, the positions of the first images of the loop with respect to the last images lead usually to mosaiced image regions in which the data are not perfectly registered from the visual point of view. In Fig. 3 and equation (10), I_m is the m th image of a sequence and a loop beginning. The I_{m+k} last image of the loop is placed in the coordinate system of I_m using the $\tilde{T}_{m,m+k}^g$ global transformation computed with the $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ local transformations. It is noticeable that (10) is the modified version of (9), with the global coordinate system being now that of the m th image instead of the first image

$$\begin{aligned} \tilde{T}_{m,m+k}^g &= \prod_{i=1}^{i=k} \tilde{T}_{m+k-i,m+k-i+1}^l \\ &= \tilde{T}_{m+k-1,m+k}^l \times \tilde{T}_{m+k-2,m+k-1}^l \times \dots \\ &\quad \times \tilde{T}_{m+1,m+2}^l \times \tilde{T}_{m,m+1}^l. \end{aligned} \quad (10)$$

$\tilde{T}_{m+k,m}^l$ is the local transformation superimposing I_m (source image) and I_{m+k} (target image). $\tilde{T}_{m,m+k}^l$ is the inverse matrix of $\tilde{T}_{m+k,m}^l$ and it transforms I_{m+k} to superimpose it on I_m . Ideally, if the $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ are all exactly determined, then

$$\tilde{T}_{m,m+k}^l = \tilde{T}_{m,m+k}^g \quad (11)$$

is verified.

The algorithm improving the registration quality of the images closing a loop is based on the fact that the $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ local transformations are all affected by only very small errors. Based on this observation, two rules can be defined for precisely superimposing I_m and I_{m+k} .

- The $\tilde{T}_{m,m+k}^l$ is a local transformation affected by only few errors. The parameter values of $\tilde{T}_{m,m+k}^g$ have to tend towards those of $\tilde{T}_{m,m+k}^l$. The parameters of the $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ local transformations ($i \in [m, m+1, \dots, m+k-1]$) have to be adjusted accordingly.
- The $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ matrices being precise, their parameters have to be only slightly modified.

These rules are mathematically formulated by the E_p cost function (12) which has to be minimized. The parameter values of the $T_{i,i+1}^{l,\text{adj}}$ matrices are initially those of the $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ local transformations and are adjusted so that $\tilde{T}_{m,m+k}^g$ converges towards $\tilde{T}_{m,m+k}^l$. The latter and the $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ transformations are all constant. In (13), the $\tilde{T}_{i,i+1}^{l,\text{adj}}$ local transformations are those given by the optimization process and minimizing E_p

$$E_p = \left[\tilde{T}_{m,m+k}^l - \tilde{T}_{m,m+k}^g \right]^2 + \sum_{i=m}^{m+k-1} \left[T_{i,i+1}^{l,\text{adj}} - \tilde{T}_{i,i+1}^l \right]^2 \quad (12)$$

$$\tilde{T}_{i,i+1}^{\text{adj}} = \operatorname{argmin}_{T_{i,i+1}^{\text{adj}}} (E_p). \quad (13)$$

A steepest gradient method is used to minimize E_p [see (14)]. All $a_{r,s,j}^{i,i+1}$ perspective parameters of the overall ($i, i+1$) image pairs (with $i \in [m, m+k-1]$, $r \in [1, 3]$, and $s \in [1, 3]$) of the loop are updated at each j iteration. The E_p cost function variations depend both on the $\delta_{r,s}^{i,i+1}$ variations of the $a_{r,s}^{i,i+1}$ parameters of $T_{i,i+1}^{\text{adj}}$ and on the variations of the parameters of the $\tilde{T}_{m,m+k}^g$ global transformation matrix. Equation (14) shows how the $\partial \tilde{T}_{m,m+k}^g / \partial a_{r,s,j}^{i,i+1}$ global transformation matrix variations can be updated using the $a_{r,s}^{i,i+1}$ parameter variations ($\delta_{rs}^{i,i+1}$) of the $\partial T_{i,i+1}^{l,\text{adj}} / \partial a_{r,s,j}^{i,i+1}$ local adjusted matrix. The link between the variations of the parameters of $\tilde{T}_{m,m+k}^g$ and $T_{i,i+1}^{l,\text{adj}}$ are obtained by deriving (10). Deriving $T_{i,i+1}^{l,\text{adj}}$ with respect to

the $a_{x,y}$ parameter means that $\delta_{rs}^{i,i+1} = 1$ when $r = x$ and $s = y$ and $\delta_{rs}^{i,i+1} = 0$ when $r \neq x$ or $s \neq y$

$$\begin{cases} a_{r,s,j+1}^{m,m+1} &= a_{r,s,j}^{m,m+1} + \lambda_{r,s,j} \frac{\partial E_p}{\partial a_{r,s,j}^{m,m+1}} \\ a_{r,s,j+1}^{m+1,m+2} &= a_{r,s,j}^{m+1,m+2} + \lambda_{r,s,j} \frac{\partial E_p}{\partial a_{r,s,j}^{m+1,m+2}} \\ \vdots & \vdots \\ a_{r,s,j+1}^{m+k-1,m+k} &= a_{r,s,j}^{m+k-1,m+k} + \lambda_{r,s,j} \frac{\partial E_p}{\partial a_{r,s,j}^{m+k-1,m+k}} \end{cases} \quad (14)$$

with

$$\begin{cases} \frac{\partial E_p}{\partial a_{r,s,j}^{i,i+1}} = 2 \left[\tilde{T}_{m,m+k}^l - \tilde{T}_{m,m+k}^g \right] \frac{\partial \tilde{T}_{m,m+k}^g}{\partial a_{r,s,j}^{i,i+1}} \\ \quad + 2 \sum_{i=m}^{m+k-1} \left[T_{i,i+1}^{l,adj} - \tilde{T}_{i,i+1}^l \right] \frac{\partial T_{i,i+1}^{l,adj}}{\partial a_{r,s,j}^{i,i+1}} \\ \frac{\partial \tilde{T}_{m,m+k}^g}{\partial a_{r,s,j}^{i,i+1}} = \left[T_{m+k-1,m+k}^{l,adj} \right] \times \dots \\ \quad \times \underbrace{\begin{bmatrix} \delta_{11}^{i,i+1} & \delta_{12}^{i,i+1} & \delta_{13}^{i,i+1} \\ \delta_{21}^{i,i+1} & \delta_{22}^{i,i+1} & \delta_{23}^{i,i+1} \\ \delta_{31}^{i,i+1} & \delta_{32}^{i,i+1} & \delta_{33}^{i,i+1} \end{bmatrix}}_{\frac{\partial T_{i,i+1}^{l,adj}}{\partial a_{r,s,j}^{i,i+1}}} \times \dots \\ \quad \times \left[T_{m+1,m+2}^{l,adj} \right] \times \left[T_{m,m+1}^{l,adj} \right]. \end{cases}$$

As for the image registration (see Section II-B), the $\lambda_{r,s,1}$ initial values are fixed so that each $a_{r,s,j}^{i,i+1}$ leads to a very small and controlled displacement. The $\lambda_{r,s,j}$ decrease when j increases.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Material: Positioning Device and Fiberscope

The fiberscope used in this contribution is a FUJINON FG-100FP (Medical Division, FUJINON, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) having a 105-mm field of view and a 5–100-mm focusing interval. The image channel of the fiberscope consists of 15 000 optical fibers and is connected to a black and white charge-coupled devices (CCD) camera (LHERITIER 760 ULL). The images are digitized with a standard MATROX meteor II acquisition board.

Micrometric stages (NEWPORT model MUMR8.51) were used to displace the fiberscope along three orthogonal axes \vec{x} , \vec{y} , and \vec{z} . Displacements can be realized with a minimal incremental motion of 10 μm and an actuator sensitivity of 1 μm . The fiberscope axis is initially parallel to the \vec{z} axis. Rotations in the (\vec{x}, \vec{y}) plane and fiberscope axis inclinations with respect to the \vec{z} axis can also be controlled.

B. Quantifying Mosaicing Accuracy Using a Phantom

No reference data are available for patients since neither the correspondence between homologous pixels of two consecutive images nor the $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ local and the \tilde{T}_i^g global matrices are

known for examinations. For this reason, the only way to quantify the mosaicing accuracy is to use a realistic phantom and micrometric devices allowing precisely controlled displacements of the fiberscope.

The phantom is a pig bladder picture which simulates in a quite realistic way human bladders. The bladder was incised, opened up, and photographed with a camera without distortions. The pig bladder texture [see Fig. 4(a)] is similar to the texture of a human bladder. The area covered by the picture is a square with 16-cm sides. The micrometric devices described in Section III-A were used to displace the fiberscope over the picture along a well-controlled trajectory. The fiberscope was first placed over the left upper corner of the pig bladder picture and image I1 was acquired. The endoscope was then translated along \vec{x} and the I2–I15 images were acquired with 0.5-cm x -translation steps. Images I16–I29 were acquired at each 0.5-cm y -translation and with scale factor changes. Images I29–I34 were acquired with 0.5-cm x -translations and perspective changes. The loop was closed (images I35–I48) using 0.5-cm y -translations. The FOV of the fiberscope was large enough to cover the whole area of the pig bladder picture.

A second picture [see Fig. 4(b)] was used for the mosaicing accuracy assessment. This picture contains a grid formed by black squares. The distances between the centers of neighboring squares equal 1 cm along \vec{x} and \vec{y} . Using the micrometric device, the image I1 of the grid was acquired with the fiberscope placed in exactly the same position as for the image I1 of Fig. 4(a). The pig bladder trajectory was exactly reproduced to acquire grid images, all of the images shown at the exactly same picture region as their corresponding images in Fig. 4(a).

The fiberscope was calibrated and the distortions of the images of the two sequences were corrected. The images were also filtered to attenuate the light gradients and the optical fiber patterns. The images of the pig bladder sequence were registered to find the local $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ transformations. The resulting \tilde{T}_i^g global transformations were used to build the mosaiced image of both the bladder and the grid with squares. The square centers, with coordinates $(x_{\text{comp}}, y_{\text{comp}})$ in $(O_{\text{map}}, \vec{x}_{\text{map}}, \vec{y}_{\text{map}})$, were extracted from the grid map. For the j th square, $(x_{\text{comp}}^j, y_{\text{comp}}^j)$ should ideally be equal to the real $(x_{\text{ref}}^j, y_{\text{ref}}^j)$ coordinates known by construction in $(O_{\text{map}}, \vec{x}_{\text{map}}, \vec{y}_{\text{map}})$ and acting as reference. Based on this observation, the mosaicing error is quantified in (15) by the e_m mean distance, N being the number of black squares. This measure can be used for the accuracy assessment of both registration of the consecutive images and mosaicing after the placement of the i th image in the global mosaiced image coordinate system

$$e_m = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \sqrt{\left(x_{\text{comp}}^j - x_{\text{ref}}^j\right)^2 + \left(y_{\text{comp}}^j - y_{\text{ref}}^j\right)^2}. \quad (15)$$

Fig. 5(a) shows the reconstructed map (mosaiced image) obtained with the images of Fig. 4(a). For two consecutive images, the e_m mean distance between the ideal square center positions and the corresponding positions in the map given in Fig. 5(b) (bladder mosaiced image superimposed by the grid of squares) is 1.047 pixels. Even if this distance is small, it is noticeable in Fig. 5(a) that the first image I1 and the last image I48 are

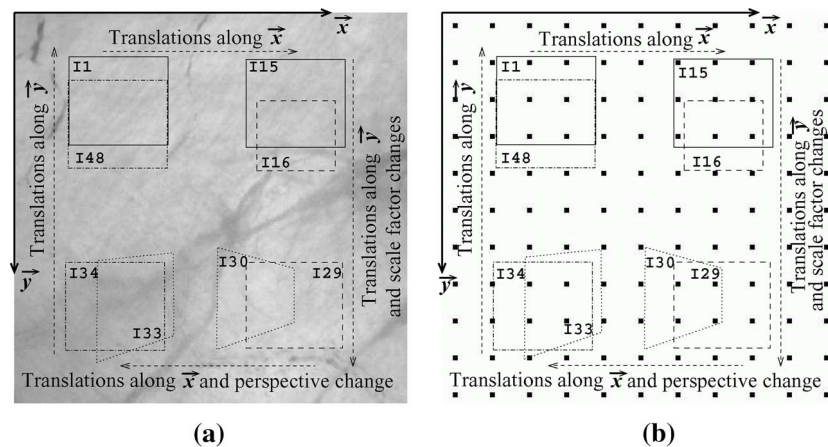


Fig. 4. Phantom acquisition protocol. (a) Pig bladder picture. (b) Grid of squares. The translation steps along \vec{x} and \vec{y} equal 0.5 cm (28 pixels).

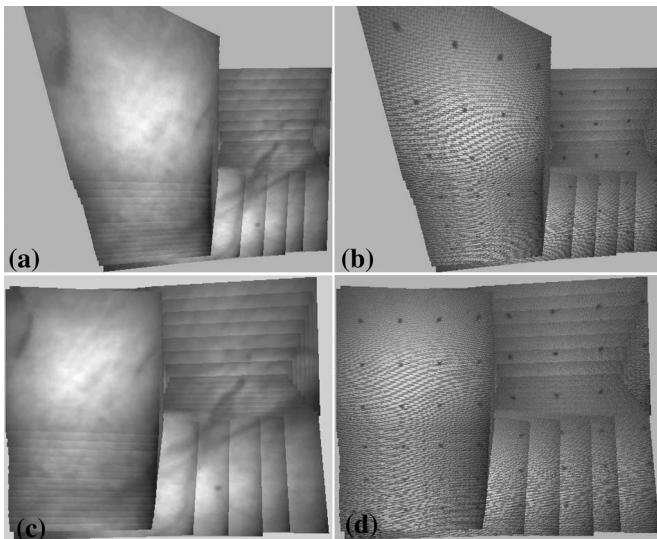


Fig. 5. Pig bladder mosaicing. (a) Pig bladder mosaiced image without loop correction. (b) Dark square superimposition on (a). The grid of square images were registered with the $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ obtained with the pig bladder images. (c) Pig bladder mosaiced image after loop correction. (d) Grid of squares superimposed on (c). The squares are now located on perpendicular lines. The image borders were intentionally not corrected so that the image superimposition and limits in the mosaiced image remained visible.

badly superimposed. The consequence of the error accumulation during the global matrix updating is that the perspective given by \tilde{T}_i^g becomes more and more wrong. This fact can be observed in Fig. 5(b) in which all black squares should ideally be located on perpendicular lines. The e_m error between I1 and I48 equals 43.14 pixels.

Fig. 5(c) shows the mosaiced image after the loop correction. It is noticeable that the perspective of images I1 and I48 is now visually the same. The e_m mean distance between images I1 and I48 decreased strongly because it passed from 43.14 pixels (without loop correction) to 3.35 pixels (with loop correction). This result is illustrated in Fig. 6 which shows that the loop correction effectively diminishes the e_m mean alignment errors between the first and last images of the loop. For images I5–I25, the e_m mean errors increase a bit without affecting the local visual registration quality (the $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ matrices remain accurate). For images I25–I36 (with perspective changes), the pixel po-

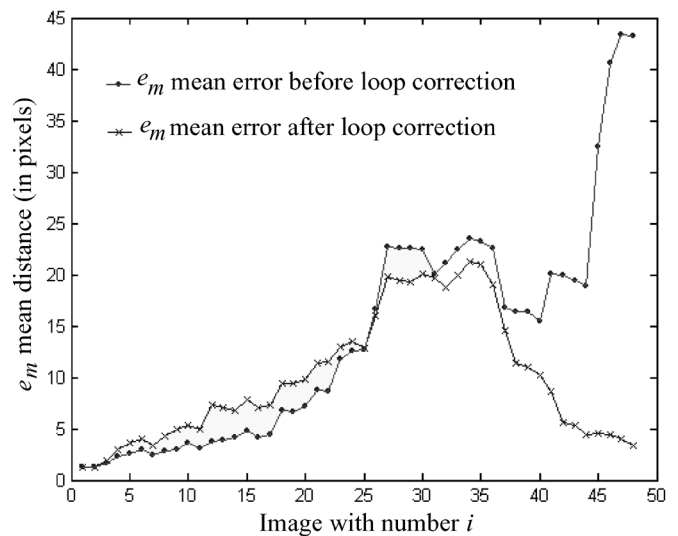


Fig. 6. Influence of the loop correction on the e_m mean distances quantifying the error accumulation. For the i th image I_i , the \tilde{T}_i^g global transformation was used to place the pixels in the $(O_{\text{map}}, \vec{x}_{\text{map}}, \vec{y}_{\text{map}})$ coordinate system. This figure provides, in the global mosaiced image coordinate system, the distances between the ideal black square center positions and the corresponding computed ones [given by \tilde{T}_i^g and visualized in Fig. 5(d)].

sitioning in $(O_{\text{map}}, \vec{x}_{\text{map}}, \vec{y}_{\text{map}})$ is improved because the e_m mean errors decrease after the loop correction. For the I37–I48 images (images closing the loop) the pixel positioning errors have considerably decreased. It is also noticeable in Fig. 5(d) that the black squares are visually located on perpendicular lines.

We verified also that the correction of the global transformation matrices has only a very small influence on the registration quality of consecutive images. On average, the e_m distances between consecutive images remain almost unchanged before and after the loop correction. It was also the case for the mosaiced image of Fig. 5(c) for which the mean e_m passed from 1.047 to 1.05 pixels.

The tests performed with the pig bladder picture proved that the registration algorithm, together with the loop correction method, leads to mosaiced images in which images are placed with a few pixel error. However, even if the tested phantom is realistic enough, the real fiberoscopic images are better contrasted. This is mainly because in examinations the organs are

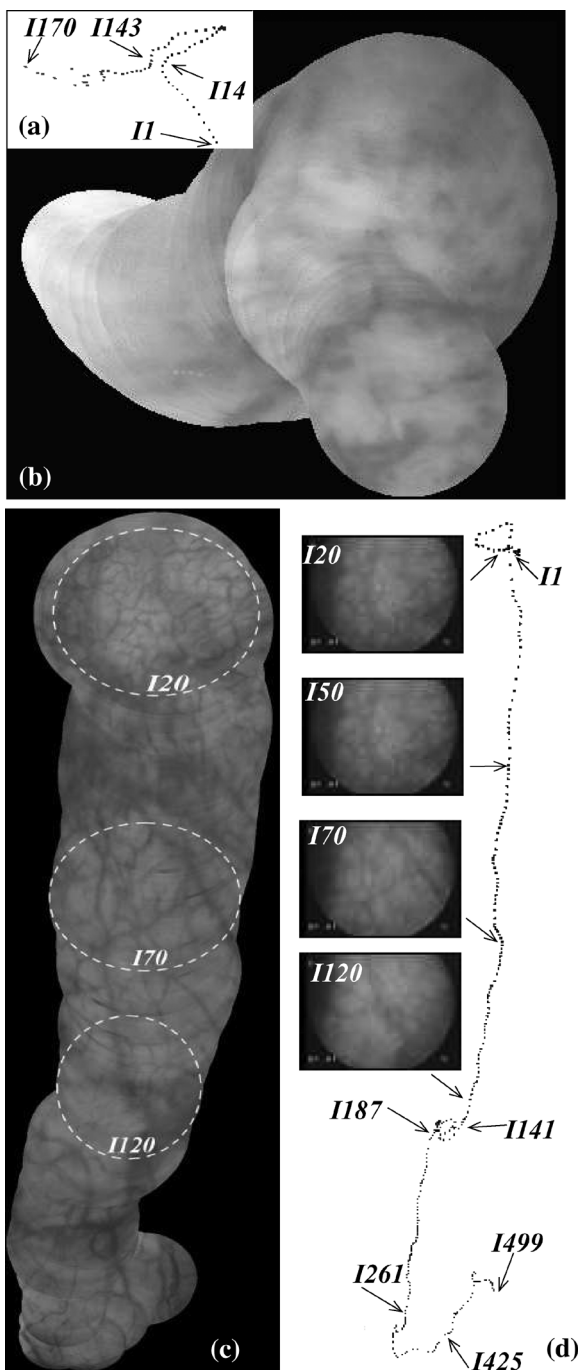


Fig. 7. Human data results. (a) Mosaiced image of a first bladder. (b) Trajectory of the image centres of the fiberscope in the bladder. (c) Mosaiced image of a second bladder. (d) Trajectory of the image centers of the fiberscope for the second bladder and some images used to build the map.

directly acquired without passing through a picture which is less contrasted and illuminated than the real scenes. The tests performed with the phantom placed the algorithm neither in an ideal situation nor in a more favorable situation than in the case of real examinations.

C. Patient Data Results

Fig. 7 shows results for two different patients. These examples are representative for all of the results obtained for other

patients and they highlight the robustness of the proposed algorithm. The two sequences were acquired with two different endoscopes (cystoscope and fiberscope). Both “bladder textures” and illuminations were very different from one sequence to another. In spite of these differences, the clinicians who visually analyzed the results found that the mosaicing algorithm led to coherent mosaiced images.

For these sequences, the mosaic correction algorithm was not applied to all images. Loops were detected [images I14–I143 in Fig. 7(a) and (b) and images I1–I20, I141–I187, and I261–I425 in Fig. 7(c) and (d)] and only the $\hat{T}_{i,i+1}^l$ local transformations between the corresponding images were adjusted to correct the global registration quality. Proceeding in this way is justified as follows. In loops, there are rather large perspective changes between consecutive images, while for linear endoscope displacements [e.g., images I20–I141 in Fig. 7(c) and (d)] the geometrical links between consecutive images are very close to rigid transformations. We observed that the registration errors are greater for perspective transformations than for rigid transformations. As a consequence, the accumulated errors remain small for the latter transformations. The visual aspect of the mosaiced images remains coherent by only correcting the $\hat{T}_{i,i+1}^l$ transformations related to images belonging to loops.

The mosaicing algorithm was written in C language and tested on a 3.2-GHz Pentium IV processor with 2 GB of RAM. The proposed optimization method requires, on average, 250 iterations to register two consecutive images. Each image pair registration takes 80 s. There are 3.78 and 11.3 h needed to build the mosaiced images of Fig. 7(a) (170 images) and Fig. 7(d) (499 images), respectively. Even if the computation times are high, such processing times are not a crucial problem since the aim of the mosaicing was either to facilitate a second diagnosis performed usually one or several days after the online diagnosis or to compare an initial mosaiced image to a second one built with the data acquired several weeks or a month after the first one (lesion evolution assessment).

The loop correction algorithm takes usually several minutes [typically up to 3 min as for the sequence of Fig. 7(d)]. The calibration (registration of a distorted and the corresponding nondistorted image) requires 1 min. The computation time of these two algorithm parts are negligible with respect to the processing time of the whole method.

IV. DISCUSSION: APPLICABILITY AND LIMITS OF THE METHOD

The mosaicing algorithm was initially developed for bladder endoscopy application. With the internal wall of such organs being concave, the surfaces seen by the instrument are smooth (without discontinuities). This means, in particular, that no strong illumination changes occur in the images. As for many registration methods, the limitations of our algorithm for mosaicing bladder images are related to two main factors, namely, image quality (image contrast, cystoscope axis orientation with respect to the internal wall surface, etc.) and data variability from one patient to another. As explained in Section III-B, a pig bladder picture was used to simulate in a quite realistic way images of human bladders (i.e., visible texture/structures). This phantom was not only used to quantify the mosaicing accuracy

but it permitted also to assess the limitations of the proposed algorithm according to various acquisition conditions.

First, tests were performed with the phantom to quantify the limits of the authorized deviations (angles) of the endoscope tip viewpoint axis to the perpendicular of the internal wall surface. For deviation angles ranging in $[-45^\circ, 45^\circ]$, the algorithm was systematically able to register all consecutive images. To the associated physicians, this angle interval is by far the most sufficient because they are able to precisely control the cystoscope tip axis orientation (cystoscopes have different angle of tip optics and fiberscopes are flexible).

Second, we quantified the maximal values of the a_{rs} parameters of the local transformation matrices which permit a robust registration of two consecutive images. Using the pig bladder phantom, we determined that the maximum values authorized for the x -translations [t_x in (2)], y -translations [t_y in (2)], φ -angles [rotations in the image plane, see (2)], and scale factor changes [changes of k_x and k_y , see (2)] are ± 30 pixels, ± 30 pixels, 15° , and $\pm 20\%$, respectively. Considering the acquisition speed (25 images/s) and the weak cystoscope displacement speed (few millimeters per second), t_x , t_y , φ , k_x , and k_y values are in practice by far smaller than the limits determined for these parameters.

The contrast and the texture (or structures due to details such as spots, blurs, or blood vessels) are changing according to the patient and the cystoscope type (endoscopes or fiberscopes). The variability of the bladder images is illustrated in Fig. 1. Tests with different patient video sequences proved that the registration algorithm can handle the variabilities inherent to interpatient data and cystoscope type.

Even if the pig bladder picture simulates quite well human bladder images, there are differences in terms of contrast and structures seen in the two data types. It is recalled that the pig bladder was incised, opened up, and photographed with a camera. In our experiment, the contrast difference between human and pig data is mainly because of the physical acquisition conditions which are not the same for pig and human data. In particular, the pig bladder pictures are less contrasted (due to different illumination conditions) than the *in vivo* human bladder images. Our registration algorithm was successfully applied to both pig and patient data. The variability between the pig and human data being larger than the interpatient data variability is another indication that the mosaicing algorithm should handle robustly the variability of human bladder data.

Moreover, from the application point of view, the “visual coherence” of the results is a criterion which is at least as important as the mosaicing error quantification. On one hand, “visual coherence” means that the clinician must see a “continuity” from one image to another placed in the stitched image and, on the other hand, that the clinician is able to quickly find interesting organ details in the mosaiced image. For this reason, once we built a panoramic image of an image sequence, we ask the clinician to look at both the video sequence and the panoramic view in order to compare them visually. The clinician appreciated the continuity of marks, spots, blurs, or blood vessels. For all mosaiced images, the clinician found that the results were coherent and that the stitched image was useful to quickly find interesting regions (e.g., lesions).

It is worth noticing that, even if the mosaicing algorithm works well for bladders, the proposed approach will be more difficult to implement robustly in the case of hollow organs showing tubular geometry or nonsmooth surfaces (colon, oesophagus). On one hand, in tubular organs, the endoscope tip is often not perpendicular enough to the surface. On the other hand, nonsmooth surfaces (or surfaces with discontinuities) can lead to big surface orientation differences or illumination differences between two consecutive images so that the registration fails. The proposed algorithm has to be tested with video sequences of colon or oesophagus in order to determine the mosaicing limits and to check if the method can be adapted to such organs.

V. CONCLUSION AND FUTURE WORK

Globally, in medical applications, the automatic construction of mosaiced images is a little addressed problem. Up to now, no mosaicing method of endoscopic images was described in the literature. This contribution is the first one leading to a robust method for bladder endoscopic image mosaicing.

Even if the computation time was not our primary criterion here (robustness and mosaiced image correctness were privileged), it could be reduced in several ways. For example, replacing the $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ unitary initial matrices by more optimal initial matrices (e.g., by using the $\tilde{T}_{i-1,i}^l$ previously computed matrix or by predicting trajectories) can diminish strongly the computation time. The dynamic selection of each n th image (instead of using all images) can also increase the mosaicing speed. Works are currently in progress to reduce the computation time of the mosaicing algorithm.

The registration accuracy can also be improved by not only detecting loops but by also testing other endoscope displacements like zigzags. For such endoscope trajectories, the image superimposition is not limited to the registration of only two consecutive images of a sequence.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank physician Prof. F. Guillemain and urologist M.-A. D’Hallewin from Cancer Institute CAV, Nancy, France, for their clinical experience and for providing video sequences of various cystoscopic examinations. They would also like to thank the surgeons from the Experimental Surgery Laboratory, Faculty of Medicine, Nancy, France, for providing fresh pig bladders.

REFERENCES

- [1] W. Lutzeyer, H. Rubben, and H. Dahm, “Prognostic parameters in superficial bladder cancer: An analysis of 315 cases,” *J. Urology*, vol. 127, no. 2, pp. 250–252, 1982.
- [2] W. Kassouf, D. Swanson, A. M. Kamat, D. Leibovici, A. Siefker-Radtke, M. F. Munsell, H. B. Grossman, and C. P. N. Diney, “Partial cystectomy for muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder: A contemporary review of the M. D. Anderson Cancer Center experience,” *J. Urology*, vol. 175, no. 6, pp. 2058–2062, 2006.
- [3] J. M. Holzbeierlein, E. Lopez-Corona, B. H. Bochner, H. W. Herr, S. M. Donat, P. Russo, G. Dalbagni, and P. C. Sogani, “Partial cystectomy: A contemporary review of the memorial Sloan-kettering cancer center experience and recommendations for patient selection,” *J. Urology*, vol. 172, no. 3, pp. 878–881, 2004.

- [4] B. H. Bochner, R. J. Cote, N. Weidner, S. Groshen, S. Chen, D. G. Skinner, and P. W. Nichols, "Angiogenesis in bladder cancer: Relationship between microvessel density and tumor prognosis," *J. Nat. Cancer Inst.*, vol. 87, no. 21, pp. 1603–1612, 1995.
- [5] J. B. A. Maintz and M. A. Viergever, "A survey of medical image registration," *Med. Image Anal.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–36, 1998.
- [6] T. Mäkelä, P. Clarysse, O. Sipilä, N. Pauna, Q. C. Pham, T. Katila, and I. E. Magnin, "A review of cardiac image registration methods," *IEEE Trans. Med. Imag.*, vol. 21, no. 9, pp. 1011–1021, Sep. 2002.
- [7] A. Jalink, J. McAdoo, G. Halama, and H. Liu, "CCD mosaic techniques for large-field digital mammography," *IEEE Trans. Med. Imag.*, vol. 15, no. 3, pp. 260–267, Jun. 1996.
- [8] G. Yang and C. Stewart, "Covariance-driven mosaic formation from sparsely-overlapping image sets with application to retinal image mosaicing," in *Proc. IEEE Comput. Soc. Conf. Comput. Vis. Pattern Recognit.*, Jun. 2004, vol. 1, pp. 804–810.
- [9] T. Vercauteren, A. Perchant, X. Pennec, and N. Ayache, "Mosaicing of confocal microscopic in vivo soft tissue video sequences," in *Lecture Notes in Computer Science*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2005, pp. 804–810.
- [10] J. S. Chou, J. Qian, Z. Wu, and H. F. Schramm, "Automatic mosaic and display from a sequence of peripheral angiographic images," in *Proc. SPIE Med. Imag.: Image Process.*, K. M. Hanson, Ed., Apr. 1997, vol. 3034, pp. 1077–1087.
- [11] J. D. Stefansic, A. J. Herline, W. C. Chapman, and R. L. Galloway, "Endoscopic tracking for use in interactive, image-guided surgery," in *Proc. SPIE Conf. Image Display*, San Diego, CA, Feb. 1998, vol. 3335, pp. 208–218.
- [12] K. V. Asari, S. Kumar, and D. Radhakrishnan, "A new approach for non-linear distortion correction in endoscopic images based on least squares method," *IEEE Trans. Med. Imag.*, vol. 18, no. 4, pp. 345–355, Apr. 1999.
- [13] J. P. Helferty, C. Zhang, G. McLennan, and W. E. Higgins, "Videoscopic distortion correction and its application to virtual guidance of endoscopy," *IEEE Trans. Med. Imag.*, vol. 20, no. 7, pp. 605–617, Jul. 2001.
- [14] R. Shahidi, M. R. Bax, C. R. Maurer, J. A. Jhonson, E. P. Wilkinson, B. Wang, J. B. West, M. J. Citardi, K. H. Manwaring, and R. Khadem, "Implementation, calibration and accuracy testing of image-enhanced endoscopy system," *IEEE Trans. Med. Imag.*, vol. 21, no. 12, pp. 1524–1535, Dec. 2002.
- [15] J. Torres and J. M. Menendez, "A practical algorithm to correct geometrical distortion of image acquisition cameras," in *Proc. IEEE Int. Conf. Image Process.*, Singapore, Oct. 24–27, 2004, vol. 4, pp. 2451–2454.
- [16] T. Thorsten and B. Hellward, "Automatic line-based estimation of radial lens distortion," *Integr. Comput.-Aided Eng.*, vol. 12, no. 2, pp. 177–190, 2005.
- [17] M. Ahmed and A. Farag, "Nonmetric calibration of camera lens distortion: Differential methods and robust estimation," *IEEE Trans. Med. Imag.*, vol. 14, no. 8, pp. 1215–1230, Aug. 2005.
- [18] D. Capel and A. Zisserman, "Automated mosaicing with super-resolution zoom," in *Proc. Comput. Vis. Pattern Recognit.*, Santa Barbara, CA, Jun. 1998, pp. 885–891.
- [19] H. Y. Shum and R. Szeliski, "Systems and experiment paper: Construction of panoramic image mosaics with global and local alignment," *Int. J. Comput. Vis.*, vol. 36, pp. 101–130, 2000.
- [20] J. Davis, "Mosaics of scenes with moving objects," in *Proc. IEEE Conf. Comput. Vis. Pattern Recognit.*, Santa Barbara, CA, Jun. 1998, pp. 354–360.
- [21] M. G. Gonzalez, P. Holifield, and M. Varley, "Improved video mosaic construction by accumulated alignment error distribution," in *Proc. British Mach. Vis. Conf.*, Southampton, U.K., 1998, pp. 377–387.
- [22] R. Miranda, Y. Hernandez-Mier, C. Daul, W. Blondel, and D. Wolf, "Mosaicing of medical video-endoscopic images: Data quality improvement and algorithm testing," in *Proc. IEEE Int. Conf. Electr. Electron. Eng.*, Acapulco Guerrero, Mexico, Sep. 2004, pp. 530–535.
- [23] X. Huang, N. Paragios, and D. N. Metaxas, "Shape registration in implicit spaces using information theory and free form deformations," *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. 28, no. 8, pp. 1303–1318, Aug. 2006.
- [24] P. Viola and W. M. Well, "Alignment by maximization of mutual information," *Int. J. Comput. Vis.*, vol. 24, no. 2, pp. 137–154, 1997.
- [25] J. P. W. Pluim, J. B. A. Maintz, and M. A. Viergever, "Mutual-information-based registration of medical images: A survey," *IEEE Trans. Med. Imag.*, vol. 22, no. 8, pp. 986–1004, Aug. 2003.
- [26] R. Miranda, W. Blondel, C. Daul, Y. Hernandez-Mier, and D. Wolf, "A simplified method of video-endoscopic image barrel distortion correction based on grey level registration," in *Proc. Int. Conf. Image Process.*, Singapore, Oct. 2004, vol. 5, pp. 3383–3386.



Rosebet Miranda-Luna was born in Mexico in 1973. He received the electronics engineer degree from the Instituto Tecnológico de San Luis Potosí, the M.S. degree from the Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Mexico City, Mexico, in 2000, and the Ph.D. degree in automatic control and signal processing from the Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, in 2005.

His research interests are in instrumentation and signal and image processing applied to biomedical.



Christian Daul (M'01) received the Ph.D. degree in computer vision from the Université Louis Pasteur (ULP), Strasbourg, France, in 1994.

From 1990 to 1995, he was with the Laboratoire des Sciences de l'Image, de l'Informatique et de la Télédetection (LSIIT, ULP) before joining the Institut of Industrial Mathematics (ITWM, Fraunhofer Institut), Kaiserslautern, Germany, where he was a member of the Image Processing Group. Since October 1999, he has been with the Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN UMR

CNRS 7039), Nancy, France, where he is currently working in the area of medical imaging (mammography, endoscopy, radiotherapy, and cardiology). He is also an Assistant Professor at the Institut National Polytechnique de Lorraine (EEIGM/INPL), Vandœuvre-Les-Nancy, France, where he is teaching in the signal processing field. His main research interests include image segmentation, data registration, and 3-D data reconstruction.



Walter C. P. M. Blondel was born in Nancy, France, in 1968. He received the electrical engineering degree from ESIGELEC, Rouen, France, in 1991, the M.Sc. degree in optoelectronics from Hertsfordshire University, Hertsfordshire, U.K., in 1992, and the Ph.D. degree in biological and medical engineering from the University Henri Poincaré, France, in 2000.

Currently, he is an Assistant Professor at the UHP, teaching instrumentation, signal and image processing in biomedical engineering at the Faculty of Medicine, Nancy Université, and doing his research

work at the Automatic Control Laboratory CRAN, UMR 7039, CNRS–Nancy Université, Vandœuvre-Les-Nancy, France. He is in charge of the scientific project "Spectro-Imaging for Diagnosis." His research interests are in instrumentation and signal processing (1-D and 2-D) applied to health engineering and more specifically to the field of light–biological tissue interactions (UV-Vis-NIR, spectroscopy, endoscopy) for *in vivo* tissue characterization and cancer photodiagnosis.



Yahir Hernandez-Mier received the degree in electronic engineering from the Technological Institute of Cd. Victoria (ITCV), Tamaulipas, Mexico, in 1999 and the M.Sc. degree in bioelectronics from the Research Center, IPN (CINVESTAV), Mexico, D.F., in 2003. Currently, he is working towards the Ph.D. degree at the Automatic Control Laboratory CRAN (UMR 7039 CNRS–Nancy Université, Vandœuvre-Les-Nancy, France).

His research interest include image mosaicing, structure from motion and, more generally, medical and industrial applications of computer vision.



Didier Wolf received the Ph.D. degree in electrical engineering from the Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, in 1986.

Currently, he is the Professor at the Institut National Polytechnique de Lorraine, where he is teaching in the signal processing field. Since 2005, he has been the Deputy Director of the Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN-CNRS-UMR 7039), where he is the head of the biomedical engineering team. His main research interests include image processing, signal

processing, and medical imaging techniques applied in the fields of cancerology and cardiology.



François Guillemin received the Medical Doctor (MD) degree from the Faculty of Medicine of Nancy, Université Henri Poincaré, France, in 1978 and the Ph.D. degree in electrical engineering, metrology, and biomedical electronics from the Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, in 1986. He received the qualification in oncology and surgery in 1987 and 1988, respectively.

Since 1988, he has been a Full Professor in Clinical Oncology at the Centre Alexis Vautrin (CAV) of Nancy (Comprehensive Cancer Center),

Vandoeuvre-Les-Nancy, France. Currently, he is the Director of the CAV. He is also a member of the Centre de Recherche en Automatique de Nancy (UMR 7039 CRAN Nancy Université). His main research interests are photodynamic therapy (PDT) and instrumentation.

Chapitre III

Sélection d'articles les plus récents

CETTE partie rassemble 5 articles de revues internationales, acceptés à l'heure actuelle en révisions majeures et mineures. J'ai choisi de les faire figurer dans ce manuscrit car ils constituent, à mon sens, des éléments d'évaluation indispensables pour le projet de recherche présenté.

III.1 Computerized Medical Imaging and Graphics, 2008, en révision

Fast construction of panoramic images for cystoscopic exploration

Y. Hernández-Mier^{a,b} W. C. P. M. Blondel^a C. Daul^a D. Wolf^a François Guillemin^{a,c}

^aNancy University, Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), UMR 7039 Nancy University - CNRS
2 avenue de la Forêt de Haye, F-54516 Vandœuvre-Lès-Nancy, France

^bPolytechnical University of Victoria

Calzada Gral. Luis Caballero 1200, 87070. Cd. Victoria, Tamaulipas, Mexico

^cAnticancer centre "Centre Alexis Vautrin" (CAV), Avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-Lès-Nancy, France

Abstract

Cystoscopy is used as a reference clinical examination in the detection and visualization of pathological bladder lesions. Evolution observation and analysis of these lesions is easier when panoramic images from internal bladder walls are used instead of video sequences. This work describes a fast and automatic mosaicing algorithm applied to cystoscopic video sequences, where perspective geometric transformations link successive image pairs. This mosaicing algorithm begins with a fast initialization of translation parameters computed by a cross-correlation of images, followed by an iterative optimization of transformation parameters. Finally, registered images are projected into a global common coordinate system. A quantifying test protocol applied over a phantom yielded a mosaicing mean error lower than 4 pixels for a 1947×1187 pixels panoramic image. Qualitative evaluation of 10 panoramic images resulting from videos of clinical cystoscopies was performed. An analysis realized over translation values from these clinical sequences (*in vivo*) is used to modify the mosaicing algorithm to be able to do a dynamic selection of image pairs. Construction time of panoramic images takes some minutes. At last, algorithm limits are discussed.

Key words: Image registration, mosaicing, endoscopy, bladder, cancer diagnosis.

1. Introduction

1.1. Clinical context

Among hollow organs cancer, bladder cancer is the 7th most extended cancer in the world [1]. 95% of bladder tumors originate in the epithelium or urothelium (surface tumors) [2]. One of the main problems concerning bladder tumors is their dangerous recurrence potential, especially in case of progression. Recurrence, with an important progression risk is often associated to Carcinoma *In Situ* (CIS). CIS in the bladder is a cancerous lesion that can be multifocal and diffuse. Due to its nature (flat, non-papillary tumor, located at the mucous membrane), CIS may not be detected by conventional cystoscopy

and recurrence risk is therefore increased. Some recent research results led to the recommendation of lifetime monitoring of patients after partial bladder surgical removal (cystectomy) to avoid recurrence [3]. Cystoscopy is the reference examination allowing the physician to visually detect and locate pathological lesions, specifically cancer, in the bladder. A cystoscope is a narrow instrument (soft or rigid) that is inserted through the urethra down inside the bladder for visualizing the internal bladder wall. Consequently, the observation of every region of interest is made through a narrow visualization window. The physician displaces this reduced field of view (maximal area of about 1cm^2) over nearly all the tissue surface and the corresponding images are then recorded on a video system. To follow the evolution of diseases and simplify organ observa-

tions, it is proposed to develop a solution for observing extended tissue regions by using information delivered by cystoscopes. Currently, the only physical media used by clinicians are photographs of a few particular sites, a bladder sketch with annotations and a video of the examination. Over a photograph, only a limited part of a region of interest may be visible with enough details and resolution. Over a video sequence, extended tissue areas can be analyzed along the cystoscope displacements, but the obtained image sequence consists of a large amount of redundant data. In addition, as a complementary step to the anatomo-histopathological examination of tissue samples, the physician must compare *in vivo* the same bladder regions from one examination to another. In this case, finding a particular region of interest at a particular moment in the video sequence could be long and annoying for the physician. Urologists expressed the need for a fast-access visual medium to effectively locate potential bladder lesions, to easily observe neighboring regions (around suspicious lesions or zones) and to make efficient comparison between zones of interest along their evolution. Finally, this kind of complementary visual media could be also usefully applied to fluorescence endoscopic imaging systems recently developed, giving a spatial correspondance between fluorescence and white light images i.e. higher diagnostic efficiency [4].

1.2. Aim and applications of image mosaicing

Image mosaicing is a process by which a panoramic image is built by superimposing partial views (images) of a scene or object. This panoramic image is a concise representation of data leading to a considerably reduced data storage space. Mosaicing is mainly based on an image registration process for determining geometric transformations $T_{i,i+1}$ between image pairs I_i et I_{i+1} , successively taken from different points of view. These local transformations are then used to compute a global transformation T_{i+1} , that is used to place the last transformed image I_{i+1} (as the precedent images) in a global common coordinate system (for instance, the coordinate system of the first image).

Image mosaicing is used today in many different areas as: consumer photography [5–7], stabilization of hand-held recorded video (movement compensation of operators) [8,9], construction of virtual environments [10–12], submarine exploration [13,14]

or construction of images with super-resolution [15–17].

In the medical field, some works have been conducted for improving the field of view in ultrasound imaging by registration of images acquired from manual displacements [18]. The authors performed image registration using Mutual Information (MI) as similarity measure and an 8 degrees of freedom perspective transformation. Even if images used in that work were very noisy, no image pre-processing was used. In conventional X-ray radiology, Yaniv and Joskowicz [19] have constructed panoramic images for observing long bones that are not visible on a single radiograph. To register two or more radiographic images, they considered that no rotation exists between images and that transformations between images can be represented by displacements that are parallel to the projection axis. A ruler was placed next to each image and alignment manually performed using ruler marks. But, the main applications of image mosaicing in the medical field concern ophthalmology, where constructed panoramic images allow for an easier and more efficient diagnosis. The approaches developed for that, generally use similarity measures based on the comparison of pixel gray-levels in similar image regions and transformation models up to 6 degrees (affine model) for image registration. For example, Zhou *et al.* [20,21] registered successive angiogram images of the back of the eye using an inverse compositional-based registration algorithm [22–24] and modified by introducing a tunable increasing parameter. Some other approaches, like that from Can *et al.* [25], rather use segmentation of visible blood vessels of the retina to extract intersection points that can be used to register images. Results of this method are highly dependant on the segmentation algorithm ability to find blood vessel intersections with enough robustness. This approach uses a 12 degrees of freedom transformation model (non linear) to represent the deformation between images and the retinal curvature. Up to now, the only referenced application of image mosaicing to hollow organs, and specifically to bladder, is the work of Miranda *et al.* [26,27,4]. Extended views of internal bladder walls can be constructed by mosaicing images extracted from a video sequence, corresponding to successive views taken by a cystoscope. This approach uses Mutual Information (MI) as similarity measure to register images through an iterative optimization algorithm (stochastic steepest descent). Although the panoramic images so constructed are

visually coherent and this approach is robust, the computation time of a panoramic image is very long (several hours). This is due to the analytical modeling of histograms or probability density functions (Parzen’s window) to compute MI and to the number of iterations needed in the optimization.

1.3. Objectives and application constraints

The objective of this work was to develop a fast and automatic mosaicing algorithm to construct panoramic images of the internal wall of bladders, useful for the physician *in situ*. This algorithm must be able to provide panoramic images without affecting the application protocol of the cystoscopic examination. After the results obtained from our precedent study [26], urologists asked for having these panoramic images rapidly so that they can evaluate and verify their coherence, their precision and their exploitability before the end of a clinical examination. Finally, the proposed mosaicing algorithm must be robust enough to deal with image variability found in cystoscopic video sequences (blood vessels visible or not, lighting conditions, blur, texture...). Images in figure 1 show these variable acquisition conditions.

2. Mosaicing algorithm

The mosaicing algorithm presented here is composed of three main parts : image pre-processing (section 2.1), registration algorithm and image stitching (sections 2.2 and 2.3), and dynamic selection of images to be registered (section 2.4). This prior selection stage is based on an analysis of translation information delivered by an initial image correlation step. This avoids entering into the iterative part of the registration algorithm for image series where small displacements or “static” sequences exist.

2.1. Image pre-processing

In the case of endoscopic images, several geometric and photometric aberrations must be corrected or compensated to achieve an efficient registration. These main effects are: a vignetting effect, due to the wide field of view (FOV) of the endoscope (wide angle lens), a fiber optics pattern appearing over images (when a fiberscope is used) and a radial distortion caused by the cystoscope optics (wide FOV).

The following subsections explain the strategies implemented to solve these problems. Correction of these effects is essential for a good performance of the subsequent registration stage. The analysis of the effects of these perturbations and their correction are developed in section 3.

2.1.1. Vignetting and fiber pattern

The vignetting effect corresponds to a lighting inhomogeneity in the image resulting in intensity variations of very low spatial frequency. They can be simply modeled as the application to an image without lighting artifacts I_o of a multiplicative term I_m and an additive term I_a , such that:

$$I_v = I_o \times I_m + I_a \quad (1)$$

where I_v is the image affected by vignetting.

In practice, it is difficult to determine the contribution of each term and in general, approximations of the lighting gradient are built for correction. Considering, for example, that the image background is essentially composed of the illumination terms, it can be modeled by quadratic or polynomial functions [28]. This approach is suited when the lighting conditions between images of a sequence do not change, which is not the case of cystoscopic sequences. Another approach implemented in [29–32] is to apply a high-pass filter to eliminate the corresponding very low frequencies. The characteristics of the filter are determined with help of the analysis of Fourier spectra of typical images. This approach has been implemented in our application because it offers a good compromise between efficacy and computation time (using adapted implementation techniques). A gaussian mask $G_\sigma(x, y)$ was used:

$$G_\sigma(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}} \quad (2)$$

with σ being the standard deviation of the mask and (x, y) the pixels coordinates.

From the Fourier spectrum of cystoscopic images (figures 2(a) and 2(b)), we experimentally determined a standard deviation value for the gaussian mask in the frequency domain $\sigma_{ill} = 0.012N$, with $N = 256$ the width of the square region of interest (ROI) of the image. This value corresponds to the interval of spatial frequencies $[0, 0.012N]$ where the very low frequency components related to lighting inhomogeneities are found. Useful information (bladder texture) is found in higher frequency components of the Fourier spectrum. After image background is obtained (figure 2(c)), it is subtracted from

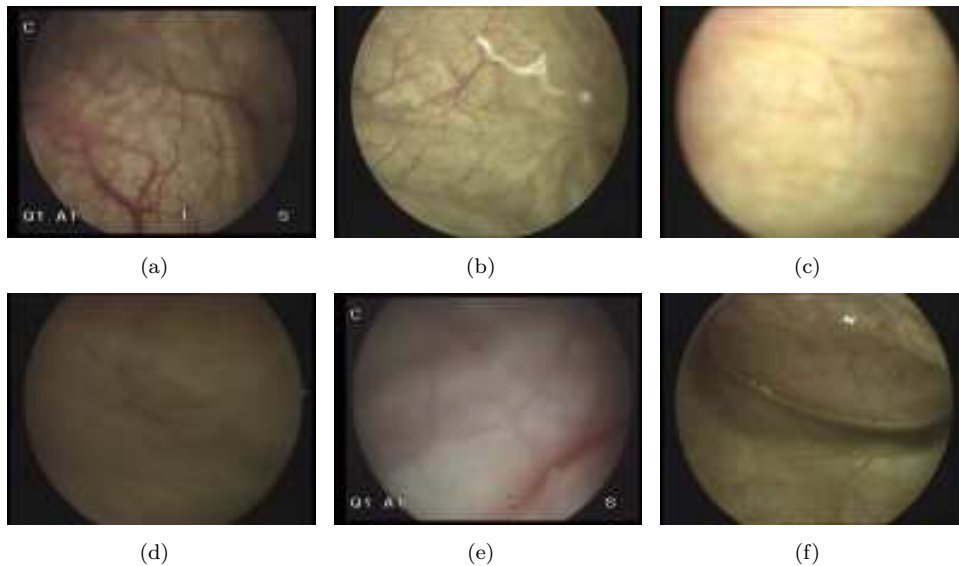


Fig. 1. Some examples of images that can be found in a conventional cystoscopic video sequence. (a) Image with many visible blood vessels. (b) Elements in suspension (clearer) crossing the field of view of the cystoscope. (c) Blurred image due to defocusing of the cystoscope. (d) Blurred image due to rapid movements of the cystoscope. Very few structures are visible due to poor lighting conditions. (e) Image taken at a short distance. (f) Image presenting light reflections at the air bubble.

the initial image, leading to a vignetting-corrected image is corrected (figure 2(d)).

When a flexible cystoscope (fiberscope) is used, a spatially periodical pattern due to fiber optics bundle is visible on the images (see figure 2(a)) and can affect the registration robustness. As indicated by arrows in figure 2(e), the presence of this pattern produces high frequency peaks in the Fourier spectrum of the image. In the literature, there are few works addressing this problem. The method presented in [27] localizes these high-frequency peaks in the Fourier spectrum to define the cut-off frequency of a gaussian filter that is next applied to every image of the sequence acquired with the same fibroscope. Recently, *Winter et al.* [33] proposed an automatic method for the detection of the position of these peaks in the image Fourier spectrum followed by the computation of the cut-off frequency of the low-pass filters to eliminate the fiber pattern. The main advantage of this method is its capacity to automatically build adaptive masks. In our application, for the same endoscope, the characteristics of the filter can be computed once for all images.

For the fibroscope used in our tests, spatial frequencies of the fiber pattern are located in the frequency bandwidth $[0.156N, 0.312N]$ (see figure 2(e)). The result of the filtering application, using a gaussian filter with standard deviation in the Fourier domain $\sigma_{patt} = \frac{0.156}{3} = 0.052N$, is shown in

figure 2(f).

Two low-pass filterings of very-low frequencies to eliminate vignetting and of high frequencies to eliminate the fiber pattern are combined, resulting in a band-pass filtering that preserves useful information in the frequency bandwidth $[0.036N, 0.156N]$. In spatial domain, the sizes of the first and second gaussian masks are respectively 83×83 pixels and 19×19 pixels. This filtering operation can be efficiently implemented in the frequency domain by masking unwanted frequency regions in the Fourier spectra of images.

2.1.2. Radial distortion

In [30] and [31], we proposed an algorithm for the correction of the radial distortion produced by cystoscope optics. However, firstly, access to a cystoscope for calibration is not always simple in day-to-day practice and secondly, the correction operation on every image implies a computation time that can not be neglected. For the overall cystoscopic images analyzed, we observed that radial distortion values at the central part of the images are small enough in a reduced Region Of Interest or ROI ($N^2 = 400 \times 400$ pixels typically). Consequently, radial distortion correction may be avoided on this reduced-size image which then, can be directly used in our mosaicing algorithm.

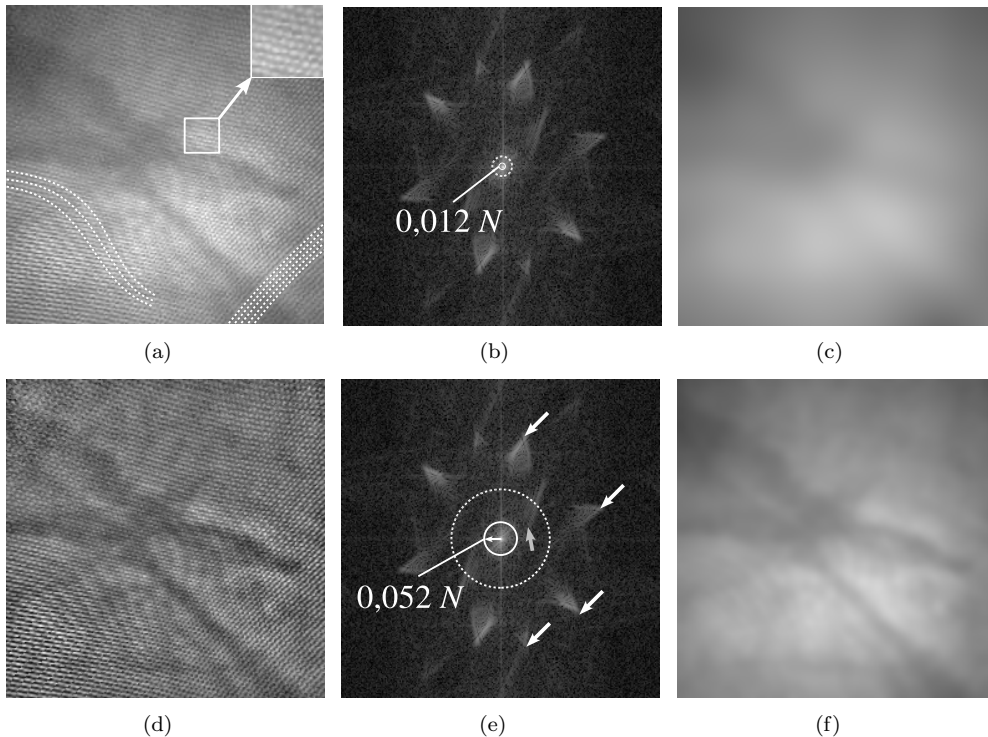


Fig. 2. (a) Original fibroscopic image with enlarged fiber pattern and line shapes patterns. (b) Fourier spectrum of image (a). The continuous line circle at the center part of the image indicates the place of spatial frequencies values of $0,012N$ and the dashed line circle shows the extension of the gaussian mask ($3\sigma_{ill}$). (c) Image resulting from low-pass filtering with $\sigma_{ill} = 0.012N$. (d) Normalized image after pixel-wise subtraction of image (c) to image (a). (e) Fourier spectrum of image (a). The white arrows show the frequency components corresponding to the fiber pattern and the gray arrow shows the region of the spectrum corresponding to line patterns. The continuous line circle corresponds to the value of $\sigma_{patt} = 0.052N$ and the dashed line shows the extension of the gaussian mask. (f) Final image resulting from both filterings.

2.2. Image registration

2.2.1. Geometric transformation

The generic process of image registration of successive images I_i and I_{i+1} from a cystoscopic video sequence aims to better superpose common parts of these images. Mathematically described by equation 3, it maximizes a similarity measure between extracted characteristics from target image $I^t = I_i$ and homologue characteristics from source image $I^s = I_{i+1}$ to which geometric transformation $T_{i,i+1}$ is applied (\circ). f^t et f^s are specific features extraction algorithms (corners, lines, curves...) eventually applied to these images. Parameter values of transformation $T_{i,i+1}$ are selected in a search space \mathbf{T} by means of an optimization algorithm opt to finally obtain transformation $\tilde{T}_{i,i+1}$ when $f^t(I_i) \approx f^s(I_{i+1} \circ T_{i,i+1})$ (registered images).

$$\tilde{T}_{i,i+1} = \arg \underset{T_{i,i+1} \in \mathbf{T}}{opt} S\{f^t(I_i), f^s(I_{i+1} \circ T_{i,i+1})\} \quad (3)$$

Transformation type T , similarity measure S , feature extraction algorithms f_t and f_s and optimization method opt must be chosen by taking into account some constraints. These constraints include sensor type, image acquisition modality, available computation time and registration precision required by the application. The type of transformation type T is chosen considering on the one hand, the projection model of the cystoscopic acquisition system and on the other hand, the deformable nature of the bladder wall. Considering that radial distortion influence is small if we select a reduced-size window at the central part of acquired images (as mentioned in previous subsection), the 3D/2D projection model of the cystoscope is linear. Concerning non-linearities induced by the bladder wall deformation due to movements or surrounding organs, a non-linear transformation model could be

considered for describing the geometrical relationship between adjacent pairs of images. However, image acquisition rate in videos (25 images/second) limits the influence of these deformations and it is therefore possible to implement a linear transformation model. The most complete 2D/2D linear transformation model we can use is a perspective model with a 3×3 matrix M defined in homogeneous coordinates as:

$$\begin{bmatrix} x' \\ y' \\ 1 \end{bmatrix} w = [M] \begin{bmatrix} x \\ y \\ 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \underbrace{k_x \cos \phi}_{m_1} & \underbrace{-S_x \sin \phi}_{m_2} & \underbrace{t_x}_{m_3} \\ \underbrace{S_y \sin \phi}_{m_4} & \underbrace{k_y \cos \phi}_{m_5} & \underbrace{t_y}_{m_6} \\ m_7 & m_8 & m_9 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \\ 1 \end{bmatrix}$$

where $x = [x, y]^T$ and $x' = [x', y']^T$ are the corresponding points in images I_i and I_{i+1} respectively, m_1, m_5, m_2 and m_4 are dimensionless transformation parameters that include scale factors k_x et k_y , shearing factors S_x and S_y and in-plane rotation angle ϕ , t_x and t_y are translation parameters (in pixels), m_7, m_8, m_9 are dimensionless parameters taking into account perspective effects and w is a factor related to perspective.

2.2.2. Similarity measure

For the consecutive images from the same cystoscopic sequence or from different cystoscopic sequences, it is not always possible to extract feature points or to do region or contour segmentation robustly, because of great intra- and inter-patient variability of these characteristics. In addition, in most sequences, translations are the predominant parameters (see section 2.4) and their values between image pairs are small enough to consider that viewpoints between consecutive images are little different (small displacements). For these reasons, we selected a registration algorithm based on the direct utilization of gray levels of images i.e. no need of segmentation operations. Similarity measure S is then computed directly from gray levels of images. For our application (cystoscopy, monomodality, limited computation time), the sum of squared differences (SSD) of gray levels of images can be used:

$$\begin{aligned} SSD &= \sum_{x \in I_i \cap I_{i+1}} [I_{i+1}(x) \circ (T_{i,i+1}(M)) - I_i(x)]^2 \\ &= \sum_{x \in I_i \cap I_{i+1}} [I_{i+1}(T_{i,i+1}(x; M)) - I_i(x)]^2 \end{aligned} \quad (4)$$

where $I_{i+1}(T_{i,i+1}(x; M))$ designates image I_{i+1} after application of transformation $T_{i,i+1}$ with the transformation parameter matrix M . SSD is computed for every pixel of coordinates x that is common to both images I_i and I_{i+1} .

This similarity measure has been widely successfully used in applications such as object tracking [34,24], mosaicing of consumer-grade photographs [6,7] or biomedical images [21,20].

2.2.3. Forward and direct compositional algorithms

The definition of the SSD presented in the previous section was used in the registration algorithm proposed by Lucas & Kanade ($L \& K$) [35] to obtain optical flow between images of a sequence for a stereo vision application. Since then, this algorithm has been widely applied to moving object tracking and image mosaicing. In the original article, only translations were considered, but this algorithm has been extended for considering other transformation parameters like in our application. Starting from known initial transformation parameters M , the $L \& K$ algorithm searches ΔM increments that, when added to the initial parameters, will provide minimal SSD between the transformed source image $I_{i+1}(T_{i,i+1}(x; M))$ and the target image $I_i(x)$. From equation 4 and with a known estimation of M , the algorithm of $L \& K$ iteratively minimizes:

$$SSD = \sum_{x \in I_i \cap I_{i+1}} [I_{i+1}(T_{i,i+1}(x; M + \Delta M)) - I_i(x)]^2 \quad (5)$$

for ΔM increments updating M , such that $M \leftarrow M + \Delta M$, and corresponding to the following transformation update:

$$\begin{aligned} T_{i,i+1}(x; M) &\leftarrow T_{i,i+1}(x; M + \Delta M) \approx \\ &T_{i,i+1}(x; M) + \frac{\partial T_{i,i+1}}{\partial M} \Delta M \end{aligned} \quad (6)$$

ΔM increments are obtained by a second order non-linear optimization (Gauss-Newton). The least square minimization problem SSD leads to the first derivative computing of the cost function in equation 5 after linearization by a first order Taylor series expansion of $I_{i+1}(T_{i,i+1}(x; M + \Delta M))$ with respect to ΔM that yields what is shown in equation 7. With the Jacobian (the first derivative

$$\begin{cases} SSD &= \sum_{\mathbf{x} \in I_i \cap I_{i+1}} [I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)) + \nabla I_{i+1}(\mathbf{x}) J_T(M) \Delta M - I_i(\mathbf{x})]^2 \\ \frac{\partial SSD}{\partial M} &= \sum_{\mathbf{x} \in I_i \cap I_{i+1}} [\nabla I_{i+1}(\mathbf{x}) J_T(M)]^T [I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)) + \nabla I_{i+1}(\mathbf{x}) J_T(M) \Delta M - I_i(\mathbf{x})] \end{cases} \quad (7)$$

$$\begin{cases} J_T(M) = \frac{\partial T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)}{\partial M} = \begin{pmatrix} \frac{\partial T_{i,i+1}(x; M)}{\partial m_1} & \dots & \frac{\partial T_{i,i+1}(x; M)}{\partial m_9} \\ \frac{\partial T_{i,i+1}(y; M)}{\partial m_1} & \dots & \frac{\partial T_{i,i+1}(y; M)}{\partial m_9} \end{pmatrix} \\ \nabla I_{i+1}(\mathbf{x}) = \left(\frac{\partial I_{i+1}(x, y)}{\partial x}, \frac{\partial I_{i+1}(x, y)}{\partial y} \right) \\ H_{i+1} = \sum_{\mathbf{x} \in I_i \cap I_{i+1}} \left[\nabla I_{i+1}(\mathbf{x}) \frac{\partial T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)}{\partial M} \right]^T \left[\nabla I_{i+1}(\mathbf{x}) \frac{\partial T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)}{\partial M} \right] \end{cases} \quad (8)$$

of transformed coordinates of the pixel located at (x, y) with respect to transformation parameters), the gray-level Gradient and the second derivative matrix (the Hessian) of source image $I_{i+1}(\mathbf{x})$ respectively, as shown in equation 8. During this minimization process, these derivatives must be computed at every iteration, implying long-time computation operations ($O(n^2N)$ for the Hessian, with n being the number of transformation parameters and N the number of pixels). In [23], the authors observed that when consecutive images to register are quite similar, as in our application, the gradient of the source image can be replaced by the one of the target image. By taking the target image I_i as source image to which the transformation $T_{i,i+1}$ will be applied, and the source image I_{i+1} as target image, the Gradient, the Jacobian and the Hessian of I_i can be computed once for all, leading to significantly reduced computation duration without affecting robustness. For this inverse approach, they develop a composition algorithm that can be applied to homographic transformations i.e. perspective.

The forward compositional (instead of additive) approach developed in [36,37,23] minimizes:

$$SSD = \sum_{\mathbf{x} \in I_i \cap I_{i+1}} [I_{i+1}(T_{i,i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; \Delta M); M)) - I_i(\mathbf{x})]^2 \quad (9)$$

with respect to ΔM and by updating T at each iteration step such as:

$$\begin{aligned} T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M) &\leftarrow T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M) \circ T_{i,i+1}(\mathbf{x}; \Delta M) \\ &= T_{i,i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; \Delta M); M). \end{aligned} \quad (10)$$

The inverse compositional approach detailed in [23] minimizes the following expression:

$$SSD = \sum_{\mathbf{x} \in I_i \cap I_{i+1}} [I_i(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; \Delta M)) - I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M))]^2 \quad (11)$$

with respect to ΔM and iteratively updates:

$$T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M) \leftarrow T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M) \circ T_{i,i+1}(\mathbf{x}; \Delta M)^{-1} \quad (12)$$

After a first order Taylor series expansion, equation 11 becomes:

$$SSD = \sum_{\mathbf{x} \in I_i \cap I_{i+1}} [I_i(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; \Delta M_0)) + \nabla I_i(\mathbf{x}) J_T(M) \Delta M - I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M))]^2, \quad (13)$$

with ΔM_0 the initial increments matrix and $\nabla I_i(\mathbf{x})$ the gradient of initial target image over \vec{x} and \vec{y} .

Considering that the transformation matrix composed of initial increments ΔM_0 is an identity matrix, equation 13 is minimized so that:

$$\begin{aligned} \frac{\partial SSD}{\partial \Delta M} &= 2 \sum_{\mathbf{x} \in I_i \cap I_{i+1}} \left[\nabla I_i(\mathbf{x}) \frac{\partial T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)}{\partial M} \right]^T \\ &\left[I_i(\mathbf{x}) + \nabla I_i(\mathbf{x}) \frac{\partial T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)}{\partial M} \Delta M - I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)) \right]^2 = 0 \end{aligned} \quad (14)$$

or

$$\begin{aligned} \Delta M &= H_i^{-1} \sum_{\mathbf{x} \in I_i \cap I_{i+1}} \left[\nabla I_i(\mathbf{x}) \frac{\partial T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)}{\partial M} \right]^T \\ &[I_{i+1}(T_{i,i+1}(\mathbf{x}; M)) + I_i(\mathbf{x})], \end{aligned} \quad (15)$$

with

$$H_i = \sum_{x \in I_i \cap I_{i+1}} \left[\nabla I_i(x) \frac{\partial T_{i,i+1}(x; M)}{\partial M} \right]^T \left[\nabla I_i(x) \frac{\partial T_{i,i+1}(x; M)}{\partial M} \right] \quad (16)$$

the Hessian matrix for image $I_i(x)$ and H^{-1} its inverse, whose value can be pre-computed once for all before the iterative stage. For our application, we experimentally verified that the forward and inverse compositional algorithms yielded very similar results but the latter was effectively faster, without lost in robustness and precision. Consequently, we implemented this approach in our cystoscopic image mosaicing algorithm.

2.3. Image stitching

In mosaicing, the stitching of the pairwise registered images from the video sequence is performed by placing image I_{i+1} on a global coordinate system ($O_g, \vec{x}_g, \vec{y}_g$) corresponding, for example, to the coordinate system of the first image in the sequence. Optimal local transformations $\tilde{T}_{i,i+1}$ between images I_i and I_{i+1} obtained after completion of the registration algorithm are used to compute successive global transformations \tilde{T}_{i+1} , such that:

$$\tilde{T}_{i+1} = \tilde{T}_{i,i+1} \times \tilde{T}_i = \prod_{j=0}^{i-1} \tilde{T}_{i-j,i-j+1} \quad (17)$$

with $i \in [1; n-1]$ and n being the number of images in the sequence. This sequential way of placing images on the global coordinate system works only if image registration error is minimum. Mosaicing error, directly related to registration error, is evaluated in section 3.

To smooth the gray-level discontinuities between the side pixels of image I_{i+1} and those co-localized in the panoramic image already built, a spatial weighting function is applied. This is done by assigning to superimposed pixels gray-level values weighted by a gaussian function such as:

$$\begin{cases} Ip_{i+1} = w_1 I_{i+1} + w_0 Ip_i \\ w_1 = 0.9e^{-\frac{r}{\sigma^2}} + 0.1 = 1 - w_0 \end{cases} \quad (18)$$

where Ip_i and Ip_{i+1} are respectively, the panoramic image before and after stitching of image I_{i+1} . w_1

and w_0 are the weights assigned respectively to the pixels of the image to be stitched and to the ones of the panoramic image already constructed. r is the radial distance of a pixel i.e. measured with reference to the stitched image centre and σ is the standard deviation of the gaussian function.

Based on our own visual (qualitative) observation of our cystoscopic panoramic images, the value of σ was fixed at $0.25N$ ($N = 400$ pixels). As a result, both gray-level continuity on image borders and light gradient diffusion on the map are ensured.

2.4. Speed improvements

The speed of convergence (number of iterations) of the registration process described in the precedent section strongly depends on the initialization values of the transformation parameters. To rapidly initialize these parameters with values closer to an ‘‘optimal’’ solution, we proposed to first compute the cross-correlation of images using their Fourier transforms [38], such that:

$$CC(x, y) = \mathcal{F}^{-1} [\mathcal{I}_i(u, v) \mathcal{I}_{i+1}^*(u, v)] \quad (19)$$

with $\mathcal{I}_i(u, v)$ and $\mathcal{I}_{i+1}(u, v)$ the Fourier transform of target and source images I_i and I_{i+1} respectively, (u, v) the spatial frequencies and $*$ indicating the complex conjugate.

The matrix $CC(x, y)$ thus computed has a correlation peak whose coordinates constitute a good approach of the exact translation values existing between images being registered. However, this information from cross-correlation is only workable if variations of the other transformation parameters stay in the same limits (few degrees in rotation and up to 10% for scale factor).

In order to demonstrate the usefulness of the cross-correlation operation and to ensure its exploitability for our application, a test was performed over 3860 pairs of images extracted from ten clinical cystoscopic sequences (acquired *in vivo*). We compared the translations values obtained from cross-correlation implemented in our algorithm (present study) to those obtained from a registration algorithm based on MI mentioned earlier (section 1.2) and already validated ([26]). Results for two of these representative sequences are given in figure 3. The translation values obtained by the two approaches are globally similar. Mean value of the difference (\pm standard-deviation) between translations obtained for ten sequences is $0.04 (\pm 2.33)$ pixels over \vec{x} and $0.02 (\pm 2.54)$ pixels over \vec{y} . Maximum difference is

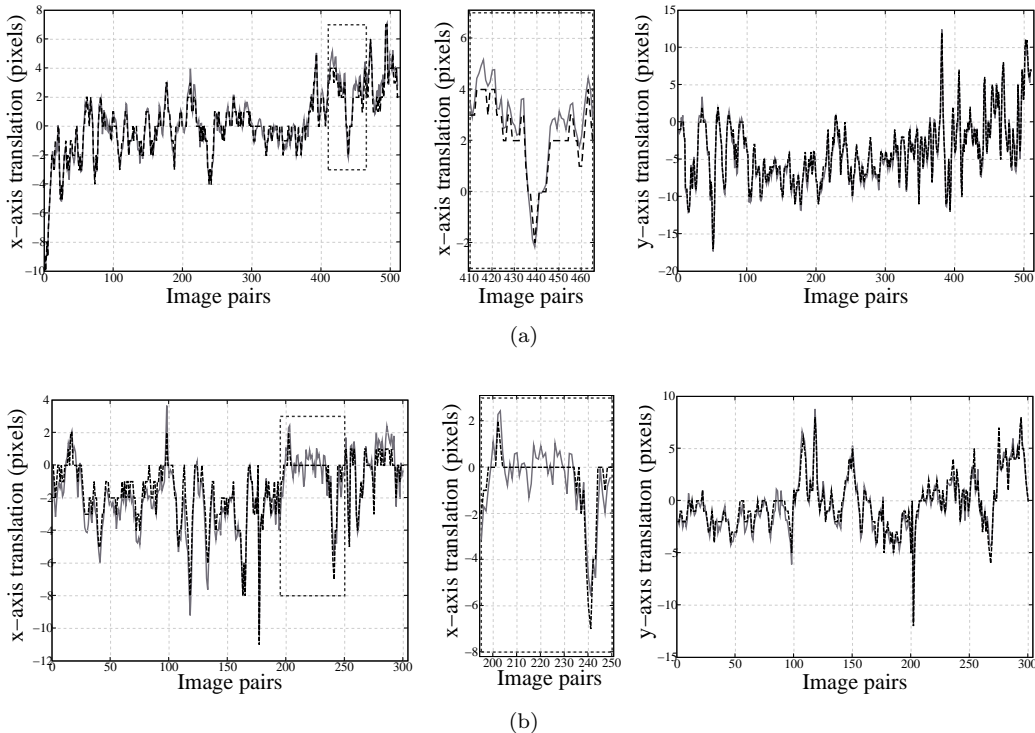


Fig. 3. Translation parameter values as a function of consecutive pairs of images obtained for a 511 image sequence ((a)) and a 301 image sequence ((b)) from two clinical cystoscopies (*in vivo*). Left: x translations, middle: zoom inside the dashed rectangle on the corresponding left graphics, right: y translations. Black-dotted and gray lines are respectively for translation values obtained from the cross-correlation algorithm (present study) and from the registration algorithm based on Mutual Information (MI) [26].

34.22 pixels over \vec{x} and 34.44 pixels over \vec{y} . These results show that cross-correlation applied to cystoscopic images allows a simple and fast estimation of initial translation values close to the optimal solution. The efficient and effective application of correlation highlight the fact that translations are the predominant varying transformation parameters for these clinical cystoscopic sequences. The image registration method described in section 2.2 works well if the superposed areas between images to register is higher than 80% of image size (as will be detailed in section 3). If not, the registration process may be slowed down or even fail. Thus, for evaluating the superposition rate between all consecutive images of our test clinical sequences, we represented the distribution of the absolute values of x and y translations (figure 4), obtained by registering the 3860 image pairs previously mentioned. These distributions indicate that the translation values found are always lower than 50 pixels. Around 90% of the translation values are lower than 10 pixels. Mean translation values (\pm standard deviation)

over \vec{x} and \vec{y} are respectively, $3.20 (\pm 3.34)$ and $4.04 (\pm 4.37)$ pixels. For the tested sequences, the maximum translation value was 43.56 pixels (\vec{y} axis). This high value occurred only once, and was found in a very specific sequence having the largest translation values among all tested sequences. Considering the size of images and the maximum values of translation obtained for the tested sequences, the superposition rate between two adjacent images is always greater than 80%. In addition, cystoscopic video recorded in clinics are characterized by many sequences where the cystoscope moves slowly or stays almost static. In these cases, a significant time is spent in registering images very close to each other (little transformed images). Consequently, we proposed to use the translation estimations delivered by the cross-correlation stage to perform a dynamic selection of image pairs to be registered. Based on the characterization of x and y translation distributions over the ten cystoscopic sequences, we have added a conditional step to our algorithm: the iterative image registration and the computation of

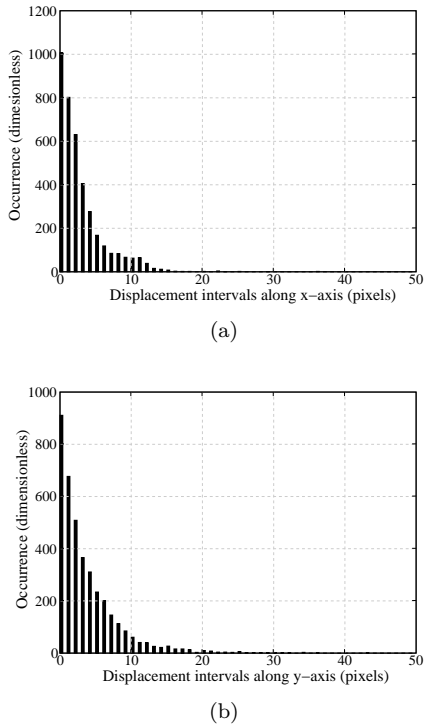


Fig. 4. Distribution of absolute values of translations for 10 image sequences (3868 image pairs) over x -axis ((a)) and y -axis ((b)).

global transformation matrices are only performed when translations between images are greater than 9 pixels (85% of the translation values in our test sequences). Once this threshold is reached, iterative registration of the current image and the last one registered, as well as update of the global transformation matrix are performed. Since the iterative part of the registration algorithm takes the longest in computation time, a substantial time saving is obtained by avoiding registration of images that are too close from each other.

3. Results and discussion

3.1. Quantitative evaluation of the mosaicing precision on phantom

Quantitative evaluation of mosaicing precision can hardly be done with video sequences recorded in clinical conditions (*in vivo*), where the position coordinates of the viewpoint of the cystoscope into the bladder are unknown. To quantify the mosaicing precision, we need to best simulate realistic

conditions of acquisition while having a fine control of the cystoscope movements. To do so, an acquisition protocol on a phantom with precise control of 3D movements of the cystoscope was established. A multi-axis motorized micrometric positioning system (translation stages *UMR8.51* and linear actuators *LTA-HS, Newport*, 0.1 μm precision) was settled for applying in plane translations and scale factor variations, that is, along \vec{x} , \vec{y} and \vec{z} axis, as well as in plane rotations (rotation stage *PR50CC, Newport*, 0.01 $^\circ$ precision) and out of image plane rotations (rotation stage *URS75CC, Newport*, with 0.01 $^\circ$ precision). The sequence of movements was controlled by a motor drive controller (*XPS, Newport*) with a LabView programmed interface. Due to the size and weight of the acquisition system, the movements of the cystoscope were simulated by movements of the phantom on which the image acquisitions were performed. The phantom is a high-resolution printed photograph (10 \times 12 cm) of the internal surface of a pig bladder, that was excised and “wide opened”. From texture and anatomical viewpoints, a pig bladder is very similar to a human one. The acquisition of an image sequence was performed following the predefined path sketched in figure 5(a). The course of the cystoscope involved movements along every axis composing the positioning system (2 rotations and 3 translations). Displacements over the 1st acquisition direction included a 42 mm translation in \vec{x} , combined to a 42 mm translation along \vec{z} (scale-factor variation). Displacement over the 2nd direction involved a 42 mm translation along \vec{y} coupled to in plane rotations from 0 to 20 $^\circ$. The 3^d direction of displacement was composed of a -42 mm translation along \vec{x} (returning to initial coordinate $x = 0$) with out of plane rotation from 0 to 16 $^\circ$ (perspective modifications). The last set of movements (4th acquisition direction) involved translations along \vec{y} and \vec{z} , and in- and out-of-plane rotations simultaneously, such that the device came finally back to its starting position. A total of 169 images were acquired (42 images for each acquisition direction). The first (I_{001}) and last (I_{169}) images were acquired at the same position.

To enable a measure of the construction error in the panoramic image, a grid of black points regularly spaced was printed over the bladder photograph (see figure 5(b)). The panoramic image obtained after applying our mosaicing algorithm to the acquired image sequence is shown in figure 5(c). Mosaicing error computation was carried out in three steps.

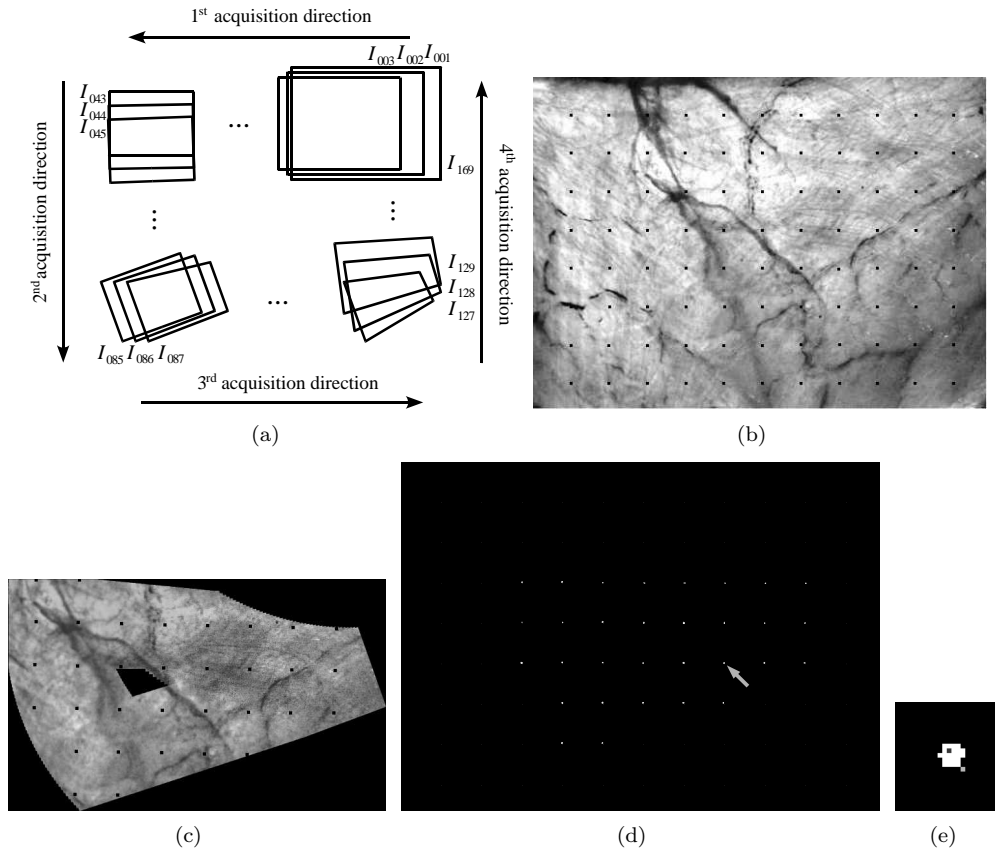


Fig. 5. (a) Illustration of the acquisition path of images $I_{001}, I_{002} \dots I_{169}$ applied onto the bladder photograph phantom for quantifying mosaicing precision. (b) Pig bladder photograph with a regular grid of black points printed on it. These points have been enlarged to facilitate their observation in this figure. (c) Panoramic image (1947×1187 pixels) constructed from 169 images acquired along the path in (a). Black points have been enlarged. (d) Image of the points (centroid of detected points) segmented in the panoramic image (c) with reference points located in the photograph (b) in the same coordinate system. (e) Enlarged image of one point in image (d) (pointed by the gray arrow) showing the centroid of the detected point (in light gray) and the segmented point in the reference image (in dark gray). Mean distance between homologous points is 3.82 pixels.

Firstly, four points manually selected in the first image in the panoramic image are registered with their counterparts in the digitized photograph. To perform this registration, a rigid transformation model is used (2D translations, rotation and scale factor). Secondly, the segmentation of every visible points (31 points) in the panoramic image (figure 5(d)) and the automatic computation of centroid coordinates of these segmented points are performed using morphological operators. Thirdly, these coordinates are compared to the known coordinates of the center of the points printed on the photograph. Mosaicing precision given by the distance error measure e_m was calculated as the mean Euclidean distance between the coordinates (x_m^j, y_m^j) of N_p point centroids segmented in the panoramic image and the coordinates (x_r^j, y_r^j) of the point centroids segmented in the pho-

tograph, such that:

$$e_m = \frac{1}{N_p} \sum_{j=1}^{N_p} \sqrt{(x_m^j - x_r^j)^2 + (y_m^j - y_r^j)^2}. \quad (20)$$

Figure 5(d) shows the 31 segmented points in the panoramic image 5(c) and their 31 counterpart points in the reference printed photograph. Figure 5(e) is an enlarged image of one of these points where can be observed in light-gray, the centroids (barycenters) of points detected in the panoramic image and in dark-gray, the centroids of points in the reference printed photograph. At last, the grid of points with regular vertical and horizontal spacing can be identified in the panoramic image, with a mean error of 3.82 pixels and a maximum error of 6.73 pixels. The size of the panoramic image being 1947×1187 pixels, the maximum error represents

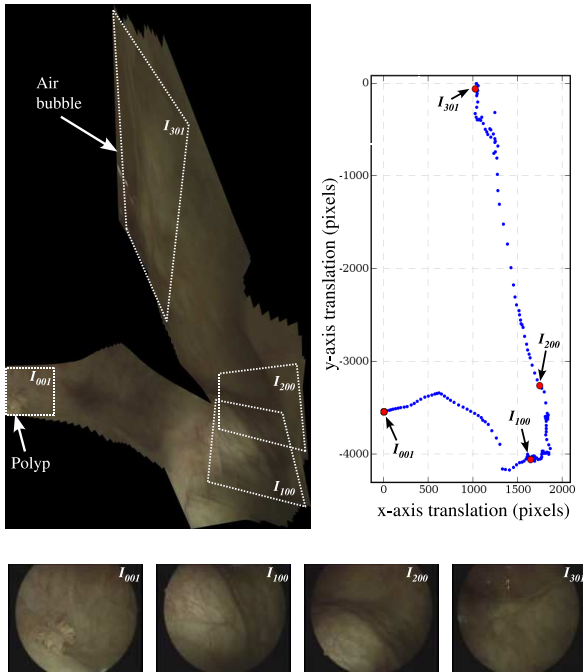


Fig. 6. 2544×4362 pixels panoramic image constructed from a 301 images sequence. In this image, a polyp can be located (at bottom left) with respect to the air bubble visible at top. The graphic at right shows the course of the endoscope during the acquisition of this sequence, represented thanks to the computed transformation parameters.

0.57% of image height (1187 pixels). This error percentage is very small and low enough for providing to the physician a good quality panoramic image efficiently exploited in the case of our application. This point is further discussed in the following section.

3.2. Mosaicing of clinical data

Our mosaicing algorithm was applied to cystoscopic sequences acquired during conventional clinical procedures for demonstrating its applicability to real conditions (*in vivo*) and performing a qualitative validation on clinical data. Among 6 video recordings from 6 different patients (4 to 11 minutes each), we selected 10 image sequences whose duration varies from several seconds to several dozens of seconds. We considered as particularly interesting those sequences where the air bubble, the ureters, the trigone, some scars or polyps may be observed. The primary interest of these anatomical structures is not to give exploitable elements to the registration algorithm, but for the physician to more easily associate the panoramic image to a particular anatom-

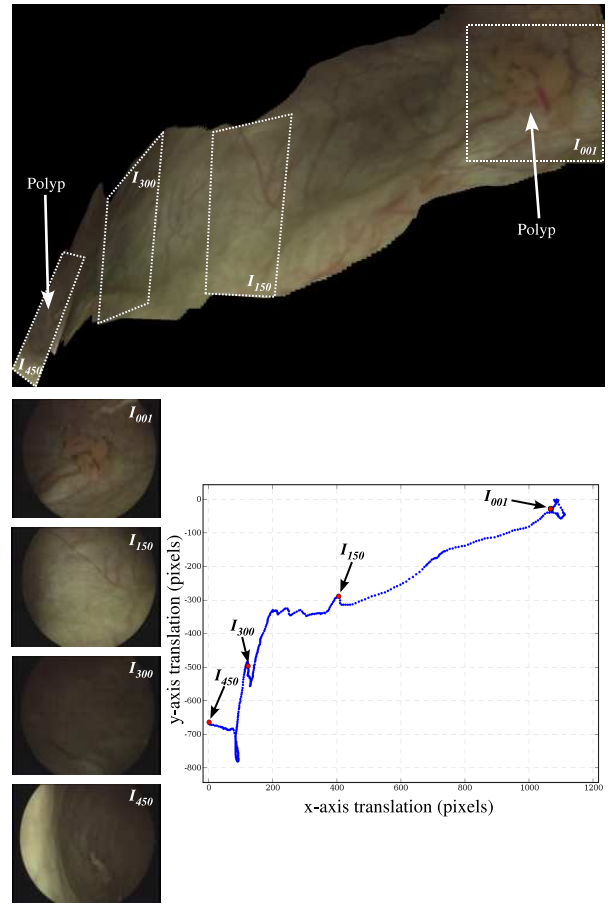


Fig. 7. 1479×1049 pixels panoramic image constructed from a 450 images sequence. Two polyps are visible on the right top and at the bottom left of the image. In this panoramic image, both polyps can be accurately located one to each other. The 4 images extracted from along the sequence (right) highlight the great variations in lighting conditions.

ical place in the bladder. The number of images in the sequences vary from 150 images (6 seconds) to 1300 images (52 seconds). Representative results for 3 of these sequences are given in figures 6 to 8. It is worth noticing that, for these sequences where lighting conditions and texture features vary significantly, our approach is robust enough against the variations in images observed. The urologists who analyzed these panoramic images confirmed their visual coherence. The mosaicing errors (not measured here) were estimated as small enough for allowing the clinician to properly interpret or analyze the image qualitatively. The mosaicing algorithm was programmed in C language using the OpenCV vision library. Panoramic images were constructed using a Pentium IV $3.2GHz$ and $2Gb$ RAM computer. A mean number of 12 iterations was needed by the

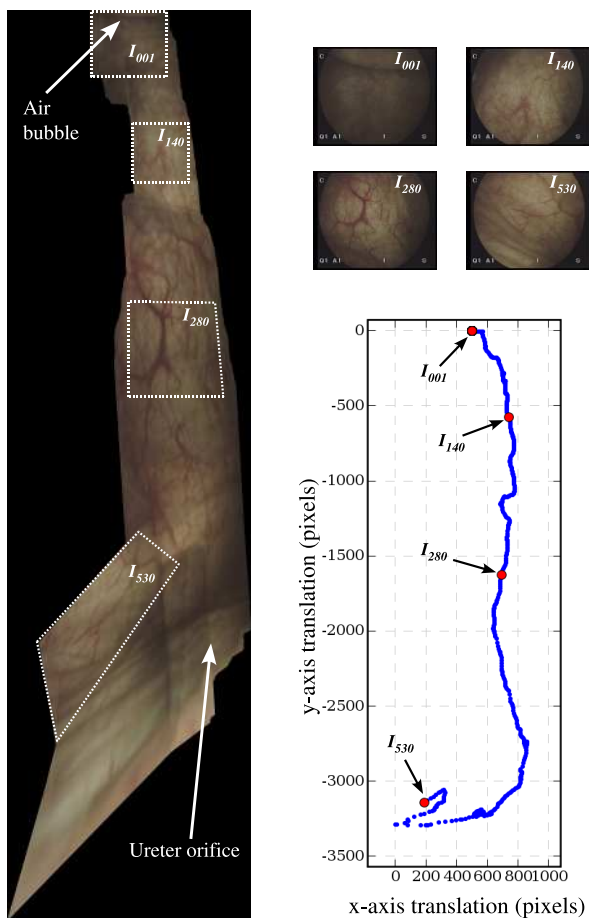


Fig. 8. 1458×5471 pixels panoramic image constructed from 530 images. The air bubble at top and an ureter orifice at the opposite side of the bladder (bottom right) can be observed simultaneously on this panoramic image.

optimization algorithm to register a pair of images. Registration time for an image pair varied between 1.2 and 1.5 seconds. Total construction time (registration and stitching) was 9.31 minutes for image in figure 6 (301 images), 9.39 minutes for image in figure 7 (530 images) and 12.69 minutes for image in figure 8 (450 images). These computation times make possible the construction of one partial panoramic image of the bladder during the standard cystoscopic examination procedure. The next section give details on how further reduce these computation times by not registering the totality of images in a sequence but only those separated by significant variations of translations.

3.3. Improvements and comparisons

With reference to the study of the occurrence of translation values between images in the 10 cystoscopic sequences used (see section 2.4), we implemented the proposed method of conditional (selective) registration for translations lower than 9 pixels. Results show a significant computation time reduction with this method of image selection (the registration and stitching times diminished by 40% compared to the algorithm without selection). In this way, computation times are significantly reduced, from 9.31 down to 4.74 minutes, from 9.39 to 6.91 minutes and from 12.69 to 6.70 minutes for images respectively in figures 6, 7 and 8. We observed that panoramic images constructed with and without image selection are visually quite similar. With this computation time decrease, constructing panoramic images of the internal wall of bladders in a time duration lower than the one of the cystoscopic examination is possible.

To date, the only published work on bladder mosaicing is presented in [26]. From a same sequence of cystoscopic images (*in vivo*) we compared the two panoramic images constructed with the mosaicing algorithm presented in [26] and the one developed in the present paper. As seen in figure 9, a great visual similarity can be observed. The mosaicing mean error using the algorithm developed in [26] is 3.35 pixels after cumulated error correction (43.14 pixels without correction). Using our algorithm, a mean error of 3.82 pixels and a maximum error of 6.73 pixels were obtained (without cumulated error correction). Construction of panoramic images using our method takes some minutes, while the MI-based algorithm used in [26] takes several hours for the same panoramic images. In section 2.1, we mentioned that image pre-processing is essential in our application for the registration algorithm to properly works. To highlight the effect of the fiber pattern and lighting inhomogeneities on the registration process, the two similarity measures (SSD and MI) were computed for two regions extracted from two images acquired with a fiberscope. The translations between images are *a priori* known (no other geometric transformation between images is involved): $t_x = 8$ pixels (x-axis) and $t_y = -47$ pixels (y-axis). Without applying image pre-processing, the coordinates of the two parameter space extremum found are wrong: $(t_x, t_y) = (-1, -50)$ for MI and $(t_x, t_y) = (0, -46)$ for SSD. Figures 10(a) and 10(b) illustrate the

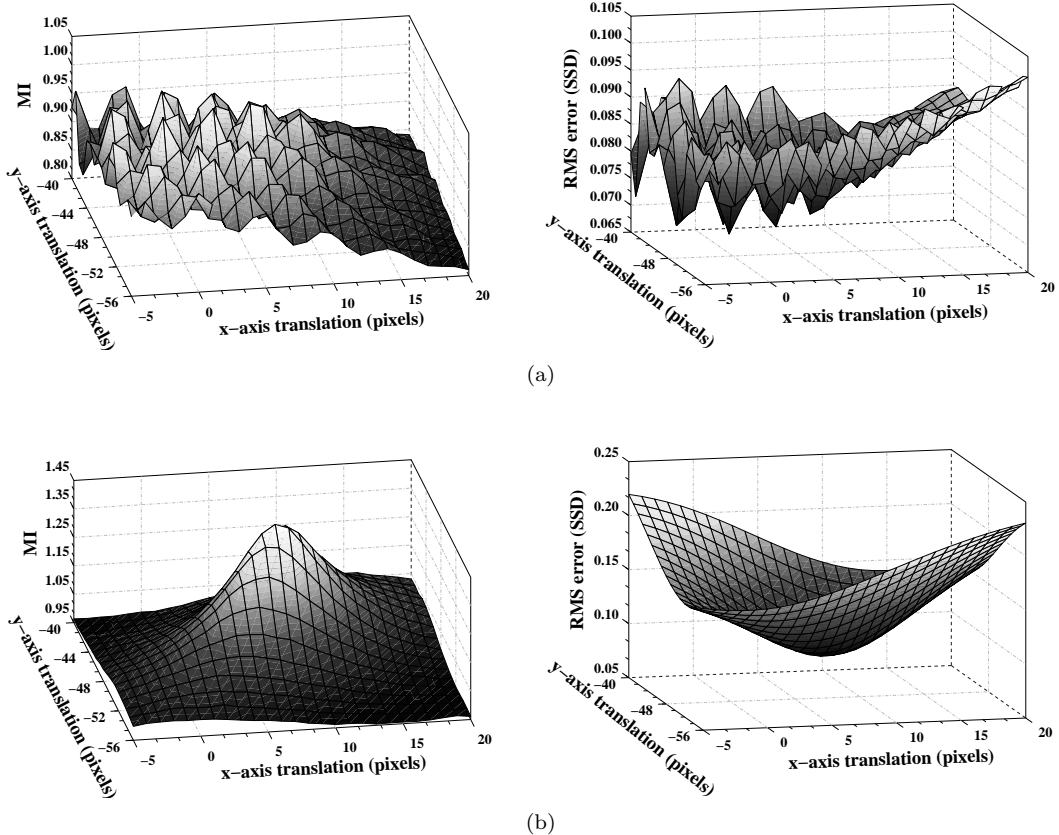


Fig. 10. Effect produced by the fiber pattern and lighting inhomogeneities on MI (left column) and on the absolute value of SSD (right column) computed using images without pre-processing (a) and with pre-processing (b). In the latter case, the cost functions are convex and a unique global extremum exist that corresponds to the correct value of translations (8, -47)

effect of these artifacts on MI and SSD respectively. These cost functions (similarity measures) are affected by many local extrema that make harder for the optimization algorithm to converge towards a correct value of transformation parameters. When pre-processing is applied to these images, the correct results are obtained: $(t_x, t_y) = (8, -47)$ for the two similarity measures.

3.4. Limits and applicability of the presented algorithm

The mosaicing method presented in this paper was specifically developed for building panoramic images of the internal wall of human bladders. This approach can be also applied to other hollow organs, as the stomach for example. However, its applicability to tubular hollow organs (like the colon and the esophagus) is more difficult namely because of the

endoscope orientation (very high perspective deformation). As for any other registration algorithm, the two main factors affecting the registration process in our algorithm are image quality (color contrast, deformations produced by the cystoscope orientation) and *intra* and *inter*-patient image variability. However, although a great variability exist between characteristics of cystoscopic images in a same sequence, in general, lighting and texture conditions do not change so drastically from one image to the next one in the sequence. The bladder photograph used to evaluate registration precision was also used to quantify the limits of the registration method. So, we applied elementary transformation combinations controlled by the positioning system described in section 3.1. Considering realistic limits related to our endoscopic application, the maximum values of transformation parameters (see equation 2.2.1) applied to images were: ± 50 pixels for t_x and t_y trans-

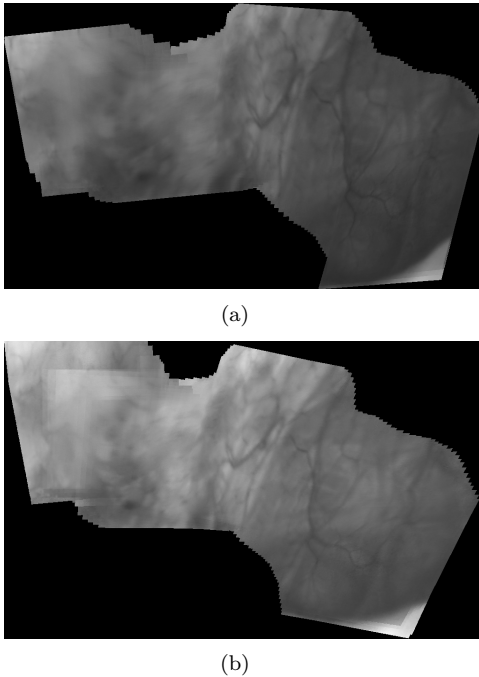


Fig. 9. (a) 1947×1187 pixels panoramic image from a sequence of cystoscopic images constructed using the algorithm presented in this work. (b) Same panoramic image constructed using the MI-based mosaicing algorithm presented in [26].

lations and $\pm 10^\circ$ for rotation in the image plane (ϕ angle). Isometric variations in scale factor (related to k_x and k_y parameters) were fixed to $\pm 10\%$. Variations in viewpoint (perspective) were simulated by $\pm 10^\circ$ rotations of angles θ and ψ (around x- and y-axis respectively). It is to be noticed that, considering the acquisition video rate (25 images/second) and the limited speed of the cystoscope movements during a clinical examination (few mm/s), the values of these parameters in a standard sequence are much lower than those considered for our tests. The results of these tests indicate that the impact of rotation angle ϕ (around z-axis) on the algorithm performance is important. If $\phi \approx 10^\circ$ and other transformations are also significant, registration fails. However, we found that for a superposition rate of 75% of image size and for in plane rotations lower than 8° (in practice, these rotations are smaller than 8° anyway), correct registration of images with a maximum error less than 1 pixel is systematically obtained. This error is very small indeed, because the obtained deviation from the true position represents 0.4% of the height of images (400×400 pixels).

In addition, the conditions of the video acquisitions on our phantom (pig bladder excised then

“wide opened”) and on a human bladders (clinical *in vivo*) are relatively different. More precisely, pig bladder images as acquired are globally less contrasted (weak lighting conditions, non-immersed in a liquid media, light reflections, mechanical strain of the bladder wall. . .) than human bladder images acquired in clinics. In those circumstances, the differences between images acquired on the pig bladder photograph and on human bladders *in vivo* are more important than the *intra-patient* differences. However, our algorithm was successfully applied to both types of sequences. The good results obtained for various sequences acquired for different patients show the ability of our approach to deal with image variability due to *intra-* and *inter-patient* differences.

Finally, from the clinical application viewpoint, visual coherence corresponding to continuity and preservation of the anatomical information is a parameter at least as important as mosaicing error. Therefore, the panoramic images constructed and their corresponding video sequences were compared by the physicians so as to analyze the presence and continuity of blood vessels, scars and other anatomical features visible on the bladder wall images. For all panoramic images, the clinicians found that they were visually fully coherent. Thanks to this easy-to-use and easy-to-store media, they were able to rapidly observe specific zones of interest (lesions for example) and to precisely locate them in the bladder.

4. Conclusion and perspectives

We developed a fast and automatic mosaicing algorithm applicable to cystoscopic video sequences. Geometric transformations between image pairs are modeled by a perspective transformation. The presented mosaicing algorithm consists of a fast initialization of translation parameters by an image cross-correlation step, followed by a limited but efficient optimization of all the transformation parameters using an inverse composition-based registration scheme, and finally a projection of successively registered images onto a global common coordinate system. A test protocol performed on a phantom allowed us to measure a mosaicing error lower than 0.3% of the panoramic image size (width). We realized a qualitative evaluation of the panoramic images constructed from 10 different image sequences obtained from standard cystoscopic examinations.

An analysis of the distribution of translation values existing between images for these clinical sequences was carried out and exploited to modify our algorithm for dynamic and automatic selection of the image pairs to be registered. In this way, construction of panoramic images of parts of a bladder takes only some minutes. Even if image mosaicing in real time was not reached (with video rate of 25 images/second), the computation time taken by our algorithm, allows the physician to obtain an exploitable panoramic image before ending the cystoscopic clinical examination. All panoramic images built from clinical cystoscopies constitute easy-to-use and easy-to-store media but were also visually fully coherent for the clinicians who were able to rapidly observe specific zones of interest (lesions for example) and to precisely locate them in the bladder. Complementary work is being carried out to further reduce this computation time using image position prediction techniques based on the translation information between previous images of the sequence.

5. Acknowledgments

The Authors express their grateful thanks to the “Region Lorraine” the “Ligue Contre le Cancer (CD 52, 54)” and the CONACYT (grant) for their financial support. Authors thank Dr. M.-A. D’Hallewin (Anticancer center “Centre Alexis Vautrin”, Nancy, France) for useful comments and the Experimental Surgery Laboratory at the Faculty of Medicine in Nancy for fresh pig bladders taking.

References

- [1] J. Tyczynski, D. Parkin, Bladder cancer in Europe, ENCR Cancer Fact Sheets. European Network of Cancer Registries. International Agency for Research on Cancer 3.
- [2] D. K. Chopin, B. Gattengo, *Rsum du rapport 2001 de l’association française d’urologie (AFU) sur les tumeurs superficielles de la vessie* (2001).
- [3] J. Holzbeierlein, E. Lopez-Corona, B. Bochner, H. Herr, S. Donat, P. Russo, G. Dalbagni, P. Sogani, Partial cystectomy: a contemporary review of the memorial sloan-kettering cancer center experience and recommendations for patient selection, *Journal of Urology* 172 (3) (2004) 878–881.
- [4] W. Blondel, C. Daul, S. Villette, R. Miranda-Luna, Y. Hernandez-Mier, G. Bourg-Heckly, D. Wolf, Autofluorescence endoscopic spectro-imaging and 2D-cartography for *in situ* localisation and diagnosis of cancerous lesions, *Traitement du signal* 23 (2005) 213–233.
- [5] M. Brown, D. G. Lowe, Recognising panoramas, in: *Proceedings of the 9th IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV2003)*, Vol. 2, 2003, pp. 1218–1227.
- [6] P. Baudisch, D. Tan, D. Steedly, E. Rudolph, M. Uyttendaele, C. Pal, R. Szeliski, Panoramic viewfinder: providing a real-time preview to help users avoid flaws in panoramic pictures, in: *OZCHI ’05: Proceedings of the 19th Conference of the computer-human interaction special interest group (CHISIG) of Australia on Computer-human interaction*, 2005, pp. 1–10.
- [7] D. Steedly, C. Pal, R. Szeliski, Efficiently registering video into panoramic mosaics, in: *In Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV 2005)*, 2005, pp. 15–21.
- [8] A. Litvin, J. Konrad, W. C. Karl, Probabilistic video stabilization using kalman filtering and mosaicking, in: *Proceedings of the IS&T/SPIE Symposium on Electronic Imaging, Image and Video*, Vol. 5022, 2003, pp. 663–674.
- [9] Y. Matsushita, E. Ofek, X. Tang, H. Shum, Full-frame video stabilization, in: *Proceedings of 2005 IEEE International Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*, Vol. 1, 2005, pp. 50–57.
- [10] R. Szeliski, Video mosaics for virtual environments, *IEEE Computer Graphics and Applications* 16 (2) (1996) 22–30.
- [11] R. Szeliski, H. Shum, Creating full view panoramic image mosaics and environment maps, in: *SIGGRAPH ’97: Proceedings of the 24th annual conference on Computer graphics and interactive techniques*, Vol. 31, 1997, pp. 251–258.
- [12] M. Douze, Estimation d’homographies inter-images. cas des mosaques et du suivi en temps rel. applications en ralit augmente, Ph.D. thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse (2004).
- [13] Y. Rzhanov, L. Huff, R. Cutter Jr., Seafloor video mapping: modeling, algorithms, apparatus, in: *In Proceedings of the International Conference on Image Processing (ICIP2002)*, 2002, p. 4.
- [14] N. Gracias, S. Negahdaripour, Underwater mosaic creation using video sequences from different altitudes, in: *In Proceedings of the MTS/IEEE OCEANS ’05*, Vol. 1, 2005, pp. 1234–1240.
- [15] A. Zomet, S. Peleg, Efficient super-resolution and applications to mosaics, in: *In Proceedings of the 15th International Conference on Pattern Recognition (ICPR’00)*, Vol. 1, 2000, pp. 579–583.
- [16] D. P. Capel, Image mosaicing and super-resolution, Ph.D. thesis, Robotics Research Group. Departement of Engineering Science. University of Oxford (2001).
- [17] D. Capel, A. Zisserman, Computer vision applied to super-resolution, *IEEE Signal Processing Magazine* 20 (3) (2003) 75–86.
- [18] A. H. Gee, G. M. Treece, R. W. Prager, C. Cash, L. Berman, Rapid registration for wide field-of-view freehand three-dimensional ultrasound, *IEEE Transactions on Medical Imaging* 22 (11) (2003) 1344–1357.

- [19] Z. Yaniv, L. Joskowicz, Long bone panoramas from fluoroscopic x-ray images, *IEEE Transactions on Medical Imaging* 23 (1) (2004) 26–35.
- [20] Y. Zhou, M. Wan, H. Xue, A tunable incremental factor augmented inverse image alignment method in fundus angiogram registration and mosaicing, *Computerized Medical Imaging and Graphics* 28 (2004) 219–224.
- [21] Y. Zhou, H. Xue, M. Wan, Inverse image alignment method for image mosaicing and video stabilization in fundus indocyanine green angiography under confocal scanning laser ophthalmoscope, *Computerized Medical Imaging and Graphics* 27 (2003) 513–523.
- [22] S. Baker, R. Gross, I. Matthews, T. Ishikawa, Lucas-Kanade 20 years on: A unifying framework: Part 2, Tech. Rep. CMU-RI-TR-03-01, Robotics Institute, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA (Février 2003).
- [23] S. Baker, I. Matthews, Lucas-Kanade 20 years on: A unifying framework: Part 1, Tech. Rep. CMU-RI-TR-02-16, Robotics Institute, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA (July 2002).
- [24] S. Baker, I. Matthews, J. Xiao, R. Gross, T. Ishikawa, T. Kanade, Real-time non-rigid driver head tracking for driver mental state estimation, Tech. Rep. CMU-RI-TR-04-10, Robotics Institute, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA (October 2004).
- [25] A. Can, C. V. Stewart, B. Roysam, H. L. Tanenbaum, A feature-based, robust, hierarchical algorithm for registering pairs of images of the curved human retina, *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 24 (3) (2002) 347–364.
- [26] R. Miranda-Luna, C. Daul, W. Blondel, Y. Hernandez-Mier, D. Wolf, F. Guillemin, Mosaicing of bladder endoscopic image sequences: Distortion calibration and registration algorithm, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 55 (2) (2008) 541 – 553.
- [27] R. Miranda Luna, Contribution au mosaquage d’images endoscopiques d’organes creux pour l’aide au diagnostic du cancer en phase prococe, Ph.D. thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine (2005).
- [28] U. Vovk, F. Pernus, B. Likar, A review of methods for correction of intensity inhomogeneity in mri, *IEEE Transactions on Medical Imaging* 26 (3) (2007) 405–421.
- [29] F. Leong, M. Brady, J. McGee, Correction of uneven illumination (vignetting) in digital microscopy images, *Journal of Clinical Pathology* 56 (2003) 619–621.
- [30] R. Miranda-Luna, Y. Hernandez-Mier, C. Daul, W. Blondel, D. Wolf, Mosaicing of medical video-endoscopic images: data quality improvement and algorithm testing, in: *IEEE Proceedings of the 1st International Conference on Electrical and Electronics Engineering, 2004 (ICEEE)*, 2004, pp. 530–535.
- [31] R. Miranda-Luna, W. Blondel, C. Daul, Y. Hernandez-Mier, R. Posada, D. Wolf, A simplified method of endoscopic image distortion correction based on grey level registration, in: *IEEE Proceedings of the 2004 International Conference on Image Processing (ICIP ’04)*, Vol. 5, 2004, pp. 3383–3386.
- [32] E. A. R. Pirrone, O. Gambino, Illumination correction on mr images, *Journal of Clinical Monitoring and Computing* 20 (2006) 391–398.
- [33] C. Winter, S. Rupp, M. Elter, C. Mnzenmayer, H. Gerhuser, T. Wittenberg, Technique of distortion correction in endoscopic images using a polynomial expansion, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 53 (10) (2006) 2035–2046.
- [34] K. C. Ng, H. Ishiguro, M. Trivedi, T. Sogo, An integrated surveillance system-human tracking and view synthesis using multiple omni-directional vision sensors, *Image and Vision Computing* 22 (7) (2004) 551–561.
- [35] B. D. Lucas, T. Kanade, An iterative image registration technique with an application to stereo vision (darpa), in: *Proceedings of the 1981 DARPA Image Understanding Workshop*, 1981, pp. 121–130.
- [36] H. Shum, R. Szeliski, Panoramic image mosaics, Tech. Rep. MSR-TR-97-23, Microsoft Research, Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052 (December 1997).
- [37] H. Shum, R. Szeliski, Construction of panoramic image mosaics with global and local alignment, *International Journal of Computer Vision* 16 (1) (2000) 63–84.
- [38] C. D. Kuglin, D. C. Hines, The phase correlation image alignment method, in: *Proceedings of the 1975 IEEE International Conference Cybernetics Society*, 1975, pp. 163–165.

III.2 IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2008, accepté (révisions mineures)

Simultaneous Characterization of Optical and Rheological properties of Carotid Arteries via Bimodal Spectroscopy: Experimental and Simulation Results

E. Pery*, W.C.P.M. Blondel*, J. Didelon, A. Leroux, and F. Guillemin

Abstract—The present study aimed at identifying potential correlations between rheological and optical properties of artery rings before and after cryopreservation, at different deformations, using experimental and simulation results. For experiments, an artery ring uniaxial mechanical test bench was coupled to fibered optical spectroscopes measuring 410 nm-excited autofluorescence and 650-850 nm elastically back-scattered intensity spectra. Furthermore, we developed a statistical simulation program of light transport and fluorescence adapted to our specific experimental configuration. Both spectroscopies gave intensity spectra with higher amplitude for the cryopreserved samples. These observations are to be related to histological modifications affecting the arterial wall of post-cryopreserved samples. We also observed significative spectral amplitude variations (increasing autofluorescence intensity and decreasing diffuse reflectance) as a function of the circumferential strains (0-60%). Using the simulation, we identified values of absorption, diffusion and anisotropy coefficients and their variations as a function of state (fresh-cryopreserved), strains (0, 30%, 60%) and wavelengths (700, 740, 780 nm). The media and the adventice are respectively less and more absorbing for post-cryopreserved rings and it is the opposite for the fresh ones at higher wavelengths. Absorption and diffusion coefficients are slightly higher, whatever the wavelengths and strains, for the fresh than for the cryopreserved samples.

Index Terms—autofluorescence, elastic scattering, optical parameters, biomechanics, artery.

I. INTRODUCTION

FIBERED optical methods of diagnosis such as autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopies are used to characterize biological tissues non invasively and non destructively [1]. The principle consists in lighting a living tissue with an incident light flux which is then absorbed, elastically scattered or gives rise to intrinsic

This work was supported in part by the French association “Ligue Contre le Cancer (CD 52, 54)”, Nancy-University and the Region Lorraine. Asterisk indicates corresponding authors.

E. Pery* and W.C.P.M. Blondel* are with the Health Engineering Group in the Automatic Control Research Center in Nancy-University (UMR 7039 CRAN CNRS-UHP-INPL), 2 avenue de la Forêt de Haye F-54516 Vandoeuvre-les-Nancy, France. (e-mails of the corresponding authors: emilie.pery@ensem.inpl-nancy.fr, walter.blondel@ensem.inpl-nancy.fr).

J. Didelon is with the Laboratory of Automated Medical Instrumentation in Cancerology (IMAC) in the anti-cancer center “Centre Alexis Vautrin”, 54511 Vandoeuvre-les-Nancy, France (e-mail: j.didelon@nancy.fnclcc.fr).

A. Leroux is with the Anatomopathologic Department in the “Centre Alexis Vautrin”, 54511 Vandoeuvre-les-Nancy, France (e-mail: a.leroux@nancy.fnclcc.fr).

F. Guillemin is a surgeon and director in the “Centre Alexis Vautrin”, 54511 Vandoeuvre-les-Nancy, France (e-mail: f.guillemin@nancy.fnclcc.fr).

fluorescence. Consequently, the spectral characteristics of the outgoing light intensity measured either in transmission or in reflectance configurations can be related to the morphological, anatomical characteristics and biochemical or metabolic activity of the tissue, which vary with aging or diseases. Furthermore, the differentiation degree between various types or pathological stages of biological tissues (healthy, inflammatory, cancerous, atheromatous,...) can be increased through the complementarity of autofluorescence and light scattered spectra collected in bimodal reflectance spectroscopy [2] [3].

The fact that fresh and cryopreserved arterial segments are characterized by differences in terms of cellular viability [4] [5] and structure [6] result in modifications of the bio-optical responses of the vascular tissue [7] [8] (absorption, diffusion, fluorescence). Thus, by identifying some correlation existing between the optical properties of arterial tissues and their state or level of mechanical constraints or strains, new *in vitro* and *in vivo* contactless and atraumatic methods of characterization of these mechanical properties can be considered. Among the various types of *in vivo* and *in vitro* systems (uniaxial, biaxial...) developed to study the bio-mechanical behavior of vascular tissues [7] [9] [10], *in vitro* tests on rings or segments are classical and simple to implement. They provide the acquisition of complete data under “controlled” environment.

The aim of our work was to study the variations of optical properties (absorption, scattering, and fluorescence) of fresh and post-cryopreserved artery rings (pig common carotid) with reference to mechanical strains applied to them (under uniaxial elongation). Preliminary results already published by our group have confirmed the existence of differences between arteries before and after cryopreservation, in their rheological behaviour [4] [11] and in their optical (spectral) behaviour using fluorescence spectroscopy [11] or elastic scattering spectroscopy [12]. This paper presents final and original results of our works concerning first the characterization of different biomechanical states of these artery rings (fresh / post-cryopreserved, various circumferential deformations) using diffuse reflectance and autofluorescence spectral data, and second the variations of the absorption (“pure” absorption and absorption for fluorescence), scattering and anisotropy coefficients of the artery wall with its mechanical deformation using Monte Carlo simulation of steady-state light transport

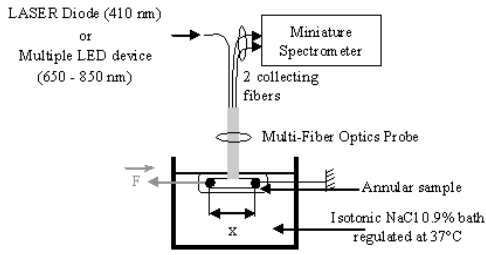


Fig. 1. Schematic representation of the experimental set-up configuration. x is the length applied to elongate the vascular ring in the direction of \vec{F} , the force measured. Monochromatic (LASER) and wide wavelength band (LED) light excitations are consecutively injected throughout the excitation fiber. The backscattered intensity spectra are measured from the two collecting fibers corresponding to two distances between excitation and emission fibers at distal tip of the probe (0.53 and 1.74 mm).

and fluorescence within a multi-layer model over the wavelength band [470-850 nm].

II. MATERIALS AND METHODS

A. Experimental system and calibrations

The experimental set-up is based on an apparatus already described in detail in [11] [12]. Briefly, it consists of a mechanical test bench to which two fibered spectroscopic measurement systems were added (Fig. 1): an AutoFluorescence Spectroscopy (AFS), which provides the autofluorescence intensity spectra of tissues excited at $410 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ FWHM (Full Width at Half Maximum) and an Elastic Scattering Spectroscopy (ESS), which can record diffuse reflectance spectra in the visible-to-NIR (Near InfraRed) wavelength band. The multiple fiber optic probe configuration enable the acquisition of backscattered intensity spectra from two collecting fibers corresponding to two distances between excitation (illumination) and emission (collecting) fibers at distal end of the probe (0.53 mm and 1.74 mm, called respectively channel 1 and channel 2) [13] [14] [15].

Step-by-step elongation was performed by micrometric displacements (resolution: 0.02 mm) applied in the direction of the circumferential traction strength measured \vec{F} as sketched in Fig. 1. Before starting an experiment, the system was calibrated in force using an extension stainless steel spring (average diameter: 5.5 mm, wire section: 0.5 mm and 78.25 reels). The fibered spectrofluorimeter calibration required a light power adjustment using a power meter (841PE, power sensor UV 818-UV, Newport). To account for the wavelength dependence of the light source, the fiber spectral transmission and the spectrometer response, a reference measurement of reflectance from a spectrally flat reflectance standard (spectralon[®]) was regularly performed [1]. Optical resolution of the acquisition system was 8 nm. The calibration procedure was reiterated for each new sample.

B. Biological materials and protocol of tests

Segments of common carotid arteries were post-mortem surgically dissected from four young pigs (20 to 30 kg, 4 to 6 months old). All animals received human care in

compliance with the European legislation for animal care. These segments were temporarily stored at 4C in culture medium M199 supplemented with antibiotics (penicillin, streptomycin) and fungicide (fungizone) until *in vitro* tests started.

Overall, four pig carotid arteries of about 40-50 mm uniform length were exploited and cut in thirty two rings of about 4 mm length. Half of rings of each fresh artery segment were systematically tested within two days following surgery. The other half of fresh, not-tested artery, were directly cryopreserved for one month. The freezing medium was copied from the protocol of tissue banks [5] and cryopreservation was performed following a classical step-by-step temperature descent protocol down to -150C in nitrogenize liquid.

The *in vivo* length, external diameter and thickness of each segment of artery were systematically measured before testing, as described in [11]. Each ring has a 4 mm length so as to provide an appropriate contact area with the fiber probe (2 mm diameter). Before mechanical tests began, each sample was pre-conditioned to an elongation of 10% initial length during five minutes on the test bench. At each elongation step applied to an arterial ring under test conditions, the sample was able to relax for constraints during one minute before proceeding to the force measurement. Circumferential strains ($\varepsilon_{\theta\theta}$) were applied to the samples from 0% to 60% by steps of 10%, from reference unloaded state. Corresponding forces \vec{F} are measured for stress calculations.

C. Mechanical model and parameter calculation

The tested rings were considered as uniform, circular, cylindrical and incompressible thin-walled short tubes. The carotid artery wall was also assumed to behave as an anisotropic, orthotropic, non-linear elastic continuum and homogeneous material. A theory of large elastic deformations was used [16] [17]. Considering a model of annular sample under uniaxial traction [18], circumferential stress $\sigma_{\theta\theta}$ (N/m²) and strain $\varepsilon_{\theta\theta}$ can be given by relations (1).

$$\sigma_{\theta\theta} = \frac{F}{2.L.h} \approx \frac{F.x}{V} \quad \text{and} \quad \varepsilon_{\theta\theta} = \ln\left(\frac{x}{x_0}\right) \quad (1)$$

where x_0 and x (mm) are the transverse lengths of the ring in the initial state and under imposed strain respectively, F is the measured traction strength (N) and $V \cong 2.L.h.x$ is the total arterial ring volume, with L and h (mm) respectively the axial length and the thickness of the artery wall of the annular sample under test. Arterial ring ends in contact of the gripping hooks are not considered in stress calculation because they undergo additional local stresses [19].

As the ratio of stress to strain is nonlinear, the incremental elastic modulus E_{inc} , given by (2), was also determined [6].

$$E_{inc} = \frac{\Delta\sigma_{\theta\theta}}{\Delta\varepsilon_{\theta\theta}} \quad (2)$$

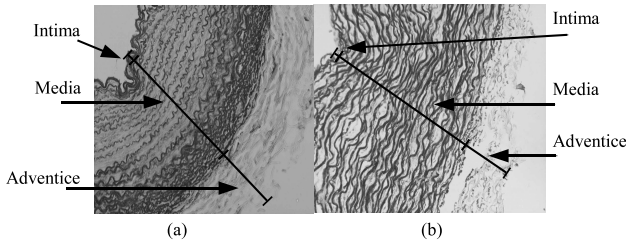


Fig. 2. Images of histological slices of (a) fresh and (b) cryopreserved artery rings (transmission microscopy, Growth X10).

D. Spectroscopic data pre-processing

Three data processing steps were applied to raw autofluorescence and back-scattered light spectra. For every measurement (at each elongation), five raw spectra were automatically acquired at the same point for both autofluorescence and diffuse reflectance and averaged in order to improve the signal to noise ratio.

Then, a polynomial smoothing filter (Savitzky-Golay algorithm) [20] [21] was applied to the autofluorescence spectra to further reduce high frequency noises. For autofluorescence, a standardization was required for proper shape comparison between the various spectral curves [22]. We choose a standard normalization with reference to the area under the curve, which, in our case, reduces the area under the curve between 470 and 810 nm to unity such as:

$$I_{norm}(\lambda_i) = I(\lambda_i)/b \quad \text{with} \quad b = \Delta\lambda \sum_{i=1}^N I(\lambda_i) \quad (3)$$

where $I(\lambda_i)$ and $I_{norm}(\lambda_i)$ denote respectively the measured and normalized autofluorescence light intensities at wavelength λ_i , N is the total number of curve points (number of sampled wavelength values) and $\Delta\lambda$ is the fixed wavelength's sampling step (0.5 nm).

For elastic scattering measurements, spectral response correction and amplitude standardization are intrinsically taken into account in the diffuse reflectance calculation defined as [1]:

$$R(\lambda) = \frac{S_{tissue}(\lambda) - S_{tissue\ background}(\lambda)}{S_{ref}(\lambda) - S_{ref\ background}(\lambda)} \quad (4)$$

where S_{tissue} , $S_{tissue\ background}$, S_{ref} and $S_{ref\ background}$ correspond to mean filtered spectra measured respectively on tissue with light excitation switched on and off (background measure including ambient light and detector dark current) and on spectralon[®] reference (spectrally flat response) with light excitation switched on and off.

E. Histological analysis

Fig. 2 shows an exemple of typical transverse histological cuts of fresh and cryopreserved artery rings, imaged using a transmission microscope. A Weigert staining was carried out to reveal collagen and elastin fibers.

In the unloaded fresh sample, the media's fibrous network looks continuous with sinuous fibers. Indeed, on the image of the unloaded cryopreserved sample, the fibrous network seem more slackened and less folded up, showing an extracellular matrix looser and less dense than in the fresh sample. These data are in agreement with histological results of studies already published on cryopreserved arteries [23]. We observe a radial distribution of fiber network, which is less homogeneous for the fresh rings (highest density outwards from the media) than for the cryopreserved ones (radial distribution homogeneous in the media).

These purely morpho-histological observations already let us predict of possible differences in optical behavior between fresh and post-cryopreserved samples.

F. Optical model, parameters and numerical simulation

We developed a simulation program (Monte Carlo) of spatially resolved steady-state light transport (absorption and multiple diffusion) based on MCML code [24] and from [25] adapted to our specific experimental configuration (described in [26]), to which multiple fluorescence was added. Briefly, we used a three-layer model of artery wall (adventice, media and intima), each layer being described by thickness, absorption coefficient $\mu_a(\lambda)$, scattering coefficient $\mu_s(\lambda)$, refractive index n , and optical anisotropy factor $g(\lambda)$. g is defined as the mean cosine of the rediffusion angle in the optical phase function. The Henyey-Greenstein phase function expression was implemented in our simulation program. With help of the initial mean thickness and total volume of each artery ring measured before spectroscopic tests start (see section II-B), we calculated the total thickness h_t of the wall at each different circumferential strain applied, considering the incompressibility of the samples at these strains i.e. constant volume (see section II-C). These different thickness values varying with circumferential strains were used in our simulation model. In this three-layered model, we considered that the thickness of each layer was a constant proportion of the total thickness (whatever the strain). Based on histological observations, we choose 45%, 50% and 5% of h_t for the adventice, the media and the intima respectively.

As we previously noticed in [26], the simulated elastic scattering spectra are not properly correlated with experimental results if we use the few values of optical coefficients for arteries available in the literature [27] [28]. Therefore, we calculated optimized values for the optical parameters $\mu_a^A(\lambda)$, $\mu_a^M(\lambda)$, $\mu_a^I(\lambda)$, $\mu_s^A(\lambda)$, $\mu_s^M(\lambda)$, $\mu_s^I(\lambda)$ and $g^A(\lambda)$, $g^M(\lambda)$ and $g^I(\lambda)$ of the three layers Adventice (A), Media (M), and Intima (I).

We decided to keep the numerical values of $n(\lambda)$ constant for all layers as found in the literature [27] [28]. The simulation was performed wavelength-by-wavelength by increasing values from 470 to 850 nm with a wavelength step of 10 nm. All simulated spectra and optical parameters were then defined as vectors of $N = 21$ values. We then searched values of the optical parameters for every wavelength between 470 and 850 nm (10 nm step), which minimize the cost function hereafter (equation 5).

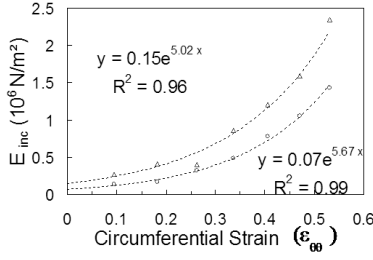


Fig. 3. Mean Incremental Elastic Modulus E_{inc} as a function of circumferential strain $\varepsilon_{\theta\theta}$ for fresh (circles) and cryopreserved samples (triangles) (significant difference between fresh and cryopreserved sample curves: $p < 0.05$). Dotted curves represent the exponential approximations of both experimental data sets, with R^2 their respective coefficient of determination.

$$Error(p) = \sum_{i=1}^N |y_{exp}(\lambda) - y_{sim}(\lambda; p)| \quad (5)$$

with $y_{exp}(\lambda)$ the diffuse reflectance or autofluorescence intensity spectra acquired experimentally, $y_{sim}(\lambda; p)$ the diffuse reflectance or autofluorescence intensity spectra obtained from numerical simulation with $p = [\mu_a^A, \mu_a^M, \mu_a^I, \mu_s^A, \mu_s^M, \mu_s^I, g^A, g^M, g^I]^T$ the parameter vector to optimize. $Error(p)$ was minimized using a simplex optimization algorithm.

In order to quantify the difference between experimental and corresponding simulated spectra, we calculated the mean of normalized differences as follows:

$$Error_{mean} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{y_{exp}(\lambda_i) - y_{sim}(\lambda_i)}{y_{exp}(\lambda_i)} \right| \quad (6)$$

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Mechanical results

The mean incremental elastic modulus curves shown in Fig. 3 are significantly different between fresh and cryopreserved vascular rings ($p < 0.05$, Student T-test). We can notice that the mean incremental elastic modulus of post-cryopreserved samples is higher than the one of fresh samples. Other studies show similar significant differences in the behavior laws between fresh and post-cryopreserved arterial tissues [4].

However, some studies performed on arterial segments instead of rings founded values of circumferential stress and incremental elastic modulus to be higher for fresh arteries than for cyopreserved ones [29]. This apparent contradiction may be explained by the difference between these two types of tests (3D vs circumferential uniaxial). It has been observed that the values of stresses are higher, at identical strain, for tests on rings than for tests on arterial segments. Our results here obtained for the rings ($\sigma_{\theta\theta} = 0.15 \times 10^6 \text{ N/m}^2$ for $\varepsilon_{\theta\theta} \approx 0.3$) are of the same order of magnitude when compared to other published ones [18].

A two-way ANalysis Of the VAriance (ANOVA) with repeated measures revealed that the values of incremental elastic modulus are significantly different between fresh and

cryopreserved samples (all strains together), and between strains applied (whatever fresh or cryopreserved samples) since for this set of measurements, the values of F_{calc} (10.1, 38.7) were significantly superior to the critical values F_{crit} (3.9, 2.1), with a significance threshold of 5%. That is, deformations lead to significant differences in mechanical parameters measured, like cryopreservation does as well, but deformations and cryopreservation do not interact together ($F_{calc} = 0.1$, $F_{crit} = 2.1$). These results are listed in Table I.

B. Spectroscopic experimentation and simulation results

1) *Autofluorescence results:* Each autofluorescence intensity spectrum was normalized to its area under the curve between 470 and 810 nm. Figure 4(a) shows an example of such standardized spectra of fresh and cryopreserved samples obtained for a same deformation of $\varepsilon_{\theta\theta} = 30\%$. We may observe that the fresh sample curve has a higher amplitude than the cryopreserved sample one in the range 500-600 nm. Similar observation is made for all samples. Therefore, as shown in Fig. 4(a), we defined specific areas under the curve corresponding to sums of the intensities between 500 and 600 nm for fresh (A) and cryopreserved (C) spectra and between 600 and 810 nm respectively (B, D).

Then, autofluorescence spectrum area ratios $R_{fresh} = A/B$ and $R_{cryo} = C/D$ were calculated accordingly for each elongation leading to the graphs in Fig. 4(b). The variation of R_{fresh} and R_{cryo} as a function of circumferential strains $\varepsilon_{\theta\theta}$ tends to be linear with linear regression coefficients of 0.88 and 0.82 respectively for R_{fresh} and R_{cryo} .

A two-way ANOVA with repeated measures (see Table I) confirmed that the surface ratio values are significantly different ($F_{calc} \gg F_{crit}$ with $p < 0.05$) between fresh and cryopreserved samples (all strains together), and between strains applied (whatever fresh or cryopreserved samples). That is, deformations lead to significant differences in autofluorescence signals measured, like cryopreservation does as well, but deformations and cryopreservation do not interact together ($F_{calc} = 0.3$, $F_{crit} = 2.1$). Thereby, whatever the strain, a fresh arterial ring can be differentiated from a post-cryopreserved one based on autofluorescence spectra measurements at 410 nm excitation and using wavelength band ratio calculation as proposed.

For fluorescence simulation, the optical properties of pure absorption and diffusion in the medium used at the excitation wavelength (410 nm) were extrapolated from the very few number of μ_a , μ_s and g values for intima, media and adventice found in the literature (values at $\lambda = 476, 580, 600, 633 \text{ nm}$) [27] [28]. The following values were then implemented: $\mu_a(410) = 31/14/30 \text{ cm}^{-1}$ (A/M/I), $\mu_s(410) = 297/530/315 \text{ cm}^{-1}$ (A/M/I) and $g(410) = 0.71/0.89/0.79$ (A/M/I). The autofluorescence emission spectrum taken into account in our fluorescence simulation program was discretized from the spectral emission

TABLE I

TWO-WAY ANOVA STATISTICAL TEST PERFORMED WITH MECHANICAL DATA (INCREMENTAL ELASTIC MODULUS), AUTOFLUORESCENCE DATA (SURFACE RATIO), AND DIFFUSE REFLECTANCE DATA FROM CHANNELS 1 AND 2. INDEPENDANT VARIABLES (OR FACTORS) ARE THE FRESH/CRYOPRESERVED TYPES OF ARTERIES (2 LEVELS) AND THE STRAINS (7 LEVELS). ALL THE GROUPS HAVE THE SAME SAMPLE SIZE ($n = 16$). F_{calc} AND F_{crit} ARE RESPECTIVELY THE CALCULATED AND CRITICAL VALUES OF THE F_{ratio} .

	Mechanical data		Autofluorescence data		Diffuse reflectance data			
	F_{calc}	F_{crit}	F_{calc}	F_{crit}	Channel 1		Channel 2	
Sources of variations					F_{calc}	F_{crit}	F_{calc}	F_{crit}
Fresh / Cryopreserved	10.1 *	3.9	174 *	3.9	7.9 *	3.9	4.1 *	3.9
Strains	38.7 *	2.1	5.9 *	2.1	2.8 *	2.1	1.1	2.1
Interaction	0.1	2.1	0.3	2.1	0.2	2.1	0.5	2.1

* indicates that the difference between the data groups is statistically significant, for a significance threshold $p < 0.05$.

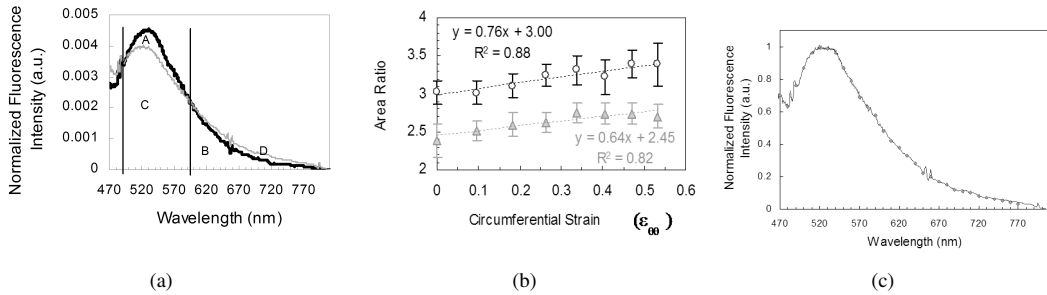


Fig. 4. 4(a) Example of autofluorescence intensity spectra normalized to the area under the curve (480-810 nm), for a 30% strain. The black and gray lines correspond respectively to the fresh and cryopreserved samples. A, B, C and D denote the areas under the spectral curves of the fresh artery rings between 500 and 600 nm (A) and between 600 and 810 nm (B), and of the cryopreserved ones between 500 and 600 nm (C) and between 600 and 810 nm (D). 4(b) Mean autofluorescence spectra area ratios for all the fresh samples A/B (black circles) and the cryopreserved ones C/D (gray triangles). 4(c) Example of experimental autofluorescence intensity spectra (full line) and corresponding simulated spectra (squares) of a fresh sample ($Error_{mean} = 3\%$).

curve previously measured on same artery samples under confocal microscopy and biphotonic excitation at 820 nm (see [11]). According to these measurements, the raised spectra of autofluorescence correspond mainly to the compound fluorescence of elastin and collagen networks in the media. Figure 4(c) shows the very good correlation between simulated and experimental spectra (mean normalized error less than 3%).

First, simulations were started with values of quantum yield and absorption coefficient for fluorescence μ_{af} (proportional to molar extinction and molecular concentration) adapted from the literature. We performed simulations at the 410 nm excitation wavelength with identical μ_{af} for all layers and searched for the values of μ_a , μ_s and g in the wavelength band of emission [470-770 nm] that give the best fit to the experimental curve of autofluorescence intensity for fresh arteries at 0% strain. Then, we varied μ_{af} in each layer (independently) in a wide range of values (typically [1-100] cm^{-1}) and as a result, we observed that the simulated autofluorescence intensity spectra vary in amplitude as a whole. Ratios given in Fig. 4 highlight the fact that these spectra (normalized spectra) are modified in shape when strains increase, with increasing amplitude in the lower wavelength band (500-600 nm) and decreasing amplitude in the higher one (600-810 nm). Varying μ_{af} allowed us to change the amplitude of the whole spectrum but not to deform it in such a way. Consequently, we decided to keep fixed values of μ_{af} and by optimization we found values of

the optical parameters (absorption, diffusion, anisotropy) of the medium in the wavelength band of emission allowing us to obtain proper shape variations of the autofluorescence spectra as a function of strains.

2) *Diffuse reflectance results:* Mean diffuse reflectance spectrum for fresh and cryopreserved artery rings are given in Fig.5(a).

Fig. 5(b) represents an example of measured and simulated diffuse reflectance spectra collected at inter-fibre distances of 0.53 mm (channel 1) and 1.74 mm (channel 2) and for three different strains applied to a cryopreserved sample. These results show spectra globally decreasing in light intensity as strain rises.

As indicated in Table I, a two-way ANOVA with repeated measures revealed that the values of ratio calculated from the channel 1 diffuse reflectance spectrum are significantly different ($p < 0.05$) between fresh and post-cryopreserved samples (all strains together), and between strains applied (whatever fresh or cryopreserved samples). For channel 2, these differences are much less or not significant indicating that, at the longest inter-fibre distance tested in our configuration, the diffuse reflectance ratio does not allow to differentiate between strains. This may be due to the low intensity level of the signal acquired. That is, deformations lead to significant differences in diffuse reflectance signals measured at the shortest inter-fibre distance (channel 1), like cryopreservation does as well, but deformations and cryopreservation do not interact together ($F_{calc} = 0.2$,

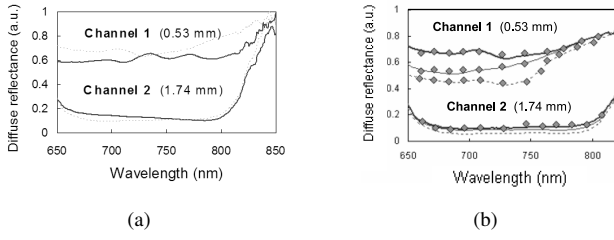


Fig. 5. 5(a) Mean diffuse reflectance spectrum acquired at 0% strain for fresh (full black line) and cryopreserved artery rings (gray dotted line), 5(b) Example of experimental diffuse reflectance spectrum (full line) and its corresponding simulated spectrum (points) for a cryopreserved sample, at two distances between emission and reception fibers (respectively 0.53 and 1.74 mm distances), at 3 different strains: 0% (full line), 30% (fine line) and 60% (dotted line).

$F_{crit} = 2.1$).

Both autofluorescence and elastic scattering spectroscopies gave intensity spectra with overall higher amplitude for the cryopreserved samples than for the fresh ones. It can correspond to either a decrease in light absorption and/or a more efficient light diffusion and fluorescence. These observations are to be related to the fact that cryopreservation affects the histological organization of the arterial wall (Fig. 2).

The spectral amplitude variations observed as a function of the level of deformation (increase of auto-fluorescence intensity and decrease of diffuse reflectance) can find an explanation in the fact that the samples in traction become increasingly thin as the deformation increases. The transmission of the light throughout the tissue thickness would be some thus increased, with the detriment of the back-scattered intensity collected. As the artery ring wall gets thinner under elongation, fluorescent compounds may potentially be excited with more energy, and the fluorescence emission intensity in the visible wavelength band (500-600 nm) reaching the surface may also be increased.

Finally, we observed significant variations in autofluorescence and diffuse reflectance spectra with reference to circumferential strains between 0% and 60%. Because these strains lead to structural reorganization of the arterial tissue and to decreasing of the artery wall volume probed by our fibered spectroscopic tools, it is of interest to investigate how the optical parameters of the tissue (μ_a , μ_s , and g) may consequently vary.

3) *Optical parameters:* In order to better understand the way optical properties differ between fresh and post-cryopreserved artery ring samples and between various levels of deformation, we calculated optimized values for the optical coefficients $\mu_a(\lambda)$, $\mu_s(\lambda)$ and $g(\lambda)$ in each of the three layers of the simulation model.

Bar graphs in Fig. 6 summarize the variations of absorption coefficient μ_a , scattering coefficient μ_s , and anisotropy factor

g of the adventice (A), the media (M), and the intima (I), for fresh (F) and post-cryopreserved (C) samples with reference to three circumferential strains (0%, 26%, and 47%) and for three wavelengths: $\lambda = 700, 740, 780$ nm. From the mechanical tests, the mean values (\pm SD) calculated for the wall thickness at 0, 0.26 and 0.47 strains were respectively of 0.5 (0.08), 0.19 (0.05), and 0.05 (0.006) mm for the fresh artery rings and of 0.69 (0.15), 0.34 (0.1), and 0.11 (0.03) mm for the post-cryopreserved artery rings.

Overall values of μ_a are found between 1 and 5.6 cm^{-1} while μ_s vary from about 130 (lower values for intima) up to 690 cm^{-1} (higher values for adventice) and g values from 0.8 up to 0.98.

At 700 and 740 nm, μ_a globally increases with the circumferential strain $\varepsilon_{\theta\theta}$. μ_a values of fresh samples are slightly higher than the ones of cryopreserved samples.

At 700, 740 and 780 nm, μ_s in adventice stay mainly at the same order of magnitude whatever $\varepsilon_{\theta\theta}$, while μ_s in media and intima vary more (decreasing with $\varepsilon_{\theta\theta}$ increasing).

Values obtained for g are systematically higher in media and intima than in adventice. These results led to values of $\mu_{s'}$ between 41 and 131 cm^{-1} for the adventice, between 9 and 55 cm^{-1} for the media and between 1 and 79 cm^{-1} for the intima. Significantly higher values of $\mu_{s'}$ are found for the adventice compared to media and intima. They stay in the same order of magnitude whatever the type of sample (fresh or cryopreserved) and there is no clear tendency of their variations as a function of strains.

These results suggest that on average, the media and the adventice are respectively less and more absorbing for post-cryopreserved artery rings, regardless the wavelength, and it is the opposite for the fresh artery for $\lambda = 700, 740$ nm. Overall, we may notice that the values of absorption and diffusion coefficients are slightly higher for the fresh arteries than for the post-cryopreserved arteries, whatever the wavelengths and strains applied.

At our knowledge, there is up to now only few optical parameter values available from the literature for arterial tissues. [27] and [28] published the values of absorption, diffusion and anisotropy coefficient for adventice, media and intima layers of arteries for wavelengths of 476, 580, 600, 633 and 1024 nm. The optical parameter values found in the present study are in good agreement with their values at 633 nm ($\mu_a = 5.8/2.3/3.6 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 195/310/171 \text{ cm}^{-1}$ and $g = 0.81/0.9/0.85$ for adventice/media/intima layers respectively) and at 1024 nm ($\mu_a = 2/1/2.3 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 484/634/165 \text{ cm}^{-1}$ and $g = 0.97/0.96/0.97$ for adventice/media/intima layers respectively).

We observed on Fig. 5 that diffuse reflectance decreases with increasing strains which implies a globally lowered transport of light i.e. an increase of the optical coefficients combining absorption and diffusion (see Fig. 6), for both fresh and post-cryopreserved rings. The global stretch-induced increases in optical properties of tissue observed may be twofold. Firstly,

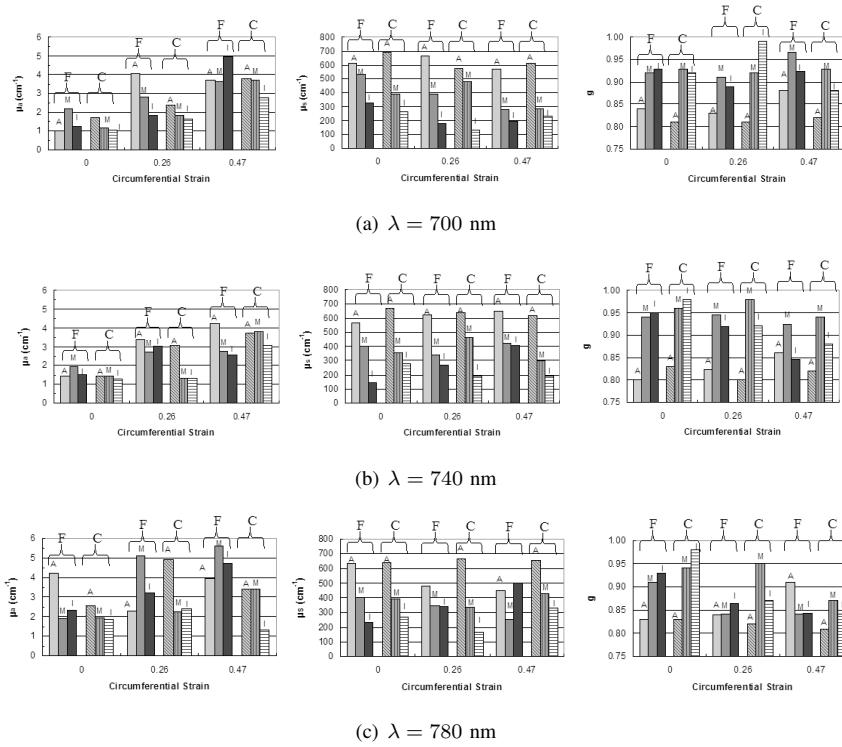


Fig. 6. Values of absorption coefficient μ_a (left column), diffusion coefficient μ_s (center column) and anisotropy factor g (right column) for the adventice (A), the media (M), and the intima (I) with reference to three circumferential strains $\varepsilon_{\theta\theta}$ (0, 0.26 and 0.47) for fresh (F) and post-cryopreserved (C) samples, at three different wavelengths (top to bottom rows): 6(a) $\lambda = 700$ nm, 6(b) $\lambda = 740$ nm, 6(c) $\lambda = 780$ nm.

when the artery ring is stretched, the structural organization of the tissue changes (in particular the conformation of the extra-cellular matrix made of elastic and collagenic fibers) as well as, for instance, the shape of the smooth muscular cells... Consequently, the intrinsic absorbing and diffusing properties of the medium are probably modified. This is also a consideration to have in the case of post-cryopreserved arteries to which structural alterations are associated. Furthermore, our results confirm that diffusion is dominant in arterial tissues (in agreement with other studies) and then, it contributes also significantly to the decrease of the back-scattered intensity measured. Secondly, it is also possible that the amount of light transmitted throughout the artery wall increases with the thickness decrease as strains rise leading to a decrease in the amount of back-scattered light which may also be interpreted as an increase in μ_a/μ_s . The only way to confirm that would be to measure the transmitted light which necessitates a more complex experimental configuration. Therefore, when the artery ring is stretched, it is quite difficult to relate the variations of the optical properties (absorption and diffusion) directly or only to chromophore densities (which would be the case if the medium would only change in volume but not in internal configuration) because these optical properties depend also on the anisotropic or inhomogeneous tissular “remodelling” process happening with the stretching. In the case of arteries, common uniaxial traction tests on rings give rapid and simple access to a rheological characterization with limited instrumentation. In this configuration, the wall thickness variations of the ring under test can not be measured

but is calculated with reference to the circumferential lengthening of the tissue. As confirmed in our study, the artery wall thickness is one of the few parameters that influence the magnitudes of both fluorescence and diffuse reflectance signals. Therefore, other complementary spectroscopic studies should be performed on artery samples under mechanical constraints in configurations where the thickness can be experimentally measured.

IV. CONCLUSION

This study allowed us to obtain coupled results between rheological and optical (absorption, scattering, and fluorescence) properties of artery rings before and after cryopreservation, and at different levels of circumferential strains. We showed that the autofluorescence intensity spectra may be used to statistically differentiate between fresh and cryopreserved states of artery samples. Diffuse reflectance spectroscopy gave intensity spectra with overall higher amplitude for the cryopreserved samples than for the fresh ones. These observations are to be related to the histological modifications affecting the arterial wall of post-cryopreserved samples. We also observed significant spectral amplitude variations (increasing autofluorescence intensity and decreasing diffuse reflectance) as a function of the deformation applied to the artery wall (circumferential strains between 0% and 60%).

Using Monte Carlo simulation, we were able to identify values of absorption, diffusion and anisotropy coefficients and

their variations as a function of state (fresh and cryopreserved), strains (0, 30%, 60%) and wavelengths (700, 740, 780 nm). Overall, absorption and diffusion coefficients are slightly more important, whatever the wavelengths and strains applied, for the fresh artery than for the post-cryopreserved artery. Furthermore, the shape variations observed in the autofluorescence spectra due to strains were related to the modifications of the optical properties of the medium in the wavelength band of emission rather than to the changes in fluorescence absorption at excitation wavelength.

As implemented here, autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopies may potentially be considered as simple complementary tools for tests of integrity or contactless characterization of the mechanical state of blood vessel tissues. Applications may concern for instance the pre- and per-operative evaluation of the mechanical compatibility between allograft and in situ arteries.

Finally, works are in progress to apply this approach to cutaneous tissues characterization with special interest in skin cancer diagnosis.

ACKNOWLEDGMENT

The Authors express their grateful thanks to the Region Lorraine and the french "Ligue Rgionale de Lutte Contre le Cancer (Comits Dpartementaux 54 et 52)" for their financial support, and the staff of the laboratory of experimental surgery (Faculty of medicine, Nancy) for helping in artery tackings.

REFERENCES

- [1] O. A'Amar and I. Bigio, "Spectroscopy for the Assessment of Melanomas," in *Reviews in Fluorescence 2006*, vol. 3. Springer, New York, 2006, pp. 359–386.
- [2] I. Bigio and J. Mourant, "Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy," *Phys. Med. Biol.*, vol. 42, pp. 803–814, 1997.
- [3] I. Georgakoudi, B. Jacobson, J. V. Dam, V. Backman, M. Wallace, M. Muller, Q. Zhang, K. Badizadegan, D. Sun, G. Thomas, L. Perelman, and M. Feld, "Fluorescence, reflectance, and light-scattering spectroscopy for evaluating dysplasia in patients with Barrett's Esophagus," *Gastroenterology*, vol. 120, pp. 1620–1629, 2001.
- [4] W. Blondel, B. Lehalle, G. Maurice, X. Wang, and J. Stoltz, "Rheological properties of fresh and cryopreserved human arteries tested *in vitro*," *Rheol. Acta*, vol. 39, pp. 461–468, 2000.
- [5] E. Rosset, A. Friggi, G. Novakovitch, P. Rolland, R. Rieu, J. Pellissier, P. Magnan, and A. Branchereau, "Effets de la cryoconservation sur les propriets viscolastiques des artres humaines," *Ann. Vasc. Surg.*, vol. 10, pp. 262–272, 1996.
- [6] P. Dobrin, "Mechanical properties of arteries," *Physiol. Rev.*, vol. 58, no. 2, pp. 397–460, 1978.
- [7] I. Cilesiz and A. Welch, "Optical properties of human aorta: are they affected by cryopreservation?" *Lasers Surg. Med.*, vol. 14, pp. 396–402, 1994.
- [8] N. Ramanujam, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: R.A. Meyers, 2000, ch. Fluorescence Spectroscopy In Vivo, pp. 20–56.
- [9] G. Filippidis, G. Zacharakis, A. Katsamouris, A. Giannoukas, and T. Papazoglou, "Single and double wavelength excitation of laser-induced fluorescence of normal and atherosclerotic peripheral vascular tissue," *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 56, pp. 163–171, 2000.
- [10] M. Wallace, L. Perelman, V. Backman, J. Crawford, M. Fitzmaurice, M. Seiler, K. Badizadegan, S. Shields, I. Itzkan, R. Dasari, J. V. Dam, and M. Feld, "Endoscopic detection of dysplasia in patients with Barrett's esophagus using light-scattering spectroscopy," *Gastroenterology*, vol. 119, no. 3, pp. 677–682, 2000.
- [11] C. Choserot, E. Pry, J. Goebel, D. Dumas, J. Didelon, J. Stoltz, and W. Blondel, "Experimental comparison between autofluorescence spectra of constrained fresh and cryopreserved arteries," *Clin. Hemorheol. Micro.*, vol. 33, pp. 235–242, 2005.
- [12] E. Pry, W. Blondel, J. Goebel, J. Didelon, and F. Guillemain, "Spectral (optical) and mechanical responses of fresh and cryopreserved issued arteries," in *Proceedings of SPIE*, vol. 5695, 2005, pp. 66–74.
- [13] T. Papaioannou, N. Preyer, Q. Fang, A. Brightwell, M. Carnohan, G. Cottone, R. Ross, L. Jones, and L. Marcu, "Effects of Fiber-Optic Probe Design and Probe-to-Target Distance on Diffuse Reflectance Measurements of Turbid Media: An Experimental and Computational Study at 337 nm," *Applied Optics*, vol. 43, no. 14, pp. 2846–2860, 2004.
- [14] T. Pfefer, L. Matchette, and R. Drezek, "Influence of illumination-collection geometry on fluorescence spectroscopy in multilayer tissue," *Journal Medical and Biological Engineering and Computing*, vol. 42, no. 5, pp. 669–673, 2004.
- [15] U. Utzinger and R. Richards-Kortum, "Fiber optic probes for biomedical optical spectroscopy," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 8, no. 1, pp. 121–147, 2003.
- [16] H. Demiray, "Large deformation analysis of some soft biological tissues," *J. Biomech. Eng.*, vol. 103, pp. 73–78, 1981.
- [17] Y. Fung, *Biomechanics - Mechanical properties of living tissues*, 2nd ed. Springer-Verlag, 1993.
- [18] R. Cox, "Comparison of arterial wall mechanics using ring and cylindrical segments," *Am. J. Physiol.*, vol. 244, pp. H298–H303, 1983.
- [19] R. Shadwick, *Biomechanics, Structures and Systems: A Practical Approach*. A.A. Biewener, 1992, ch. Circulatory structure and mechanisms, pp. 233–261.
- [20] A. Christy, S. Kasemsumran, Y. Du, and Y. Ozaki, "The detection and quantification of adulteration in olive oil by near-infrared spectroscopy and chemometrics," *Anal. Sci.*, vol. 20, no. 6, pp. 935–940, 2004.
- [21] G. Viv-Truyols and P. Schoenmakers, "Automatic selection of optimal savitzky-golay smoothing," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 13, pp. 4598–4608, 2006.
- [22] T. Tsai, H. Chen, C. Wang, J. Tsai, C. Chen, and C. Chiang, "In vivo autofluorescence spectroscopy of oral premalignant and malignant lesions: distortion of fluorescence intensity by submucous fibrosis," *Lasers Surg. Med.*, vol. 33, pp. 40–47, 2003.
- [23] Y. Louagie, "Viability of long-term cryopreserved human saphenous veins," *J. Cardiovasc. Surg.*, vol. 31, pp. 92–100, 1990.
- [24] L. Wang, S. Jacques, and L. Zheng, "MCML - Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 47, pp. 131–146, 1995.
- [25] Q. Liu, C. Zhu, and N. Ramanujam, "Experimental validation of Monte Carlo modeling of fluorescence in tissues in the UV-visible spectrum," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 8, no. 2, pp. 223–236, 2003.
- [26] E. Pry, W. Blondel, C. Thomas, J. Didelon, and F. Guillemain, "Diffuse Reflectance Spectroscopy Monte-Carlo Modeling: elongated arterial tissues optical properties," in *IFAC Modelling and Control in Biomedical Systems (MCBMS'06)*, 2006, pp. 41–46.
- [27] W. Cheong, S. Prahl, and A. Welch, "A review of the optical properties of biological tissues," *IEEE J. Quantum Elect.*, vol. 26, no. 12, pp. 2166–2185, 1990.
- [28] G. Muller and A. Roggan, "Laser-Induced Interstitial Thermotherapy," P. of SPIE, Ed., vol. PM 25, Bellingham, WA, 1995.
- [29] W. Blondel, J. Didelon, G. Maurice, X. Wang, and J. Stoltz, "Investigation of 3D Mechanical Properties Of Blood Vessels using A New In Vitro Tests System. Results On Sheep Common Carotid Arteries," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 48, pp. 442–451, 2001.

III.3 Journal of Biomedical Optics, 2008, accepté pour publication

Classification of ultra-violet irradiated mouse skin histological stages by bimodal spectroscopy (multiple excitation autofluorescence and diffuse reflectance)

Marine Amouroux

Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), Nancy-University.

Gilberto Díaz-Ayil

Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), Nancy-University

Walter CPM. Blondel*

PhD, Centre de Recherche en Automatique de Nancy
CRAN UMR 7039 CNRS-Nancy University
2 avenue de la Forêt de Haye
54516 Vandoeuvre-les-Nancy, France.
E-mail: walter.blondel@ensem.inpl-nancy.fr

Geneviève Bourg-Heckly

PhD, Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Cellulaire et Tissulaire
BioMoCeTi UMR 7033 CNRS-Université Pierre et Marie Curie Paris 6

Agnès Leroux

M.D., Alexis Vautrin Cancer Center, Head of the Department of Pathology

François Guillemin

M.D. PhD, Head of the Alexis Vautrin Cancer Center, CRAN, Nancy-University.

Abstract

Histo-pathological analysis and *in vivo* optical spectroscopy were used to discriminate several histological stages of UV-irradiated mouse skin. At different times throughout the 30-week irradiation, Autofluorescence (AF) and Diffuse Reflectance (DR) spectra were acquired in a bimodal approach. Then skin was sampled and processed to be classified, according to morphological criteria, into four histological categories: normal and three types of hyperplasia (compensatory, atypical and dysplastic). After extracting spectral characteristics, Principal Component Analysis (data reduction) and *k*-Nearest Neighbor classifying method were applied to compare diagnostic performance of mono-excitation AF (based on each of the seven excitation wavelengths: 360, 368, 390, 400, 410, 420 and 430 nm), multi-excitation AF (combining the seven excitation wavelengths), DR and bimodal spectroscopies. Visible wavelengths are the most sensitive ones to discriminate compensatory from precancerous (atypical and dysplastic) states. Multi-excitation provides an average 6 percentage point-increased sensitivity compared to the best scores obtained with mono-excitation AF for all pairs of tissue categories. Bimodality results in a 4 percentage point-increase of specificity when discriminating the three types of hyperplasia. Thus bimodal spectroscopy appears as a promising tool to discriminate benign from precancerous stages; clinical investigations should be carried out to confirm these results.

Key words

Auto-Fluorescence Spectroscopy; Diffuse Reflectance; Photocarcinogenesis; Squamous Cell Carcinoma; Skin Cancer; *In vivo* Diagnosis

1 Introduction

Skin cancer is the most prevalent cancer among fair-skinned populations¹. Two main types of skin cancerous lesions originate from cells found in the epidermis (the skin epithelium): keratinocytic tumours and melanocytic tumours². The former type of lesions is the most common one and among them, Squamous Cell Carcinoma (SCC) is the most dangerous cancer type as it metastasizes in up to 7.4% of cases³. The best chance to fully cure SCC is to excise it at its first stages of development before dermis invasion, where the vascularization network starts. So-called “first stages” include precancerous (e.g. actinic keratosis) and *in situ* (e.g. Bowen’s disease) stages. Thus, detecting such early stages is of paramount interest for clinical diagnosis. This detection aims at being as specific and sensitive as possible. Indeed a survey of general practitioners found that 30% had no confidence in correctly triaging skin lesions: 22% of cancers would not have been biopsied or referred while benign lesions would have been wrongly biopsied or referred 34% of the time⁴. False negative diagnoses may result in further growth of a lesion making it too extensive for surgical resection. The delay in re-presentation of the patient to the clinician may even allow for metastasis to occur with possibly fatal consequences. False positive diagnoses result in unnecessary procedures, patient inconvenience and stress, increased morbidity and substantial additional costs⁴. Nowadays several diagnostic techniques are under study (biopsy techniques, molecular markers, ultrasonography, confocal microscopy, spectroscopy, fluorescence imaging, electrical impedance, etc.) but the non-invasive ones are particularly well adapted to every day clinical practice since they give a chance to follow evolution of lesions and give immediate information. Among them, dermoscopy is the most widespread in every day practice. In dermoscopy, the lesion is examined with a 10-x to 100-x magnification lens placed directly against skin to which immersion oil has been applied for index-matching. However dermoscopy of keratinocytic lesions is still at its infancy because consensus regarding diagnostic criteria has not been established yet¹. Furthermore such a technique still is based on visual appreciation and thus depends on the physician’s personal experience. That is why *in vivo* optical spectroscopy (also called “optical biopsy”) is a potentially helpful technique because it aims at providing physicians with quantitative i.e. more objective criteria. Assessing spectroscopy’s ability to detect *in vivo* precancerous skin stages implies to follow the entire carcinogenesis in an animal model because it is the only way to get tissue sampling from each carcinogenesis stage. Two ways of inducing carcinogenesis have been widely described: chemically- (using DMBA-TPA application)⁵ and UV-⁶ induced carcinogenesis of mouse skin. However Pentland *et al.*⁷ have shown that models to test chemoprevention strategies must specifically consider cancer

etiology in their design. The main etiological factor for SCC is Ultra-Violet (UV)-solar (often referred to as “actinic”) radiation⁸. Therefore we chose to privilege the UV-induced carcinogenesis by studying skin neoplastic changes of UV-irradiated SKH1 (hairless and albinos) mice throughout the entire carcinogenesis.

UV radiation is a complete carcinogen i.e. it is responsible for cancer induction, promotion and progression. The typical UV-induced DNA damage is the generation of dimeric photoproducts between adjacent pyrimidine bases. Tumor suppressor gene p53 is a common target of UV-induced mutations. There is a proliferative advantage of p53 mutant keratinocytes over normal keratinocytes that results in neoplastic transformation⁹. DNA damage also arises spontaneously from endogenous chemicals produced during metabolism, oxidative stress, and chronic inflammation¹⁰. In pre-clinical studies, exposure of murine skin to UV radiation for 30 weeks aims at inducing first, an acute inflammation and then an unresolved or “chronic” inflammation that induce continuous exposure of tissue to activated immune cells. Such cells secrete soluble mediators which result in excessive tissue remodeling, loss of tissue architecture, and enhances risk for development of neoplastic tissue states¹¹. Most importantly, the recognition that a given tissue abnormality is associated with cancer development does not necessarily imply that all cancers at that site will develop from such lesions. Indeed validation of cancer precursors as intermediate endpoints for cancer development is challenging, since tissue sampling necessarily interrupts or alters the course of the natural history of the neoplastic process. In such case, spectroscopy can also be a useful tool of investigation.

In the current study, autofluorescence (AF) spectroscopy and diffuse reflectance (DR) spectroscopy, alone and in combination, are investigated as non-invasive techniques to discriminate different stages of UV-irradiated mouse skin. Diagnostic efficiency of each technique has been studied separately on a wide variety of organs but Chang *et al.*¹², Breslin *et al.*¹³ and Georgakoudi *et al.*¹⁴ showed that combining the two techniques in a “bimodal” approach improves diagnostic accuracy of cervical, breast and oesophagus cancer respectively. To the best of our knowledge, only one study⁵ has been published on both spectroscopic and histological evaluations of mouse skin carcinogenesis: the main result of this study was that AF spectroscopy using several excitation wavelengths discriminates early stages of chemically-induced SCC with improved classification accuracy compared to single wavelength excitation.

The aim of our study is twofold: i) establish histo-pathological criteria to classify different stages of UV-irradiated murine skin: compensatory, atypical and dysplastic hyperplasia, ii) compare mono-excitation AF, multi-excitation AF, DR and bimodal spectroscopies’ accuracy (sensitivity and specificity) in discriminating pairs of histological classes thanks to a reduced set of selected spectral characteristics.

2 Materials and Methods

2.1 Tumor model

The experiment was approved by the French Ethical Committee on Animal Experiment. Twelve-week old SKH1 female mice (Charles River Laboratories, France) were divided in two groups: the first one includes 8 sham-irradiated mice (control group) and the second one includes 20 UV-irradiated mice. UV irradiation was provided by a bank of eight fluorescent tubes (TL/12, Philips, The Netherlands) set into a UV Research Unit (Daavlin, Belgium) emitting mainly in the UVB range (50% of the emission in the 290-320 nm spectral range). Mice were irradiated with a fluence of 3 mW/cm², 23 cm away from the lamps for 20 seconds each time. The dose was controlled thanks to an integrated dosimeter. Mice were kept in a small cage set each time at the same place underneath the UV Research Unit in order to deliver a dose as homogenous as possible to all mice. Irradiation was performed once a week during the first 15 weeks then twice a week during the last 15 weeks. Irradiation was always performed at least 2 days before spectroscopic measurements in order to avoid an acute reaction bias of spectroscopic measurements. Ten mice were euthanized after 1 month of irradiation and ten others after 6 months of irradiation in order to sample acute and chronic UV-induced skin modifications respectively.

2.2 Experimental protocol

Mice were anesthetized with a mix of Ketamine (110 mg/kg, Panpharma, France) and Xylazine (11 mg/kg, Rompun, Bayer, France) for a 75 minute-immobilization. They were placed on a 35°C-heated blanket underneath the optical fiber-probe that was fixed on a motorized stage in order to control probe’s angle (90°) and pressure repeatability on the skin [Fig. 1(a)]. The probe was put in gentle contact with the skin. An experimental protocol was developed to ensure that spectroscopic measurements and histological evaluations were obtained from the same tissue site. Since tattoo ink is a light absorber and that needles used to perform tattoo could modify skin’s microscopic morphology, a plastic pattern was preferred to tattooing for localization of the measurement sites. As shown in Figures 1(a) and 1(b), the pattern was stuck on the mouse’s back in order to make sure that spectroscopic measurements were performed every 5 mm in a row, on six spots from neck to tail. Once spectroscopic measurements were done, the beginning of the 6 point-row was tattooed in order to know where to start length measurements on histological slides [Fig. 1(b, c)]. Within 6 hours of spectroscopic measurements, mice were euthanized performing cervical dislocation. Within 10 minutes of death, back skin was excised. To prevent skin from shrinking, each piece of skin was held on a polystyrene piece thanks to needles. Skin was further fixed in a formaldehyde solution before imbedding in paraffin. Then 5 µm-slices were stained with standard Hematoxylin and Eosin (H&E) for histological classification based on epidermis morphological features. We also stained dermal elastic fibers using Weigert specific staining.

2.3 Histological classification

Hyperplasia is defined as an increase in size of a tissue or organ due to an increase in the number of cells. It may be physiologic, compensatory or pathologic¹⁰. So we decided to perform a two-step classification. First step aimed at discriminating hyperplastic from non hyperplastic skin epidermis. To do so, it was needed to determine a normal (N) epidermis thickness range. As skin does not display same thickness on the whole body surface, we proposed to determine a normal thickness range for each spot number i.e. for each anatomical location from neck to tail along the backbone. Epidermis thickness of spot #y (y = 1, 2, 3, 4, 5 or 6) on UV-irradiated mice will be compared to epidermis thickness of the corresponding spot #y on sham-irradiated mice, thus taking into account physiological variations. Thickness measurements were performed on 10 to 100 x-magnified images acquired *via* a microscope (Axioskop, Zeiss, Germany) equipped with a CCD camera (DXC-390P, Sony, Japan).

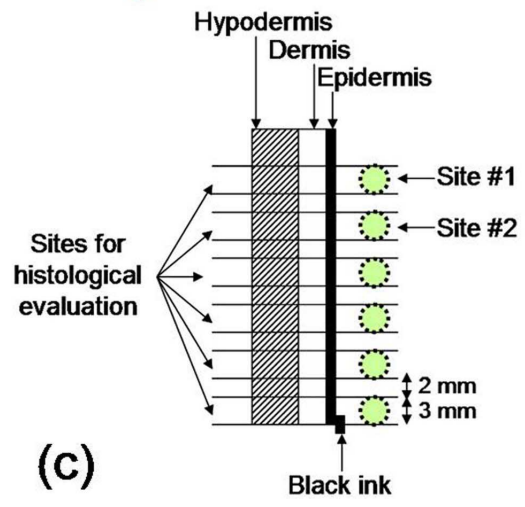
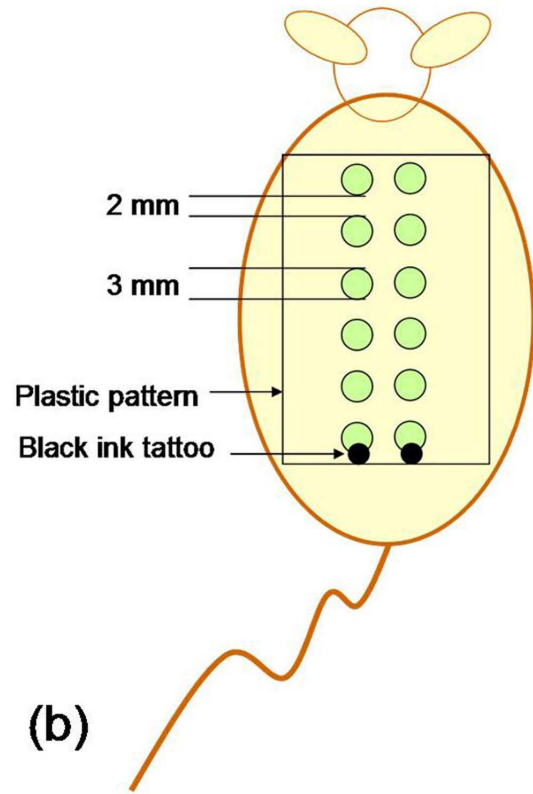
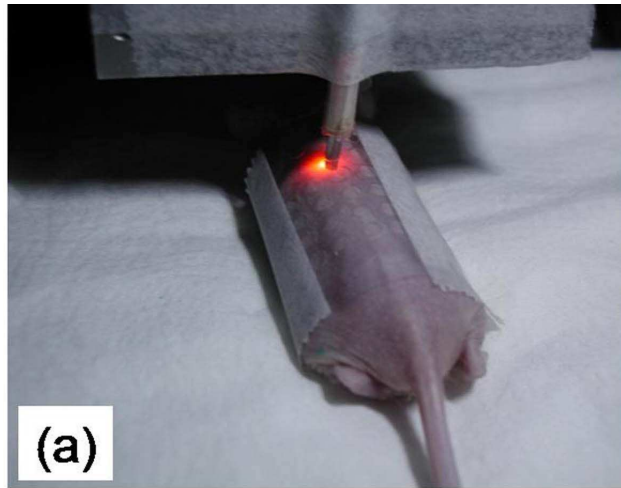


Fig. 1: (a) Picture of an anesthetized mouse on the heated-blanket during spectroscopic measurement. The optical fiber probe is put in gentle contact with the skin throughout a plastic pattern stuck on the mouse's back in order to localize spectroscopic evaluation spots. (b) Schematic of the plastic pattern dimensions and black ink tattoo used to localize each 6-spot row along the backbone. (c) Schematic explaining the method used to localize histological evaluation sites.

An image acquisition software (Tribvn ICS, Tribvn, France) and a data processing software (Osiris, Digital Imaging Unit of the Geneva Hospital, Switzerland) were used. Gaussian distribution of the data set was checked. Then the normal range was defined according to what is commonly recommended for data having a Gaussian distribution: mean \pm 2 x Standard Deviation (SD)¹⁵. Epidermis of a specific spot was classified as “hyperplastic” if its thickness was above the “mean + 2xSD” cut-off value.

2.3 Histological classification

Hyperplasia is defined as an increase in size of a tissue or organ due to an increase in the number of cells. It may be physiologic, compensatory or pathologic¹⁰. So we decided to perform a two-step classification. First step aimed at discriminating hyperplastic from non hyperplastic skin epidermis. To do so, it was needed to determine a normal (N) epidermis thickness range. As skin does not display same thickness on the whole body surface, we proposed to determine a normal thickness range for each spot number i.e. for each anatomical location from neck to tail along the backbone. Epidermis thickness of spot #y (y = 1, 2, 3, 4, 5 or 6) on UV-irradiated mice will be compared to epidermis thickness of the corresponding spot #y on sham-irradiated mice, thus taking into account physiological variations. Thickness measurements were performed on 10 to 100 x-magnified images acquired *via* a microscope (Axioskop, Zeiss, Germany) equipped with a CCD camera (DXC-390P, Sony, Japan). An image acquisition software (Tribvn ICS, Tribvn, France) and a data processing software (Osiris, Digital Imaging Unit of the Geneva Hospital, Switzerland) were used. Gaussian distribution of the data set was checked. Then the normal range was defined according to what is commonly recommended for data having a Gaussian distribution: mean \pm 2 x Standard Deviation (SD)¹⁵. Epidermis of a specific spot was classified as “hyperplastic” if its thickness was above the “mean + 2xSD” cut-off value.

Since atypical and dysplastic hyperplasias are true cancer precursors whereas compensatory hyperplasia is not¹⁰, discriminating CH from the two other types of hyperplasia (AH and D) is of utmost medical value. That is why the second step of our classification method aimed at classifying hyperplastic skin samples into the following histological classes: compensatory hyperplasia (CH), atypical hyperplasia (AH) and dysplasia (D). Atypia is defined as an abnormal cellular proliferation in which there is loss of normal architecture and orientation¹⁰. Histological features of skin dysplasia are given by Kumar *et al.*¹⁶: because skin dysplasia is usually the result of chronic exposure to sunlight and is associated with build-up of excess keratin, these lesions are called actinic keratoses. The dermis contains thickened blue-gray elastic fibers (elastosis), a probable result of abnormal dermal elastic fiber synthesis by sun-damaged fibroblasts within the superficial dermis. The stratum corneum is thickened and, unlike normal skin, nuclei in the cells are often retained (a pattern called “parakeratosis”). Table 1 displays the morphological features on which we based our classification of hyperplastic samples in one of the three following classes: compensatory, atypical or dysplastic hyperplasia (CH, AH and D respectively). All the criteria were evaluated by a pathologist. Three fields of view (FOV) were examined from each sample. A sample was assigned to a class only if classifications of the three FOV were consistent with one another. If they were not consistent, then the sample was discarded from histological classification.

Table 1: Morphological features used to classify skin samples into the three different classes of hyperplasia (CH, AH and D). ⊕: feature that must be found to classify the sample in the corresponding histological class, ⊗: additional features that may be found as well. Sham-irradiated mice were considered as normal (N) and used as negative controls. Histological features displayed by SCC were used as positive controls.

	Normal (N)	Compensatory hyperplasia (CH)	Atypical hyperplasia (AH)	Dysplasia (D)	Bowen's Disease/SCC
Thickened epidermis		⊕	⊕	⊕	⊕
Mitosis in upper layers		⊗	⊗	⊗	⊗
Hyperkeratosis		⊗			
Nucleated upper layers			⊕	⊕	⊕
Heterogenous chromatin			⊕	⊕	⊕
Cell layer disorganization			⊕	⊕	⊕
Parakeratosis				⊗	⊕
Dyskeratosis				⊗	⊕
Elastosis				⊗	⊕

2.4 Spectroscopy and statistical analysis

Figure 2 shows the spectroscopy instrumentation developed in order to acquire spatially colocalized AF and DR spectra. A fiber probe made of 200 μ m-core diameter optical fibers was used: one of these fibers was chosen as the excitation fiber and another one was chosen to collect autofluorescence and backscattered light at a 271- μ m CEFS (Collecting to Excitation Fiber Separation). The spectrometer was an iHR320 spectrograph (Horiba Jobin Yvon, France) including a back-illuminated CCD detector and achieving a spectral resolution better than 5 nm in the 350-800 nm spectral range. Our goal was to construct a tunable multi-excitation source, based on a short-arc 300W Xenon lamp, remotely software-controlled, capable to generate adjustable centre-wavelengths and bandwidths and to automatically switch from one excitation wavelength to the other one (for AF spectroscopy: seven excitation wavelengths at 360, 368, 390, 400, 410, 420 and 430 nm, with a Full Width at Half Maximum (FWHM) of 15 nm) and from one illumination band to the other one (for DR spectroscopy: 365-545, 450-640 and 550-740 nm in order to cover the UV-Visible range) in a series of sequential steps. For this purpose, bandpass linear filters were used (LVF-series, Ocean Optics), composed of a long-pass filter and a short-pass filter (respectively referred to as FL1 and FL2 in Figure 2). Both filters are fixed on motorized translation stages and wavelength tuning is achieved by sliding filters with respect to each other thanks to a programmable motorized micropositioning system. The motorized stages slide on a 45 mm-long bench, which limits their excursion, resulting in a maximal transmitted bandwidth of 190 nm. The three illumination bands result from this mechanical limitation: 3 x 45 mm were needed in

order to cover the UV-visible spectral range. The three illumination bands (365-545 nm, 450-640 nm and 550-740 nm) partly overlap. The reflectance signal was extracted from the spectral ranges for which filter transmission is maximum, resulting in the following selected bands: 390-490 nm (illumination band #1), 490-590 nm (illumination band #2) and 590-720 nm (illumination band #3). Then these three bands were simply concatenated. Diffuse Reflectance signal in each band was obtained by dividing the raw signal acquired *in vivo* on mouse skin by the signal acquired on a Lambertian surface (WS-1 Diffuse Reflection Standard, Ocean Optics). Such reference spectra were collected every day before starting the experiment. This normalization accounts for the non-uniform spectral response of the acquisition system and for variations of the light-source intensity over the 30-week period of time. For AF spectroscopy, spectra were recorded as a whole over the entire acquisition spectral range. In order to reject skin backscattered excitation light, three different longpass filters were used with the following cut-off wavelengths: 400 nm for 360 and 368 nm-excitation wavelengths, 435 nm for 390 and 400 nm-excitation wavelengths and 455 nm for 410, 420 and 430 nm-excitation wavelengths. AF spectra were corrected for the non-uniform spectral response of the acquisition system using a radiometric calibration source (HL-2000, Ocean Optics). A correction factor spectrum was calculated by dividing the HL-2000 experimentally acquired spectrum by the calibration spectrum and used to correct spectra measured on mouse skin. Variations of the light source intensity were taken into account by measuring excitation intensity at the probe tip using a calibrated photodiode (818-UV, Newport Research Corp.) prior to each experiment. Raw acquired AF spectra were divided by the excitation light power. Fluorescence data from a single measurement spot are represented as an excitation-emission matrix (EEM): columns of the matrix spectra correspond to emission spectra at each excitation wavelength.

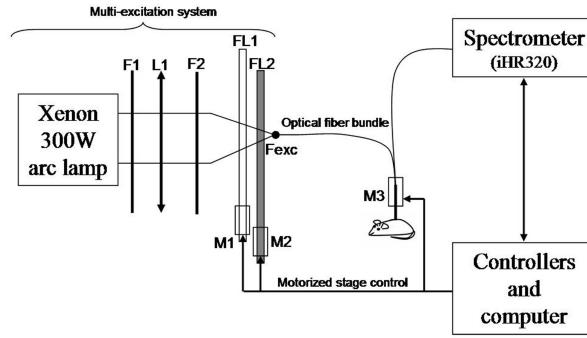


Fig. 2: Schematic diagram of the bimodal spectroscopy system used to acquire mouse skin spectra *in vivo*. Short arc lamp (300W Xenon), F1: anticaloric filter, L1: convex lens, FL1 and FL2: high-pass and low-pass linearly variable filters, Fexc: excitation optical fiber, M1, M2 and M3: motorized micrometric translation stages.

Table 2: Spectral features (19 for autofluorescence and 4 for diffuse reflectance) used for spectra classification. Total energy is the sum of all spectra intensities in the $[\lambda_i - \lambda_j]$ bandwidth. Area ratio is the ratio between the sum of intensities in the $[\lambda_i - \lambda_j]$ bandwidth and the sum of intensities in the $[\lambda_k - \lambda_l]$ bandwidth. Peak ratio is the ratio of intensities at λ_m and λ_n . Slope is the slope between the intensities at λ_p and λ_q .

Autofluorescence			
λ_{exc} (nm)	Total energy (a.u.)	Area ratio	Peak ratio
360	$A_{410-700}$	$A_{410-459} / A_{459-700}$	
368	$A_{410-700}$	$A_{410-470} / A_{470-700}$	
390	$A_{460-700}$	$A_{460-545} / A_{545-700}$	$R_{470/634}$
400	$A_{461-700}$	$A_{461-550} / A_{550-700}$	$R_{485/633.5}$
410	$A_{460-700}$	$A_{460-542.5} / A_{542.5-700}$	$R_{492/633}$
420	$A_{462.5-700}$	$A_{462.5-550} / A_{550-700}$	$R_{505/633}$
430	$A_{476-700}$	$A_{476-585} / A_{585-700}$	$R_{507/633}$
Diffuse Reflectance			
	Total energy	Slope	Peak ratio
	$A_{390-720}$	$S_{580-600}$ $S_{615-720}$	$R_{423/577}$

Spectroscopic statistical analysis was a three-step process: i) spectral features extraction, ii) data reduction and iii) classification. As shown in Table 2, 19 spectral features and 4 spectral features were extracted from AF and DR spectra respectively acquired on each skin sample (resulting in using 23 spectral features when combining the two modalities for the “bimodal” approach). The spectral parameters were selected in order to be sensitive to the intensity and spectral shape modifications induced by neoplastic transformation: total area under the spectrum between λ_i and λ_j ($A_{\lambda_i-\lambda_j}$) related to the global backscattered intensity (Diffuse Reflectance) and emission intensity (Autofluorescence); area ratios: ($A_{\lambda_i-\lambda_j}/A_{\lambda_k-\lambda_l}$); slopes between λ_p and λ_q ($S_{\lambda_p-\lambda_q}$) and peak ratios λ_m and λ_n (R_{λ_m/λ_n}) related to the spectral shape. This large number of features was reduced by applying Principal Component Analysis (PCA). This linear transformation technique employed for the dimensionality reduction of the parameter space allows to represent most part of the information of the original data set in the first few uncorrelated principal components (PCs)¹⁷. Once data reduction was done, a *k*-Nearest Neighbor (*k*-NN) method was used to build the algorithm for classification of spectra in one of the following classes: normal, compensatory hyperplasia, atypical hyperplasia and dysplasia. The *k*-NN method classifies an unknown sample in the class which has the most “similar” or “nearest” sample points in the training set of data. Euclidean distance was used to measure distance between points. In this case, we randomly chose 66% of spectra in each histological class as the training set of data. Then, any new sample from the validation data set was classified as normal, compensatory hyperplastic, atypical hyperplastic and

dysplastic by comparing it with the standard models for each of the four classes. The algorithm accuracy to classify samples was expressed through two parameters: sensitivity (Se) and specificity (Sp). Sensitivity is defined as the number of samples classified as pathological by statistical analysis divided by the number of pathological samples determined as such by histology. Specificity is defined as the number of samples classified as normal by statistical analysis divided by the number of normal samples determined as such by histology. When the two histological classes to be discriminated were two pathological classes, the less advanced state in the carcinogenic process was used as the “normal” sample. For instance, when discriminating between AH and D, AH was chosen as “normal” and D as “pathological” in the definitions above. In order to obtain an optimal value of the [sensitivity, specificity] couple, we studied the influence of the number of neighbors ($1 < k < 15$) and of PCs on sensitivity and specificity for each modality (Table 3) when discriminating the six pairs of histological classes. Since the first few PCs usually account for most part of total variance of the original data set and that the goal is to obtain optimum classification results with as few PCs as possible, classification algorithm was performed using only 7 and 10 PCs for multi-excitation AF and bimodality respectively, accounting for 99% of variance of the original data set. In the case of mono-excitation AF and DR used alone, since at most to 4 spectral features or less were extracted, 100% of PCs were used.

Table 3: Number of Principal Components (PCs) and nearest neighbors (k) tested for each of the four spectroscopic modalities: mono-excitation autofluorescence (AF), multi-excitation AF, diffuse reflectance (DR) and bimodality (DR + multi-excitation AF).

Mono-excitation AF		Multi-excitation AF	DR	DR + multi-excitation AF
360, 368 nm	390, 400, 410, 420, 430 nm			
PCs = 1,2. k = 1, 2, ...,15.	PCs = 1,2, 3. k = 1, 2, ...,15.	PCs = 1,2..., 7. k = 1, 2, ...,15.	PCs = 1,2, 3, 4. k = 1, 2, ...,15.	PCs = 1,2..., 10. k = 1, 2, ...,15.

3 Results and Discussion

3.1 Histology

Because of inter-individual variable response to UV radiation, we decided to classify skin samples exclusively according to histological evaluation and not according to irradiation dose or exposure duration. Figure 3 and Table 4 show the cut-off values (maximum normal epidermis thickness) used to define hyperplasia: UV-irradiated epidermis displaying thickness above such “normal thresholds” are considered as hyperplastic. A Student’s t-test was performed to compare mean thickness values between anatomical spots #1 [mouse head, Fig. 4(a)] and #6 [mouse tail, Fig. 4(b)] and showed that the difference in mean epidermal thickness is significantly different with a level of significance $p = 0.0006 < 0.05$. This emphasizes how important it is to base histological comparison of normal and irradiated skin on corresponding anatomical locations, especially in our case where epidermis thickness is one of the criteria used to define hyperplasia.

Each class of hyperplasia was characterized by qualitative features relative to epidermis and dermis observed in stained histological sections. At the beginning of UV-exposure (the first 3 to 6 weeks of exposure), skin displays cell proliferation that aims at regenerating the tissue leading to a compensatory type of hyperplasia (CH): a thickened epidermis as well as a thickened keratin layer (hyperkeratosis) can be observed [Fig. 4(c)] but neither cytological (cell nuclei and layer organization still look normal) nor structural (normal dermal elastic fibers) carcinogenic features are displayed [Fig. 5(a)]. After 6 months of UV-exposure, skin has not only become hyperplastic but also displays cancerous characteristics. We distinguished two types of cancerous characteristics relative to nuclei and keratin maturation respectively. The former ones (heterogenous chromatin, mitosis, cell layer disorganization) are related to the class called “atypical hyperplasia” (AH). The second ones (parakeratosis [Fig. 5(b)], dyskeratosis [Fig. 5(c)] as well as elastosis [Fig. 5(d)], appearing in addition to nuclei modifications, are related to dysplasia (D). Using the classification criteria defined in Table 1, the 224 mice skin samples were classified as follows: 84 normal, 47 compensatory hyperplasia, 37 atypical hyperplasia and 56 dysplasia.

We used SCC that developed on a few mice to check that the sampling protocol allowed a precise match of spectroscopic measurements and histological evaluations. As shown in Figure 6, SCC appears as a macroscopic abnormal growth on mouse’s skin [Fig. 6(a)] on spot #5 of spectroscopic measurement. The abnormal growth shown in Figure 6 (b) and further identified as a SCC by histology can also be located on spot #5 of the histological slide. Thus histological classification was provided for each of the corresponding spot of spectroscopic measurements.

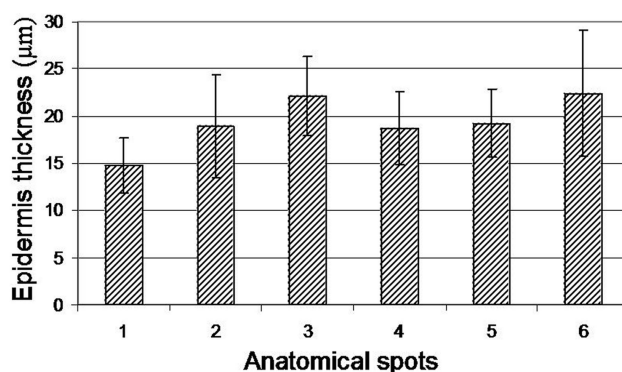


Fig. 3: Histogram showing mean (n = 160) normal epidermis thickness of sham-irradiated mice for the 6 anatomical spots. Error bars represent ± 1 SD.

Table 4: Normal epidermis thickness cut-off values (defined as mean (n=160) + 2 SD) used to define hyperplasia for each anatomical spot (spot #1 is towards mouse's neck and spot #6 is towards mouse's tail) in order to account for physiological variations of epidermis thickness along the backbone.

Anatomical spot number	1	2	3	4	5	6
Mean epidermis thickness + 2SD (μm)	21	29	30	27	27	40

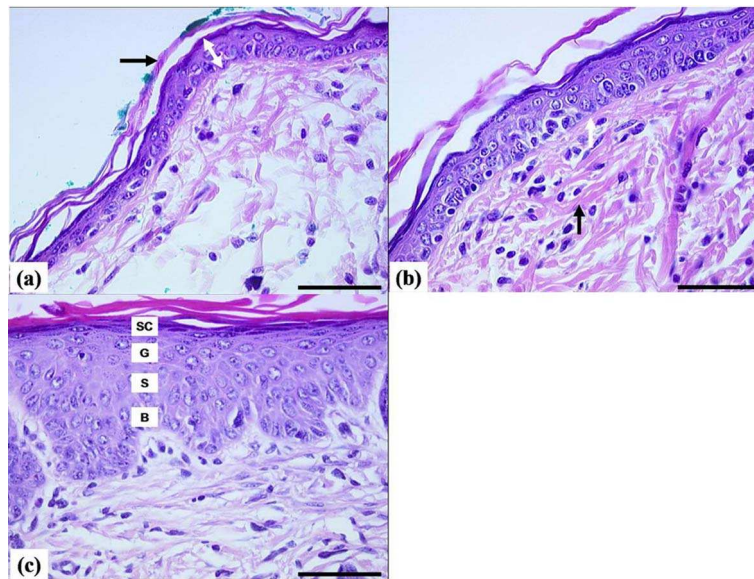


Fig. 4: Representative microscopic images of H&E stained histological sections of mouse skin. (a) Sham-irradiated spot # 1 displays epidermis (delimited by the white arrow) and keratin on top of epidermis (black arrow). (b) Sham-irradiated spot # 6 displays basement membrane (white arrow) and dermal collagen fibres (black arrow). Epidermis is significantly thickened compared to spot # 1. (c) Spot # 6, after 1 month UV-irradiation: SC: Stratum Corneum, G: Granulous layer, S: Spinous layer, B: Basal cell layer. Epidermis is significantly thickened compared to sham-irradiated spot # 6. Scale bar: 50 μm .

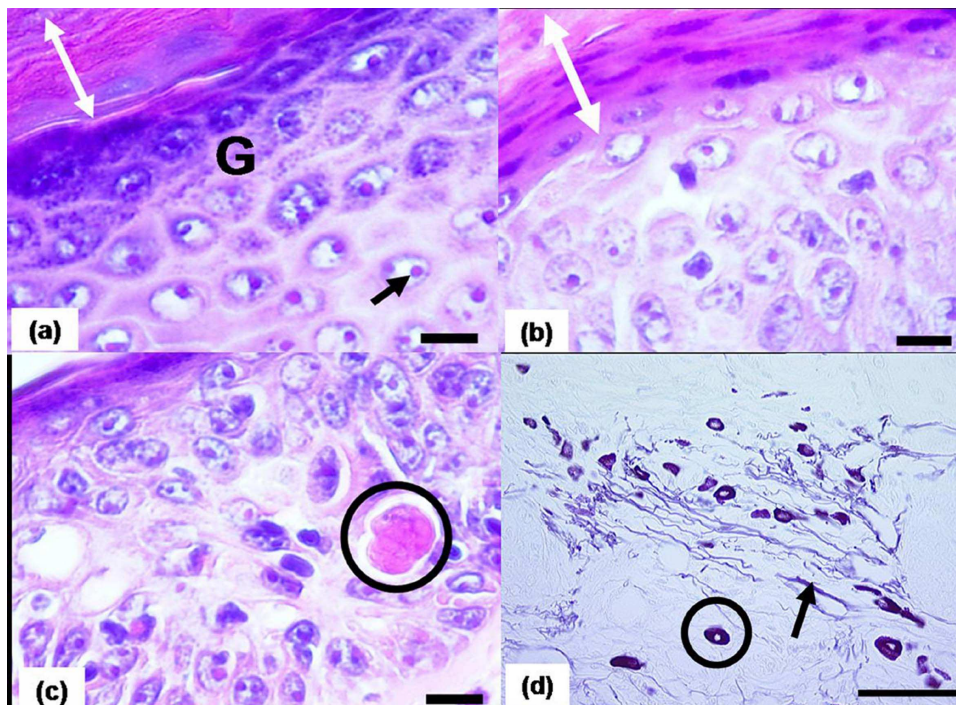


Fig. 5: Representative microscopic images of H&E (a,b,c) and Weigert (d) stained histological sections of mouse skin after 1 month UV-irradiation (a) and after 6 month UV-irradiation (b,c,d) displaying the morphological epidermis and dermis features used to classify skin samples in each of the three histological classes (CH, AH, D). (a) Compensatory hyperplastic epidermis featuring thickened epidermis (above normal cut-off values), hyperkeratosis (white arrow), normal keratin maturation (see G the granulous layer), organized cell layers and chromatin confined within nuclei (black arrow). (b) Dysplastic epidermis featuring keratin dysmaturation (parakeratosis: white arrow and no visible granulous layer), cell layer disorganization and heterogenous nuclei chromatin. (c) Dysplastic epidermis featuring dyskeratosis (black circle). (d) Dermis displaying elastosis (black arrow: short and thick elastic fibers) and chronic inflammation (circle: mast cell). Scale bars: 10 μm (a, b,c) and 50 μm (d).

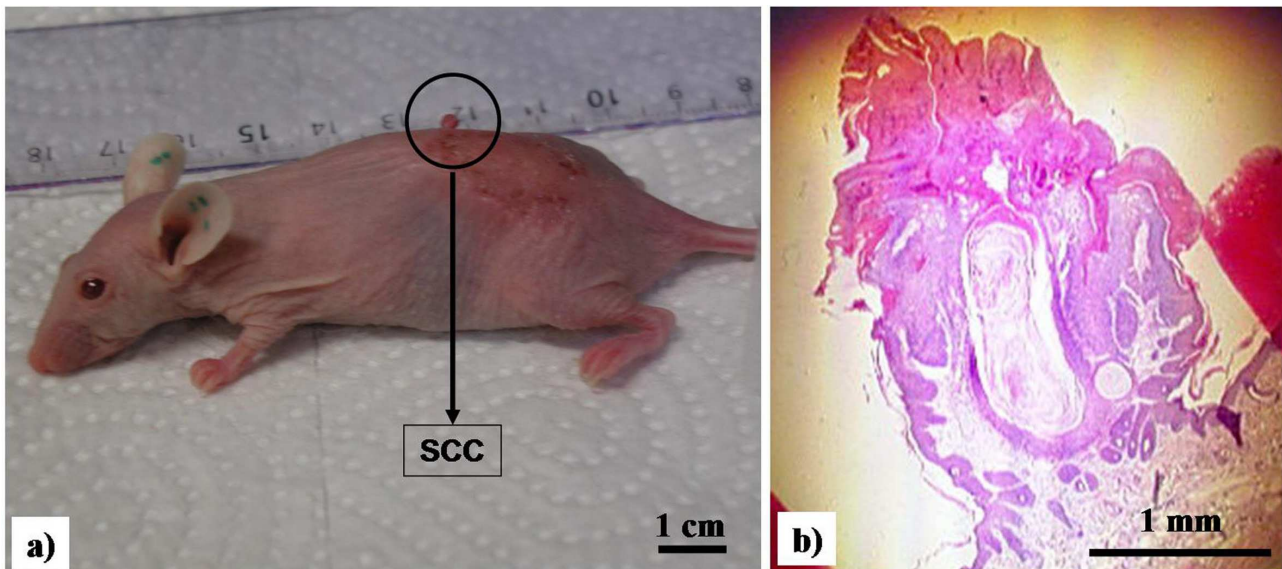


Fig. 6: Matching of anatomical spectroscopic measurement spots (left picture) and histological evaluation sites (right picture)

3.2 Spectroscopy and statistical analysis

Figures 7 (a), (b), (c) and (d) show EEMs (mean values) obtained for each histological class respectively: N, CH, AH and D. Figure 8 displays 410 nm-mono-excitation AF (a) and DR (b) mean spectra for each histological class (N, CH, AH and D). As expected, AF emission spectra exhibit flavins and keratin (410 nm excitation, 510 nm emission) as well as porphyrins (410 nm excitation, double-peak emission at 633 and 672 nm) characteristic emission peaks while DR spectra exhibit characteristic hemoglobin absorption peaks (420, 542 and 577 nm). It should be reminded that such spectra are obtained for a 271- μm CEFS.

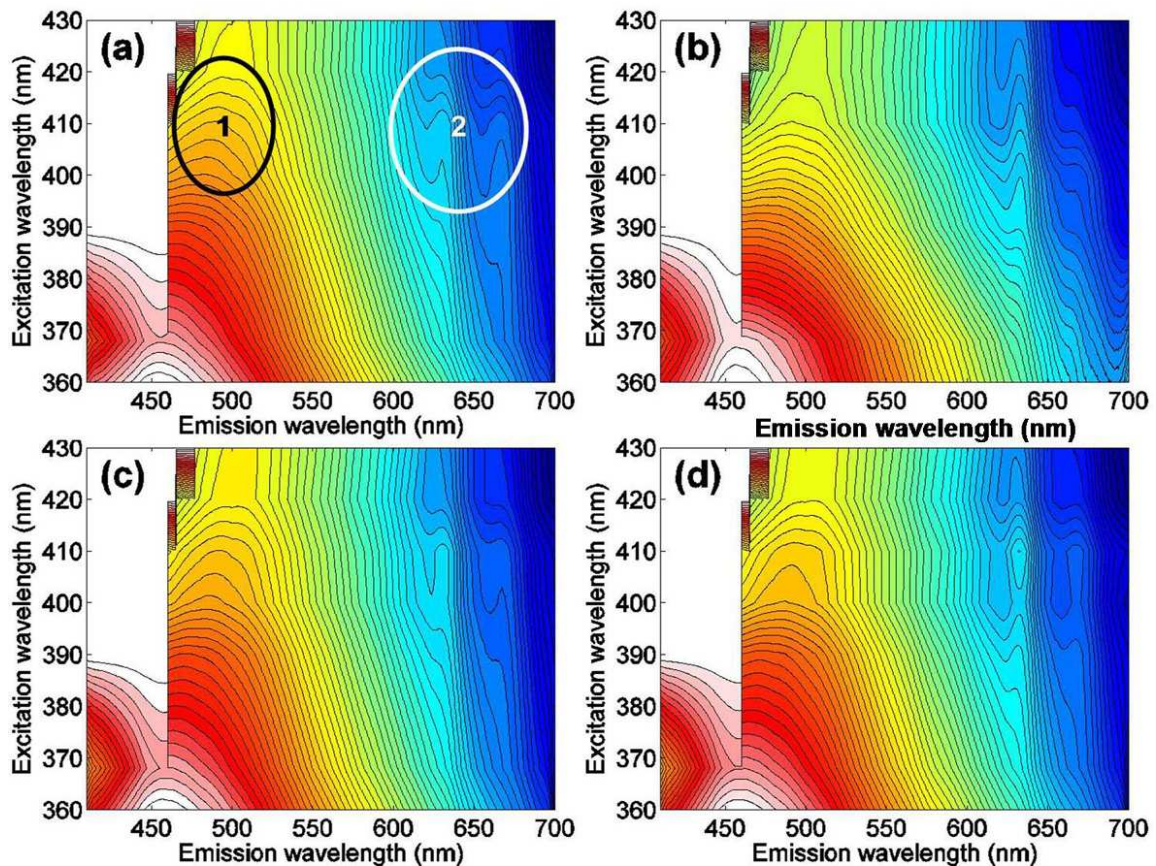


Fig. 7: Mean EEMs from multi-excitation AF spectroscopy of normal (a), compensatory hyperplastic (b), atypical hyperplastic (c) and dysplastic (d) mouse skin. Areas attributable to flavins and keratin (1) as well as porphyrins (2) are circled.

The aim of the spectroscopic classification is to determine sensitivity and specificity for discrimination of the four histological classes using i) mono-excitation AF spectroscopy alone based on each of the seven excitation wavelengths, ii) multi-excitation AF spectroscopy based on the combination of the seven excitation wavelengths, iii) DR spectroscopy alone, iv) the combination of DR and multi-excitation AF spectroscopies (“bimodal” spectroscopy). We performed a pair-wise comparison: normal vs. each type of hyperplasia (N vs. CH, N vs. AH and N vs. D) and each type of hyperplasia vs. one another (CH vs. AH, CH vs. D and AH vs. D).

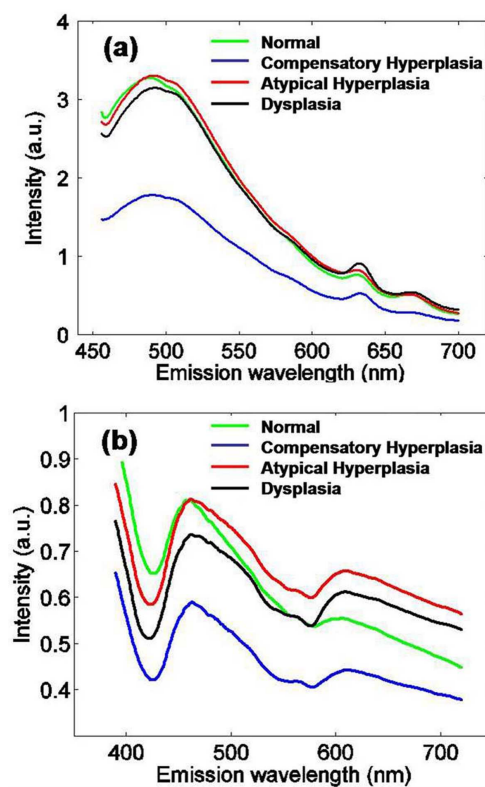


Fig. 8: Mean autofluorescence spectra at 410 nm-excitation (a) and Diffuse Reflectance spectra (b) obtained for each histological class (N, CH, AH and D).

Mono-excitation AF spectroscopy Focusing on AF spectroscopy, results concerning sensitivity and specificity are summarized in Figures 9 (a) and (b) respectively. It is to be noticed that when discriminating CH from each of the three other histological classes (N, AH and D), the longer wavelengths (“visible” wavelengths i.e. all wavelengths except for 360 and 368 nm) reach higher sensitivity values than the shorter ones (360 and 368 nm). Compensatory states are at low risk to evolve into SCC, therefore the use of visible wavelengths should help reducing the number of unnecessary procedures. It is to be noticed that such visible wavelengths achieve their lowest sensitivity level (around 50%) when discriminating between N and AH. It can be hypothesized that keratin layer plays an important role in AF spectral discrimination. Indeed N and AH are the only two classes that usually display no abnormally thick keratin layer whereas CH may display hyperkeratosis and D often displays parakeratosis. The keratinized layer absorbs and scatters the excitation light, thus reducing its penetration into deeper layers. This effect can be seen in Figure 8, where CH, characterized by the thickest keratin layer (hyperkeratosis), exhibits a much lower average fluorescence intensity than all other classes. Based on information from several studies^{18,19,20,21} investigating fluorescence of keratin, it is most likely that keratin fluorescence is involved in our results concerning AF spectral discrimination although its precise role is difficult to determine, due to the fact that the AF signal results from the overlap of various fluorophores located at different depths. However, a tentative explanation accounting for the better sensitivity achieved using visible wavelengths than UV ones (360 and 368 nm) when discriminating CH from each of the three other histological classes (N, AH and D) would be as follows: keratin layer plays a shielding role, mostly pronounced in UV, reducing the excitation of other fluorophores in epidermis (NADH) and dermis (collagen, elastin), which are spectral markers of neoplastic transformation. Under UV excitation, the observed AF signal is a mixture of NADH, collagen and keratin emissions with a high contribution of keratin possibly blurring the differences in spectral signatures due to other fluorophores.

Using either mono- or multi- excitation AF, a drastic decrease of specificity can be observed in Figure 9 (b) when discriminating between AH and D compared to all other pair-wise comparisons. Such a low specificity might be explained by the close histological characteristics of these two classes (see Table 1).

Multi-excitation AF spectroscopy As can be seen in Figure 9 (a), compared to any single excitation wavelength, multi-excitation AF always provides higher sensitivity, resulting in an average 6% increased sensitivity over all pairs of histological classes. Conversely, specificity [Fig. 9(b)] is not improved by multi-excitation (except for CH vs. AH: +2 percentage points): specificity remains higher than 92% when discriminating between normal skin and the three types of hyperplasia (CH, AH and D) but drastically decreases when discriminating the three types of hyperplasia from one another (82%, 76% and 41% respectively for each pair of histological classes).

DR spectroscopy As shown in Figure 10, DR spectroscopy is fairly more sensitive (+5.6 percentage points) when discriminating the three types of hyperplastic tissues from one another (75.3% average sensitivity over the three pairs of histological classes: CH vs. AH, CH vs. D and AH vs. D) than when discriminating normal skin from any type of hyperplasia (69.7% over the three pairs of histological classes: N vs. CH, AH and D respectively). Mainly due to the low specificity achieved when discriminating AH from D (46%), a drastic fall of specificity (-24 percentage points) is observed when discriminating the three types of hyperplasia from one another (average specificity of 66% over the three pairs of histological classes). Indeed, the specificity achieved when discriminating normal tissue from each type of hyperplasia is as high as 90% (average specificity over the three histological classes).

Multi-excitation AF, DR and bimodality A comparative analysis between the diagnostic performances of multi-excitation AF alone, DR alone and bimodal spectroscopies can be seen in Figure 11. If we were to select only one modality on the basis of sensitivity results, multi-excitation AF would be selected. Indeed, on average, over the six pairs of histological classes to discriminate, multi-

excitation AF is the most sensitive modality: average sensitivity of 82% which is +1 and +10 percentage points compared to bimodality and Diffuse Reflectance used alone respectively. Bimodality seems mostly interesting when considering specificity. It is either as specific or more specific than multi-excitation AF and Diffuse Reflectance used alone over all pairs of histological classes (except for N vs. AH: 94% and 93% for multi-excitation AF and bimodality respectively). Even though specificity remains low, bimodality slightly improves specificity (+4 percentage points) when discriminating the three types of hyperplasia from one another and achieves a 71% specificity compared to 66% for both multi-excitation AF and DR used alone (average over the three pairs of histological classes).

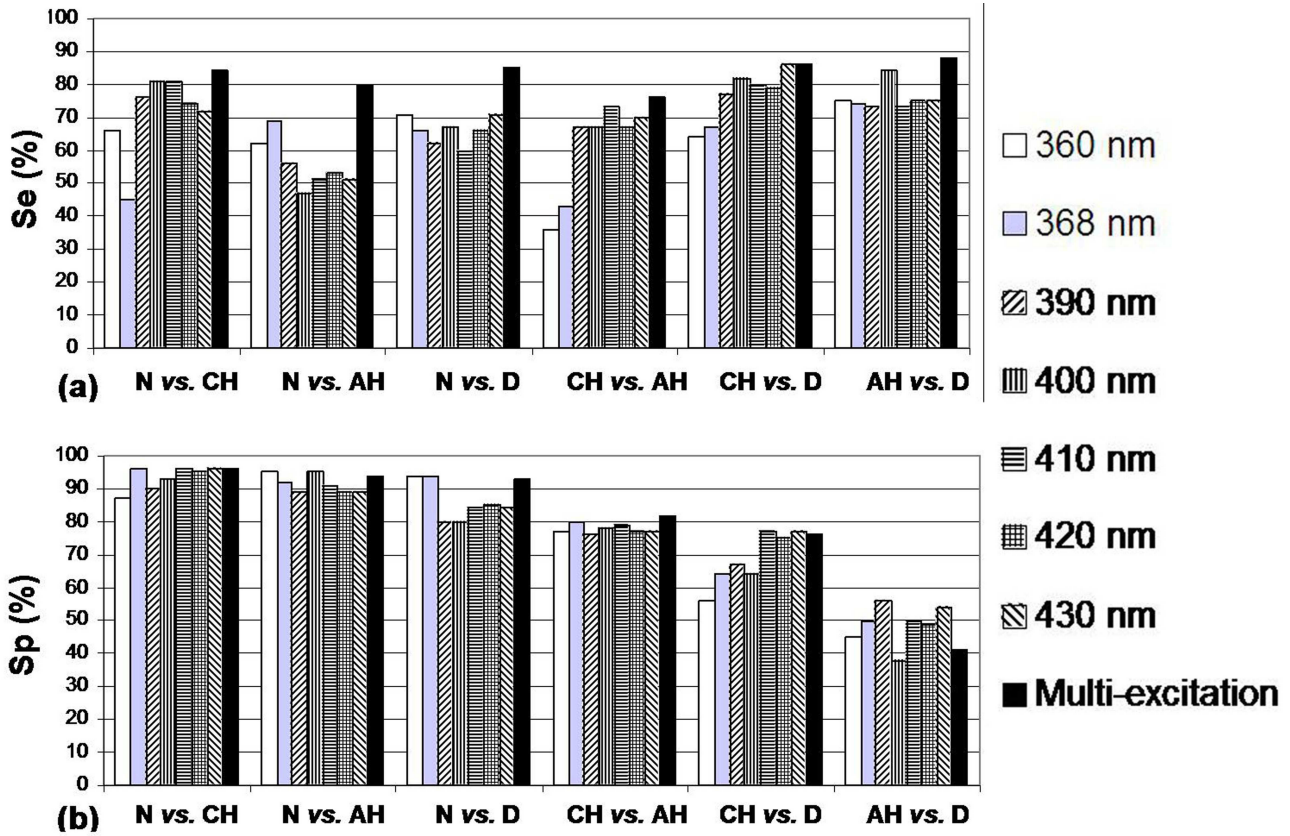


Fig. 9 : Average Sensitivity (a) and Specificity (b) achieved by mono-excitation (for each of the seven excitation wavelengths) and multi-excitation auto-fluorescence (AF) spectroscopy for the discrimination of the six pairs of histological classes.

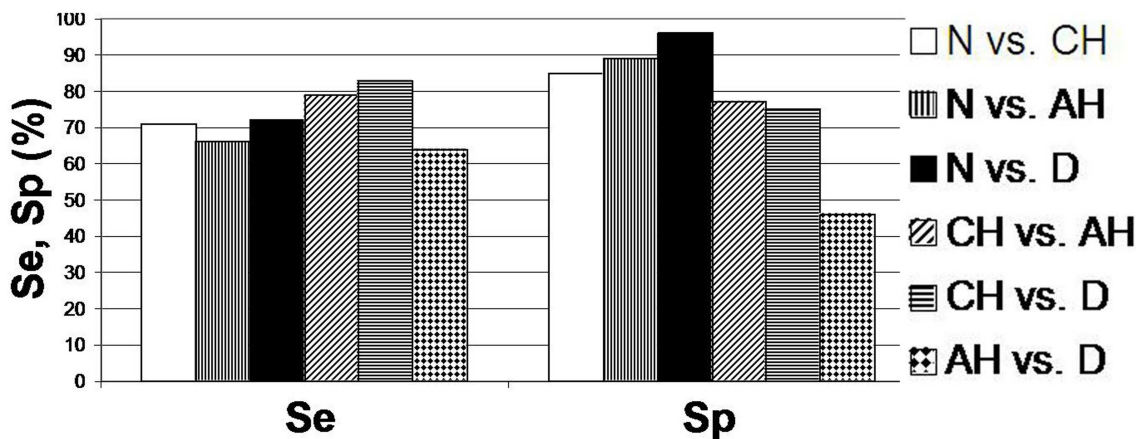


Fig. 10: Average sensitivity (Se) and specificity (Sp) achieved by Diffuse Reflectance (DR) for each pair of histological classes.

In order to evaluate the global diagnostic performance taking into account both sensitivity and specificity as a function of numbers of k and PCs, a Receiver Operating Characteristic (ROC) representation was used²². We evaluated the best combination of sensitivity and specificity corresponding to the data point that is the furthest away from the median line, as shown with distance d in Figure 12. Figures 13 and 14 display ROC representations for each of the four spectroscopic modalities (corresponding to each row of Figures 13 and 14) and for each pair of histological classes (corresponding to each column of Figures 13 and 14). For every case, all the combinations of numbers of PCs and nearest neighbors were tested to see which ones achieve the best diagnostic accuracy i.e. the optimum [sensitivity, specificity] couple. The best five performances are indicated for each pair-wise analysis in Figures 13 and 14.

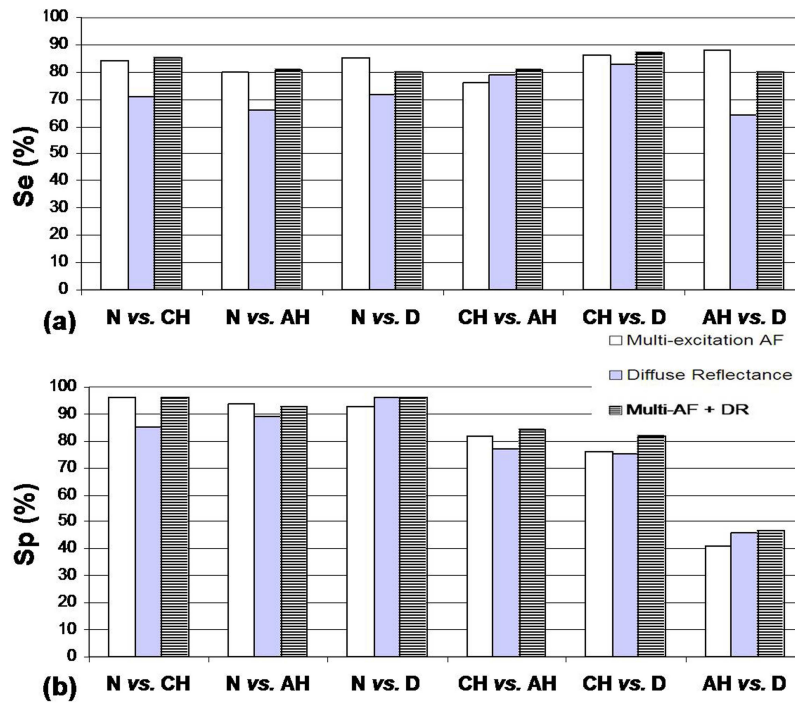


Fig. 11: Average sensitivity (a) and specificity (b) of multi-excitation autofluorescence (AF: white), Diffuse Reflectance (DR: grey) and bimodal spectroscopy (Multi-excitation AF + DR: dash) when discriminating each pair of histological classes.

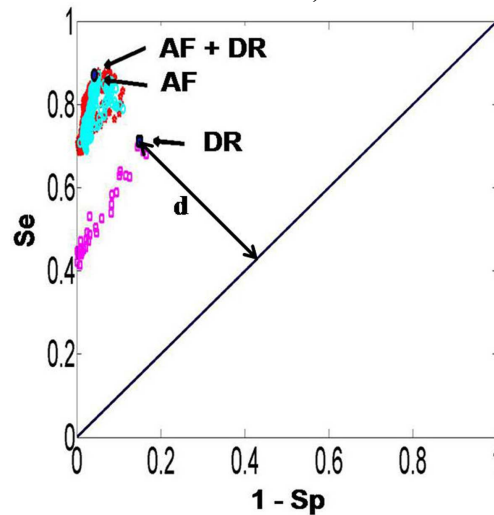


Fig. 12: Receiver Operating Characteristic (ROC) plot showing how the optimum classification accuracy couple [sensitivity, Se and specificity, Sp] is determined for each spectroscopic modality: blue data cluster, AutoFluorescence (AF); pink, Diffuse Reflectance (DR) and red, bimodality (DR+AF). The current plot illustrates the determination of optimum [Se, Sp] couple for the discrimination of Normal and Atypical Hyperplasia using DR: the data point that is the furthest away at a distance d is kept as the optimum classification result.

Our results are consistent with those reported by Diagaradjane *et al.*⁵ in a study aiming at characterizing early neoplastic changes in a DMBA/TPA-induced mouse skin tumor model. They used multi-excitation AF in conjunction with a multivariate statistical method. Out of the 19 excitation wavelengths (ranging from 280 to 460 nm) used by the authors, the best classification accuracy was obtained for 280 and 410 nm (74.3% and 73.1% respectively). We did not test such short wavelengths as 280 nm because their use might be questionable in a clinical trial due to the risk of genetic mutations. But in the spectral range (360-430 nm) used by both our teams, Diagaradjane also reported that visible wavelengths (410 nm) achieve better classification accuracy than shorter ones (e.g. 360 nm: 63.9% accuracy). When comparing AF spectroscopy's classification ability using either one excitation wavelength or a combination of the 5 most discriminating excitation wavelengths (out of 19 they tested), they showed that statistical analysis of the combination wavelengths resulted in 11.6% increase in the overall classification accuracy when compared to the highest classification accuracy obtained with single wavelength analysis. On UV-irradiated mouse skin, our results show an average 9.3 percentage points increased sensitivity when considering the discrimination of normal skin from each of the three classes of UV-irradiated skin.

Chang *et al.*¹² evaluated the diagnostic potential of multi-excitation AF alone, DR alone and bimodality to discriminate human (columnar and squamous) normal cervical tissue from different types of precancerous tissues. Their algorithms were tested to discriminate pairs of histological classes as well: normal (columnar or squamous) vs. low or high grade intraepithelial lesions (columnar or squamous). They showed that fluorescence alone gives superior performance compared to reflectance alone and that the combination of reflectance spectra and fluorescence spectra provides a modest improvement in diagnostic performance. Similarly, in our case, we showed that multi-excitation AF yields higher sensitivity than DR and that specificity is only slightly improved by

bimodality compared to multi-excitation AF or DR used alone when discriminating the different types of hyperplasia from one another. This is precisely the use for which bimodality is of particular value: increasing diagnostic specificity when discriminating benign (i.e. CH) from precancerous stages (i.e. AH and D) would be of great medical interest in order to reduce unnecessary biopsies

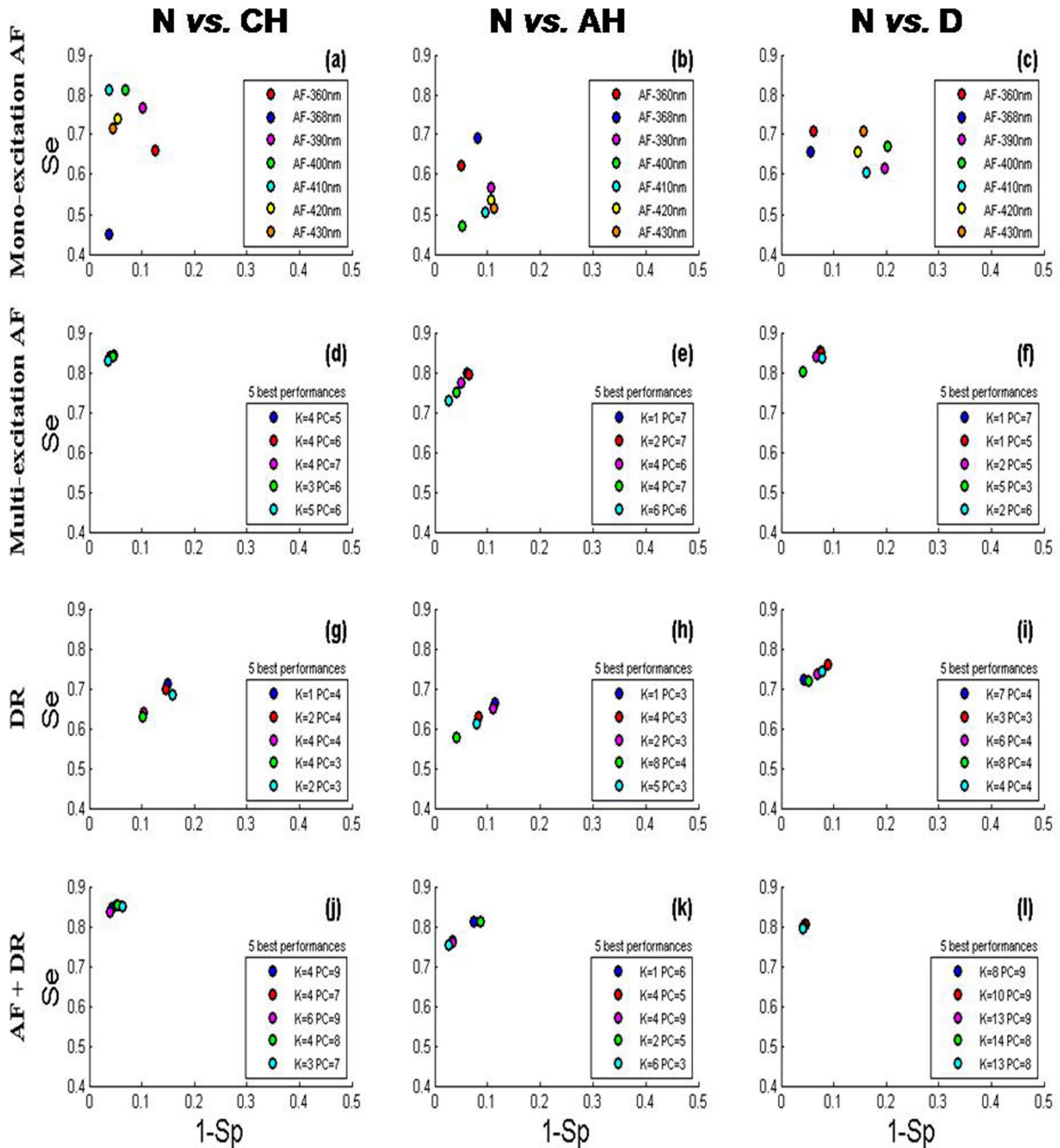


Fig. 13: Receiver Operating Characteristic (ROC) curves for the discrimination between Normal mouse skin and the three types of hyperplasia (Compensatory Hyperplasia, CH; Atypical Hyperplasia, AH; and Dysplasia, D):

- First row (a, b and c): mono-excitation autofluorescence (AF) spectroscopy. Optimum [Se, sensitivity; Sp, specificity] couple is displayed for each excitation wavelength (red, 360 nm; dark blue, 368 nm; pink, 390 nm; green, 400 nm; light blue, 410 nm; yellow, 420 nm and orange, 430 nm)

- Second row (d,e and f): multi-excitation autofluorescence. The best five classification performances are displayed with corresponding numbers of neighbors (k) and Principal Components (PC) (dark blue, red, pink, green and light blue)

- Third row (g, h and i): Diffuse Reflectance. Same color coding as above.

Fourth row (j, k and l): Bimodality i.e. multi-excitation autofluorescence combined to diffuse reflectance. Same color coding as above. In (l) points are very close and nearly superposed.

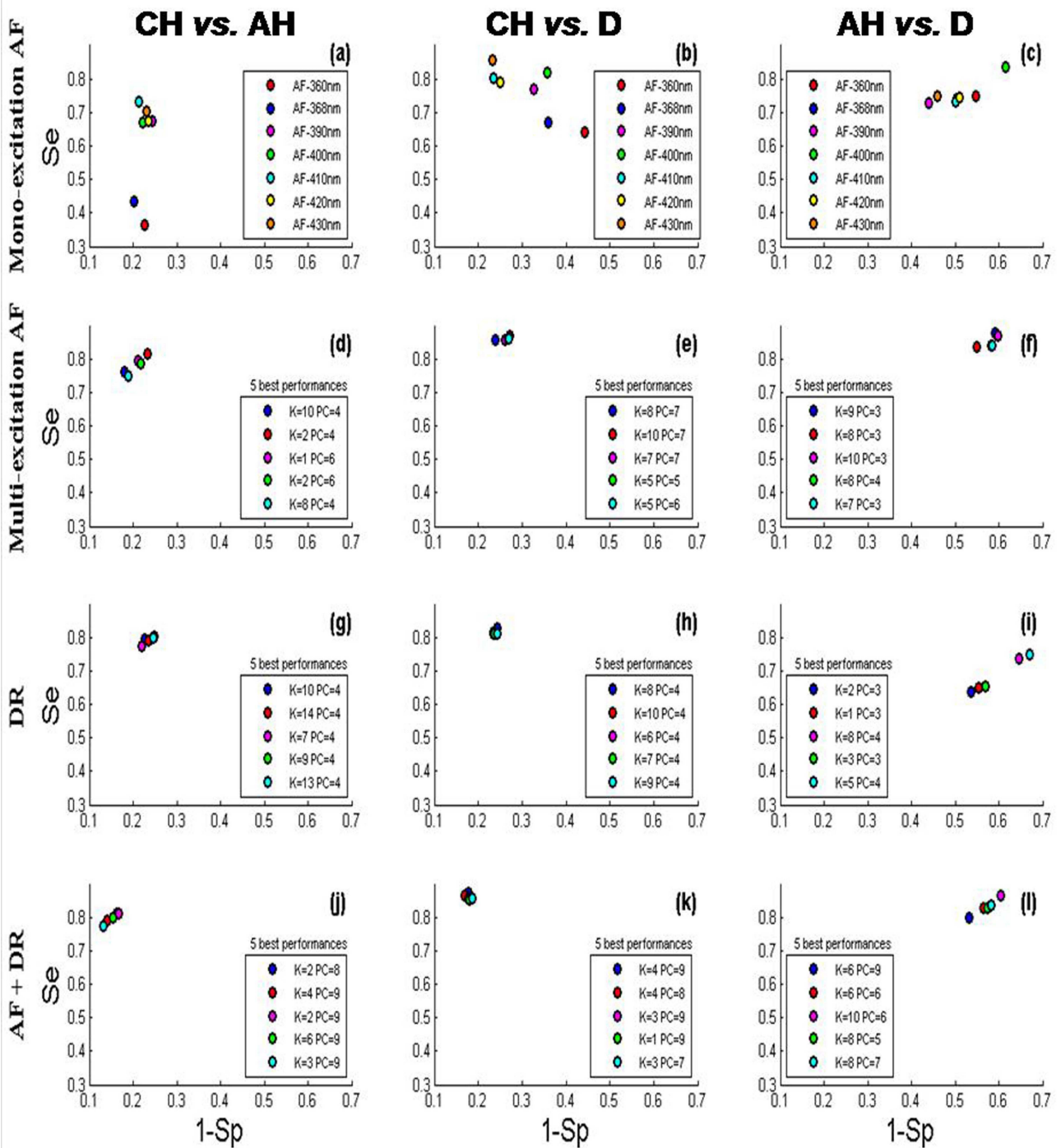


Fig. 14: Receiver Operating Characteristic (ROC) curves for the discrimination between the three types of hyperplasia from one another (Compensatory Hyperplasia, CH; Atypical Hyperplasia, AH; and Dysplasia, D):

- **First row (a, b and c): mono-excitation autofluorescence (AF) spectroscopy.** Optimum {Se, sensitivity; Sp, specificity} couple is displayed for each excitation wavelength (red, 360 nm; dark blue, 368 nm; pink, 390 nm; green, 400 nm; light blue, 410 nm; yellow, 420 nm and orange, 430 nm)

- **Second row (d, e and f): multi-excitation autofluorescence.** The best five classification performances are displayed with corresponding numbers of neighbors (k) and Principal Components (PCs) (dark blue, red, pink, green and light blue)

- **Third row (g, h and i): Diffuse Reflectance.** Same color coding as above.

- **Fourth row (j, k and l): Bimodality i.e. multi-excitation autofluorescence combined to diffuse reflectance.** Same color coding as above.

4 Conclusion

To our knowledge, the current study is the first one giving bimodal spectroscopic evaluation of different stages of UV-irradiated mouse skin. We used an animal model to study changes in tissue throughout the carcinogenesis sequence because such information is not available with human patients. Based on epidermis and dermis morphological characteristics, a classification of UV-irradiated mouse skin stages was performed. With this classification, compensatory hyperplastic (CH) states were distinguished from atypical hyperplastic and dysplastic ones (AH and D). The former ones are considered to be benign and the second ones to be precancerous. Our results show that visible wavelengths tend to achieve better classification performance than the shorter ones (360 and 368 nm) to discriminate benign from precancerous skin samples. These are encouraging results for clinical application since such visible wavelengths are harmless. Combining several excitation wavelengths improves diagnostic sensitivity while combining modalities (DR and multi-excitation AF) improves diagnostic specificity especially when discriminating the three types of hyperplasia from one another. These results suggest that bimodal spectroscopy could be an accurate technique to discriminate normal and benign states (H and CH) from precancerous ones (AH and D). We believe sensitivity and specificity of the method could be improved using several collection optical fibers instead of a single one. Indeed combining information from a number of points located at variable distances from the excitation optical fiber will probe the tissue at several depths²³ resulting in a potential better discrimination between the different histological classes. This work is currently in progress: data from collection fibers set at 536 and 834 μm from the excitation fiber are being combined to the ones collected at 271 μm presented in the current paper to investigate if this combination improves the classification accuracy. In order to confirm the diagnostic potential of the method, a further step will be to assess it in a clinical trial.

Acknowledgment

This work was supported by the French association “Ligue Contre le Cancer (CD 52, 54)”, Nancy-University and the Region Lorraine. Authors would like to acknowledge the European Union high-level program for Latin America (AlBan program), scholarship # E05D057651MX as well as Fiacre Rougieux.

References

- ¹ M. Mogensen and B.E. Gregor, “Diagnosis of nonmelanoma skin cancer/keratinocyte carcinoma: a review of diagnostic accuracy of nonmelanoma skin cancer diagnostic tests and technologies,” *Dermatol. Surg.* **33**(10), 1158-1174 (2007).
- ² E. LeBoit, G. Burg, D. Weedon and A. Sarasin, *Pathology and Genetics of Skin Tumours*, IARC Press, Lyon (2006).
- ³ R. Lewis Kelso, M.I. Colome-Grimmer, T. Uchida, H.Q. Wang, and R.F. Jr. Wagner, “p75(NGFR) immunostaining for the detection of perineural invasion by cutaneous squamous cell carcinoma,” *Dermatol. Surg.* **32**(2), 177-183 (2006).
- ⁴ H. Tehrani, J. Walls, S. Cotton, E. Sassoon, and P. Hall, “Spectrophotometric intracutaneous analysis in the diagnosis of basal cell carcinoma: a pilot study,” *Int. J. Dermatol.* **46**(4), 371-375 (2007).
- ⁵ P. Diagaradjane, M. A. Yaseen, J. Yu, M. S. Wong, and B. Anvari, “Autofluorescence Characterization for the Early Diagnosis of Neoplastic Changes in DMBA/TPA-Induced Mouse Skin Carcinogenesis,” *Lasers Surg. Med.* **37**, 382-395 (2005).
- ⁶ V. E. Reeve, S. Widyarini, D. Domanski, E. Chew, and K. Barnes, “Protection against photoaging in the hairless mouse by the isoflavone equol,” *Photochem. Photobiol.* **81**(6), 1548-1553 (2005).
- ⁷ A. P. Pentland, G. Scott, J. A. Vanbuskirk, C. Tanck, G. LaRossa, and S. Brouxon, “Cyclooxygenase-1 Deletion Enhances Apoptosis but Does Not Protect Against Ultraviolet Light-Induced Tumors,” *Cancer Res.* **64**, 5587-5591 (2004).
- ⁸ F. R. de Gruijl and J. C. van der Leun, “Physical variables in experimental photocarcinogenesis and quantitative relationships between stages of tumor development,” *Front. Biosci.* **7**, 1525-1530 (2002).
- ⁹ V. Molho-Pessach and M. Lotem, “Ultraviolet radiation and cutaneous carcinogenesis,” *Curr. Probl. Dermatol.* **35**, 14-27 (2007).
- ¹⁰ E. L. Franco and T. E. Rohan, *Cancer precursors, Epidemiology, detection, and prevention*, Springer-Verlag, New York (2002).
- ¹¹ K. E. de Visser, L. M. Coussens, T. Dittmar, K. S. Zaenker, and A. Schmidt, *The Inflammatory Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Development. Infection and Inflammation: Impacts on Oncogenesis*, Karger, Basel (2006).
- ¹² S. K. Chang, Y. N. Mirabal, E. N. Atkinson, D. Cox, A. Malpica, M. Follen, and R. Richards-Kortum, “Combined reflectance and fluorescence spectroscopy for in vivo detection of cervical pre-cancer,” *J. Biomed. Opt.* **10**(2), 024031 (2005).
- ¹³ T. M. Breslin, F. Xu, G. M. Palmer, C. Zhu, K. W. Gilchrist, and N. Ramanujam, “Autofluorescence and Diffuse Reflectance properties of Malignant and Benign Breast Tissue,” *Ann. Surg. Oncol.* **11**, 65–70 (2004).
- ¹⁴ I. Georgakoudi, B.C. Jacobson, J. Van Dam, V. Backman, M.B. Wallace, M.G. Müller, Q. Zhang, K. Badizadegan, D. Sun, G.A. Thomas, L.T. Perelman, and M.S. Feld, “Fluorescence, reflectance, and light-scattering spectroscopy for

evaluating dysplasia in patients with Barrett's Esophagus," *Gastroenterology* **120**, 1620-1629 (2001).

¹⁵ W. J. Marshall and S.K. Bangert, *Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects*, Churchill Livingstone, Edinburgh (2008).

¹⁶ V. Kumar, R. S. Cotran and S. L. Robbins, *Robbins basic pathology*, Saunders, Philadelphia (2007).

¹⁷ S. D. Kamath and K. K. Mahato, "Optical pathology using oral tissue fluorescence spectra : classification by principal component analysis and k-means nearest neighbor analysis," *J. Biomed. Opt.* **12**(1), 014028 (2007).

¹⁸ Y. Wu, P. Xi, J.Y. Qu, T.-H. Cheung, and M.-Y. Yu, "Depth-resolved fluorescence spectroscopy reveals layered structure of tissue," *Opt. Express* **12**(14), 3218-3223 (2004).

¹⁹ Y. Wu, P. Xi, J.Y. Qu, T.-H. Cheung, and M.-Y. Yu, "Depth-resolved fluorescence spectroscopy of normal and dysplastic cervical tissue," *Opt. Express* **13**(2), 382-388 (2005).

²⁰ A.-M. Pena, M. Strupler, T. Boulesteix, G. Godeau, and M.-C. Schanne-Klein, "Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy," *Opt. Express* **13**(16), 6268-6274 (2005).

²¹ M.C. Skala, J.M. Squirrell, K.M. Vrotsos, J.C. Eichkhoff, A. Gendron-Fitzpatrick, K.W. Eliceiri, and N. Ramanujam, "Multiphoton microscopy of endogenous fluorescence differentiates normal, precancerous, and cancerous squamous epithelial tissues," *Cancer Res.* **65**(4), 1180-1186 (2005).

²² D.C. de Veld, M. Skurichina, M.J. Witjes, R.P. Duin, H.J. Sterenberg, and J.L. Roodenburg, "Clinical study for classification of benign, dysplastic, and malignant oral lesions using autofluorescence spectroscopy," *J. Biomed. Opt.* **9**(5), 940-950 (2004).

²³ Q. Liu and N. Ramanujam, "Sequential estimation of optical properties of a two-layered epithelial tissue model from depth-resolved ultraviolet-visible diffuse reflectance spectra," *Appl. Opt.* **45**, 4776-4790 (2006).

III.4 Journal of Biomedical Optics, 2008, en révision

Monte Carlo modeling of multi-layer tissues with multiple fluorophores: simulation algorithm and experimental validation on phantoms

Emilie Péry, Walter C.P.M. Blondel, Cédric Thomas
Nancy University
Automatic Control Research Centre (CRAN)
UMR 7039 Nancy University - CNRS
2, avenue de la Forêt de Haye
F-54516 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

François Guillemain
Nancy University
Automatic Control Research Centre (CRAN)
UMR 7039 Nancy University - CNRS
Anticancer centre "Centre Alexis Vautrin" (CAV)
Avenue de Bourgogne
54511 Vandoeuvre-Lès-Nancy, France
(Dated: September 8, 2008)

This work describes firstly a statistical simulation algorithm developed for simulating the spectral absorption and emission of several fluorophores in an absorbing and diffusing multi-layer model. Secondly, a detailed experimental validation of the simulation program was conducted on two sets of liquid and solid multi-layer phantoms, containing one, two or three fluorophores, within absorbing and scattering media. Experimental spatially resolved reflectance spectra were acquired in the wavelength band [400-800 nm] and compared to corresponding simulated spectra. The degree of similarity between experimentation and simulation data was quantified. The results obtained underline good correlations with mean errors varying from 2% to 10% with the number of layers and the phantom's composition complexity.

I. INTRODUCTION

Modeling of absorption, diffusion and fluorescence phenomena in a biological tissue makes possible studying the distribution of light that propagates in it, while taking into account its intrinsic optical properties [1, 2]. These physico-optics characteristics depend on notably the concentrations, the sizes, the morphologies, the spatial orientations, the biochemical composition and the metabolic activity of the compounds of the tissue as well as their structural organization (cell and conjunctive tissue layers varying as a function of organ type for instance) [3]. These elements are fundamental characteristics of the gold standard histological diagnosis of healthy and pathological states of biological tissues. Among the main tissular absorbing elements (chromophores) can be found melanin, haemoglobin and water [4]. The elastic scattering of light in tissues is due to the variations of the indices of refraction between intra- and extra-cellular elements (nuclear cells, cell organelles...) [5]. Finally, multiple fluorescing macromolecules exist also naturally in living tissues such as proteins (collagen, elastin), enzymes and co-enzymes (various forms of flavins, NAD), or porphyrins [6]. These intrinsic fluorophores have relatively different excitation

and emission spectra covering spectral bandwidths of 280-450 nm and 350-700 nm respectively. These fundamental elements are processed by diagnosis optical methods for *in vivo* biological tissue characterization [7-9].

Consequently, the knowledge and/or the identification of tissue optical properties is required in many clinical applications such as *in vivo* diagnosis and non invasive follow-up, photodynamic therapy (PDT) or laser surgery... [10]. A large part of photodiagnosis methods aim at cancerology applications and particularly studies of epithelial tissues (hollow organs, skin) where 85% of the cancers uprise. The implementation of spectroscopic methods *in situ* can easily be performed by means of multiple fibre probes (i.e. called point spectroscopy or optical biopsy) [6, 11]. The diagnosis efficiency of such approaches has already been validated separately for autofluorescence, diffuse reflectance and elastic scattering spectroscopies on numerous tissues (skin [11, 12], cervix [13], oral mucosa [14, 15], bladder [16], breast [17]... However, it can still be increased by combining together those methods as shown for cervix [8, 18], breasts [19], head and neck [20], bronchial tree [21] and oral cavity [22].

Models of light propagation in tissues are of importance and needed in a number of works where the extraction of local intra-tissular information based on global surface measurements is a challenge (fluence spatial distribution, oxygen or chromophore concentration,

*Electronic address: emilie.pery@ensem.inpl-nancy.fr, walter.blondel@ensem.inpl-nancy.fr

intrinsic fluorescence quantification, optical coefficient identification . . .) [2, 3, 9, 23–26].

Monte Carlo method has been widely used during the past twenty years in a lot of studies for simulating the propagation of light in turbid and complex medium like biological tissues are [27]. It consists in propagating a packet of elementary energy (photon or group of photons) step-by-step, with random sampling of the length and the direction of the displacement steps, and of the proportion of energy absorbed in each elementary voxel of the medium, with reference to probability distribution functions depending on the optical coefficients of the medium.

The advantage of this statistical simulation method is for providing firstly, accurate results whatever the inter-fibre or source-detector distances and secondly, detailed spatial distribution of fluence while taking into account a large number of parameters: intensity spectra of the excitation source, locations and geometries of illumination and light collection, local coefficients of absorption and diffusion, refractive indices and dioptries. . . [28]

Wilson *et al.* [29] and Flock *et al.* [30] were among the first to introduce the use of Monte Carlo method for modeling light-tissue interactions and propagation in multi-layer structures. They validated their algorithm on highly diffusing phantoms at an unique wavelength of 633 nm. In 1993, Wu *et al.* [31] proposed a monolayer theoretical model coupling absorption, diffusion and fluorescence and taking into account the quantum yield and an isotropic emission of fluorescence. An experimental validation performed on arterial tissues highlighted that intrinsic fluorescence information may be extracted from global co-localized measurements of fluorescence and diffuse reflectance.

Between 1992 and 1995, Wang *et al.* [28, 32] developed MCML (Monte-Carlo for Multi-Layered media), reference program in C code for simulation in multi-layer models, free on the web, and widely used since then for simulating light absorption and light diffusion between 350 and 1000 nm, in various experimental configurations [33, 34], and on different types of tissues [3, 5, 27, 35]. . . . In comparison, fluorescence simulation has been partially implemented in few works. In 1997, Zeng *et al.* [2] simulated fluorescence excitation and emission following two steps: Monte Carlo calculation of the fluence distribution at one excitation wavelength of 442 nm, then fluorophore excitation with reference to that distribution and final calculation of the propagation for fluorescence emission (7-layer model, 470-750 nm bandwidth). Following the same approach, Welch *et al.* in 1997 [36] applied Monte Carlo for simulating in a multi-layer model the propagation of an excitation light at 476 nm and the emission of fluorescence light at 600 nm in order to study factors that influence the shape of the autofluorescence spectra measured. They showed that 90% of the emitted fluorescence measured comes

from thicknesses of tissue up to 0.5 mm (at 476 nm). This algorithm was then modified by Drezek *et al.* in 2001, and applied to cervical tissues (mono-excitation at 380 nm) [37]. Müller *et al.* [23] validated in 2001 a correction method of the absorption and diffusion contributions in order to recover an intrinsic fluorescence spectra, taking into account the spectral dimension of the optical coefficients. However, the algorithm proposed was not validated for fluorophores with high quantum efficiency and high absorption, and secondary emission of fluorescence was not implemented. In 2003, Liu *et al.* [27] were the first to describe precisely an algorithm of statistical simulation of fluorescence with one excitation wavelength and one emission wavelength. They also gave the expressions of the optical coefficients of the model with reference to absorption and diffusion by fluorescence. A rigorous experimental validation was carried out with fluorescence and diffuse reflectance on phantoms for an excitation wavelength of 460 nm and an emission one at 520 nm. Recently, in 2007, Ma *et al.* [26] compared the results obtained with a simplified analytical model of fluorescence and a simplified method of Monte Carlo for simulating time resolved fluorescence. They observed that the Monte Carlo method give better results when fluorophores lie in areas close to the source and to the detection fibres as well as for short inter-fibre distances. In this case, the diffusion approximation (analytic) may be used for a first and rapid estimate.

Thus, one of the current difficulties resides in the coupled simulation of absorption, diffusion and multiple fluorescence in a multi-layer medium, over a broad spectral band. Furthermore, these works also confirm the necessity for rigorous experimental validation of simulation algorithms prior to proper application to biological tissues. Consequently, this paper presents the principle of an algorithm developed for simulating the spectral absorption and emission of several fluorophores in a multi-layer model. The experimental validation of the program implemented in C is performed with reflectance data measured at different distances between excitation and collection fibres on various mono and multi-layer phantoms containing absorbing, diffusing and fluorescing compounds.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Monte Carlo Simulations

Basic principle and fundamental algorithm.

The simulation of spatially resolved light transport in multi-layered models has already been widely well described in the literature [28, 38, 39]. We use these basis for developing our algorithm for multiple fluorescence.

A semi-infinite medium with N layers parallel to each other is considered, with one excitation optical fibre and several emission or collecting fibres (Fig. 1). Each layer is

described by the following parameters: thickness e (mm), absorption coefficient $\mu_a(\lambda)$ (cm^{-1}), scattering coefficient $\mu_s(\lambda)$ (cm^{-1}), refractive index n , and anisotropy factor $g(\lambda)$.

Briefly, the principle of random migration of photons consists in displacing a large number of photons or photon packets (usually at least a few hundreds of thousands) in directions and over distances drawn at random with reference to density probability functions characterizing the medium (μ_a, μ_s, g).

Firstly, the source photons with an unitary initial “weight” are injected at origin coordinates from a random position inside the excitation fibre diameter. Each new 3D direction of propagation is determined by statistical sampling of:

- the deflection angle θ in $[0, \pi]$, i.e. the angle between previous and new direction lines in the same plane, defined by its cosine based on the Henyey-Greenstein scattering phase function [40] as:

$$\cos \theta = \frac{1}{2g} \left(1 + g^2 - \left(\frac{1 - g^2}{1 - g + 2g\xi} \right)^2 \right) \quad (1)$$

with ξ a random variable uniformly distributed between 0 and 1.

- the azimuthal angle (angle with the previous plane) ξ in $[0, 2\pi]$ defined as:

$$\phi = 2\pi\xi \quad (2)$$

The distance traveled by the photon in the new direction is defined as a step Δs of variable size randomly drawn as a function of probability density depending on the optical parameters of the layer:

$$\Delta s = - \frac{\ln \xi}{\mu_a + \mu_s} \quad (3)$$

After each displacement (step), a part of the photon’s weight is deposited due to absorption (proportional to the ratio of the optical coefficients) at the 3D-coordinates where the photon is in the medium. The propagation of a photon ends up either when its decreasing weight reaches a low threshold value or when they leave the medium. The weight of the photon going out of the medium at coordinates corresponding to the positions of the emission fibres are finally registered.

Algorithms previously developed for fluorescence simulation.

Since 2003, main works already published have validated simulation algorithms for fluorescence in the case of mono-fluorophore and mono-layer models [27]. Liu *et al* [27] experimentally verified Monte Carlo modeling of fluorescence and diffuse reflectance measurements in turbid, tissue like phantom models. Considering the optical parameters of a fluorophore μ_{af} (absorption coefficient

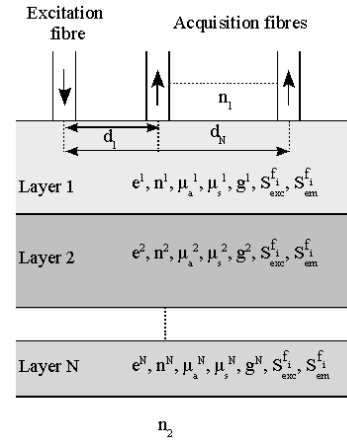


FIG. 1: Schematic representation of the N-layered model used

to simulate light transport in phantoms. $e = \sum_{i=1}^N e_i$ is the total thickness of the phantom and $n^i, \mu_a^i, \mu_s^i, g^i, S_{exc}^i$, and S_{em}^i are respectively the refractive index, the absorption coefficients, the scattering coefficients, the anisotropy factors for the N-layers, and the excitation and emission spectra of the fluorophore. n_1 and n_2 are the refractive index of surrounding medium, i.e. air ($n_1 = 1$) and plastic ($n_2 = 1.46$).

of the fluorophore) and ϕ (fluorescence quantum yield), the authors have defined the absorption probability for fluorescence like:

$$p = \mu_{af} / (\mu_a + \mu_{af} + \mu_s) \quad (4)$$

The experimental validation was performed on phantoms with various concentrations of india ink as an absorber, polystyrene balls as diffusing elements, and FAD (Flavin Adenin Dinucleotide) as fluorophore, at a unique excitation of 460 nm and for measurements at a unique emission wavelength of 520 nm.

Churmakov *et al* [41] simulated the spatial fluorescence distribution within the human skin. In their simulation algorithm, each photon packet produces only one fluorescent event. Their simulation results suggest that distribution of autofluorescence is significantly suppressed in the near-infrared spectral region. In 2004, Chang *et al* [42] compared the results of Monte Carlo simulations and of an analytical model of fluorescence in a two-layer model applied to normal and preneoplastic epithelial tissue. Their results show that the analytical model provides a good description of fluorescence for the normal and precancerous cervical epithelium and stroma’s optical properties. Finally, Matuszak *et al* [43] implemented the simulation of fluorescence spectra following two steps: the simulation of the excitation spectrum to obtain the intensity of light inside cells containing a fluorophore and then, the simulation of emitted photons (emission spectra).

Simulation algorithm developed for multiple fluorescence (proposed solution).

Simulation algorithm developed for multiple fluorescence (proposed solution).

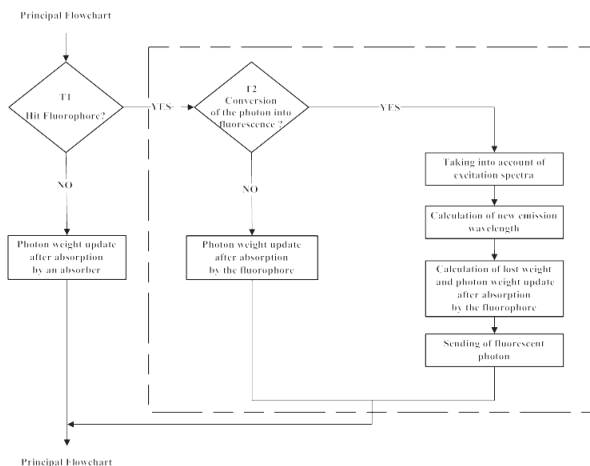


FIG. 2: Flowchart of the fluorescence algorithm part of the main standard Monte Carlo simulation program.

Each layer of the medium is considered homogeneous and can contain one or more fluorophores expressed in the model by the following complementary parameters: absorption coefficient $\mu_{af}(\lambda)$, fluorescence quantum yield $\phi(\lambda)$, emission spectra $S_{em}^{f_i}(\lambda)$ and molecular concentration of the fluorophores (Fig. 1).

The implementation of multiple fluorescence includes three principal steps: firstly the absorption of a photon by a fluorophore as a function of its absorption spectra and concentration in the medium, secondly the choice of an emission wavelength with reference to its emission spectra, thirdly the generation of the fluorescence photon in a new direction. These various stages are detailed on the flowchart in Fig. 2 which is part of the main classical Monte Carlo algorithm.

Considering an absorbing and diffusing medium containing n fluorophores with absorption coefficients $\mu_{af_i}(\lambda)$ and associated quantum yields $\phi_i(\lambda)$ ($i \in [1, n]$), the stepsize Δs is calculated like:

$$\Delta s = -\frac{\ln \xi}{\mu_t} \quad (5)$$

$$\text{with } \mu_t = \mu_a + \sum_{i=1}^n \mu_{af_i} + \mu_s$$

where $\xi \in [0, 1]$ is a random number generated from a uniform probability distribution.

At each absorption event, a first test T_1 is carried out to decide if it is statistically due to a fluorescent compound or not. The probabilities p_{abs} that a photon is absorbed by a “pure” absorber and p_{f_i} that a photon is absorbed by a fluorophore f_i can be defined respectively as:

$$p_{abs} = \frac{\mu_a}{\mu_t} \quad \text{and} \quad p_{f_i} = \frac{\mu_{af_i}}{\mu_t} \quad (6)$$

Therefore, a “standardized” random number is calculated:

$$\xi_{norm} = \xi \times \left(\frac{\mu_a + \sum_i \mu_{af_i}}{\mu_t} \right) \quad (7)$$

$$(8)$$

and it is decided that the photon is absorbed either by a “pure” absorber if $0 \leq \xi_{norm} < p_{abs}$, or by the fluorophore f_i if $p_{abs} + \sum_{i=0}^{n_{f_{max}}-1} p_{f_i} \leq \xi_{norm} \leq$

$$p_{abs} + \sum_{j=i+1}^{n_{f_{max}}} p_{f_j} \quad (p_{f_0} = 0, n_{f_{max}} \geq 2).$$

In the first case (photon absorbed by a “pure” absorber), the photon weight is updated with:

$$\omega_a = \omega_b \left(1 - \frac{\mu_a}{\mu_a + \sum_i \mu_{af_i} + \mu_s} \right) \quad (9)$$

ω_b , ω_a are the photon weights before and after absorption.

In the second case (photon absorbed by a fluorophore f_i), another test T_2 is performed in order to decide if conversion into fluorescence happens or not, depending on the fluorophore quantum yield. Again, the principle consists in generating a random number ξ uniformly distributed between 0 and 1.

- If this random number is higher than the quantum yield value ϕ ($\phi < \xi \leq 1$), then the incident photon is not converted into fluorescence. It continues its way until the next event, after having updated its energy level with reference to μ_{af_i} such as:

$$\omega_a = \omega_b \left(1 - \frac{\mu_{af_i}}{\mu_a + \sum_i \mu_{af_i} + \mu_s} \right) \quad (10)$$

- If $0 \leq \xi \leq \phi$, then the incident photon is fully absorbed and a new photon of fluorescence is generated at the same coordinates in the medium. The first propagation direction of the new emission photon is randomly sampled between 0° and 360° .

The emission wavelength of the new photon is also randomly sampled according to a probability distribution corresponding to the emission spectrum of the fluorophore, whatever the absorption wavelength. For example, would a fluorophore have an emission peak at a given wavelength, the highest the probability emission of a fluorescence photon at this wavelength would be.

Knowing the values of the emission spectrum $S_{em}^{f_i}(\lambda)$ for each fluorophore f_i , the following probability of emission of a fluorescence photon at wavelength λ_j is associated:

$$p[\text{photon}(\lambda_j)] = v'(\lambda_j) = \frac{v(\lambda_j)}{\sum_{j=1}^n v(\lambda_j)} \quad (11)$$

where $j \in [1, n]$ and n account for the total number of points (wavelengths) used to discretize the emission spectrum.

A photon of fluorescence can cause another event of absorption-fluorescence (“cascade” effect). In addition, an incident photon absorbed at a wavelength λ_{abs} can not be converted to an emission photon with a wavelength lower than λ_{abs} .

In the program developed based on the flowchart in Fig.2, a specific file was created for each fluorophore in each layer, in which values of absorption and emission spectra, quantum yield and absorption coefficient of fluorophores are stored. The simulation is made in the ascending way, i.e. the lowest wavelength to the highest one, with 10 nm sampling steps.

Finally, the function of cumulative distribution $C_{v'}$ such as $C_{v'}(\lambda_j) = \sum_{i=1}^j v'(\lambda_i)$ with $j \in [1, n]$ is used to choose the wavelength of emission in the following way:

$$\begin{cases} \text{if} & \xi \leq C_{v'}(\lambda_1) \\ & \Rightarrow \text{emission at wavelength } \lambda_1 \\ \text{if} & C_{v'}(\lambda_{j-1}) < \xi \leq C_{v'}(\lambda_j) \text{ for } j \geq 2, \\ & \Rightarrow \text{emission at wavelength } \lambda_j \end{cases} \quad (12)$$

with $\xi \in [0, 1]$ a uniformly distributed random number.

B. Instrumentation Set-up for Experimental Validation

We used a spatially resolved reflectance spectroscopy configuration. It consists in two sources: a laser diode (Laser 2000, France) at $\lambda_{exc} = (410 \pm 5)$ nm for the autofluorescence excitation, and a deuterium-tungsten halogen light source (DH2000, Ocean Optics, USA) for the diffuse reflectance broadband illumination (stable output from 210 to 1700 nm). Diffuse reflectance and autofluorescence intensity spectra were measured using an imaging spectrograph (iHR320, Horiba Jobin Yvon, France) with a back illuminated CCD detector, and a diffraction grating (150 gr/mm, blaze wavelength: 500 nm). A specific multiple fibre entrance (probe with 200 μm core diameter fibres and inline bundle at the entrance of spectrograph). It allows multitrack operation, i.e. the simultaneous acquisition of 13 spectra corresponding to 13 different distances between illumination and

acquisition fibres (271 to 1542 μm). Results shown in the present paper are given for only one distance between illumination and acquisition fibres (271 μm) but the results obtained were verified and validated for all the other distances.

In order to improve signal to noise ratio, three spectra were automatically acquired for averaging. In order to improve reproducibility, a tripod was used for maintaining the fibre probe at a fixed position perpendicular to the phantom surface.

C. Test Phantoms

Phantoms were prepared with specific fluorophores, absorption and scattering properties and dimensions detailed hereafter. Liquid phantoms were made of absorber, scatterer and one or two fluorophores, ethanol being used as thinner for the liquid phantoms since emission and absorption spectra of the fluorophores used here are given with ethanol as thinner [32]. Interest of mono-fluorophore phantoms was to check the good correlation between measurements and simulation results. Interest of multi-fluorophores phantoms was to check if the cascade effect is correctly taken into account. Then, multi-layers solid phantoms were prepared in two and three layers with one or two fluorophores.

The Indian ink (Super Black India ink, Lefranc/Bourgeois, France) was selected as the absorber. The absorption coefficient of pure India ink, is available in [27], and the absorption coefficient of India ink diluted with water (Kabi-Fresenius) at 0.011% was measured using a spectrophotometer (Lambda EZ210, in DCPR Department of Physics Chemistry of the Reactions, Nancy).

Intralipids (Sigma Aldrich) were chosen as scatterer. They are often employed as scatterers because they do not have a strong absorption band in the visible. They are an intravenous nutrient consisting of an emulsion of phospholipid micelles and water, easily available and relatively inexpensive [30, 44, 45]. Optical coefficients of intralipids are available in [30]. Figure 3 represents the absorbance and the scattering coefficient as a function of wavelength for pure Indian ink and intralipids respectively.

Three fluorophores were selected for our experiments with reference to their distinct or partially overlapping emission spectra: eosin Y ($C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$, Sigma Aldrich), fluorescein ($C_{20}H_{12}O_5$, Fluka) and cryptocyanine ($C_{25}H_{25}IN_2$, Sigma Aldrich). Indeed, eosin Y dissolved in ethanol has a quantum yield of 0.67 at 490 nm, fluorescein a quantum yield of 0.79 at 425 nm and cryptocyanine a quantum yield of 0.007 at 650 nm [32]. Moreover, fluorescein is quoted in several articles for creation and validation of equipment [46, 47].

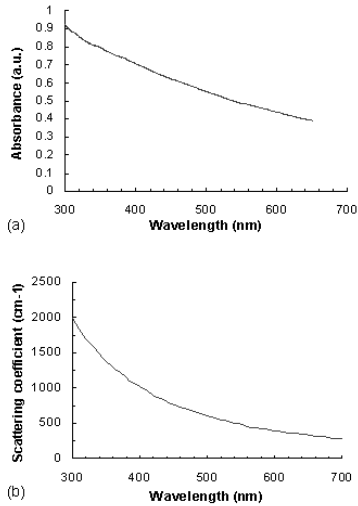


FIG. 3: (a) Pure India ink absorbance spectrum [27], (b) Scattering coefficient of intralipids 10% [30].

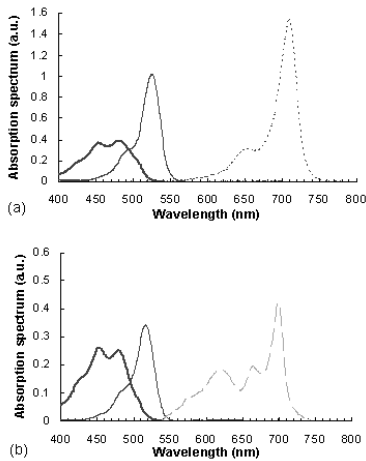


FIG. 4: Fluorescein (full line), eosin (thin line) and cryptocyanine (dotted line) absorption spectrum measured (a) in ethanol for liquid phantoms [32], (b) in water (spectrophotometer Lambda E270, DCPR, Nancy) for solid phantoms.

Figure 4 represents the absorption spectrum of fluorescein, eosin and cryptocyanine in ethanol for liquid phantoms [32], and in water for solid phantoms, also measured in DCPR (Nancy).

For all the phantoms, the fluorophores are weighed systematically to obtain a quantity of $10 \mu\text{mol}$ of product. All simulations were performed with 1 000 000 photons launched at 40 wavelengths between 400 and 800 nm with 10 nm steps (i.e. 40 millions photons per spectrum), to ensure the convergence of results.

Liquid Phantoms. Four liquid phantoms were realized: L_1 (3.32 mg of fluorescein, 8 mL of ethanol), L_2 (6.47 mg

of eosin, 8 mL of ethanol), L_3 (4.8 mg of cryptocyanine, 8 mL of ethanol), L_4 (3.32 mg of fluorescein, 4.8 mg of cryptocyanine in 16 mL of ethanol like thinner). All solution phantoms were versed in a black container comparable with one expanded polystyrene container, until reaching a height of 5 mm. The L_4 phantom mixing two fluorophores was realized to test the proper operation of cascading effect (or secondary fluorescence emission due to another fluorescence photon).

Solid mono- and multi-layer Phantoms. We used a solution of agarose (Agarose L, VWR Prolabo, France) at 5% (0.35 mg of agarose powder and 8 mL of distilled water), that has the property to become liquid at 82°C and solid towards 35°C . Contribution of light scattering and fluorescence from agarose was checked to be negligible compared to the contributions of fluorophores with the wavelengths of excitation chosen for our experiments. Mono- and multi-layer thicknesses were measured on sample sections with a vernier micrometer (error: ± 0.02 mm).

A first set of bi-layered phantoms with one fluorophore (MC_1, MC_2, MC_3) was made with at the bottom (second layer, thickness $e_1 = 3$ mm), 3.32 mg of fluorescein and 0.35 g of agarose powder in 8 mL distilled water, and at the top (first layer, thickness $e_1 = 2.8$ mm), either 5 mL of Indian ink diluted at 0.011% (MC_1), or 5 mL of intralipids at 10% (MC_2), or a mixture of both (MC_3). For this set of phantoms, the first layer was kept in solution in order to avoid optical properties modifications of intralipids due to heating. A complementary single layer phantom (MC_4) was also made with 3.32 mg fluorescein, 0.35 g of agarose powder and 8 mL of distilled water (thickness: 3 mm) in order to compare the spectral responses obtained for the previous bi-layered phantoms to the one of the second layer alone.

A second set of two or three-layered phantoms was made with two different fluorophores. One bilayer phantom (MC_5) was composed of 6.47 mg of eosin, 0.35 g agarose and 8 mL of water on top layer (thickness: 3 mm) and of 3.32 mg of fluorescein, 0.35 g of agarose powder and 8 mL of distilled water at the bottom layer (thickness: 2.7 mm). The tri-layered phantom (MC_6) was composed of, on top layer (thickness: 2.7 mm), Indian ink diluted at 0.011%, on middle layer (thickness: 2 mm), 6.47 mg of eosin, 0.35 g of agarose powder and 8 mL of distilled water and, and at the bottom layer (thickness: 5.4 mm), of 3.32 mg of fluorescein, 0.35 g of agarose powder and 8 mL of distilled water.

Table I recapitulates the characteristics and composition of the 6 types of multi-layer phantoms tested.

In order to quantify the difference between experimental and corresponding simulated spectra, we calculated, for all phantoms, the mean of normalized differences as

TABLE I: Characteristics of multi-layers phantoms.

Phantom	MC ₁	MC ₂	MC ₃	MC ₄	MC ₅	MC ₆
1 st layer	5 mL India ink diluted at 0.011% (Solution 1)	5 mL intralipids at 10% (Solution 2)	2.5 mL Solution 1 2.5 mL Solution 2	-	6.47 mg eosin 0.35 g agarose powder 8 mL distilled water (Solution 4)	Solution 1 (Solution 4)
	$e_1 = 2.8$ mm				$e_1 = 3$ mm	$e_1 = 2.7$ mm
2 ^d layer		3.32 mg fluorescein 0.35 g agarose powder 8 mL distilled water (Solution 3)		-	Solution 3	Solution 4
		$e_2 = 3$ mm			$e_2 = 2.7$ mm	$e_2 = 2$ mm
3 ^d layer	-	-	-	Solution 3	-	Solution 3
				$e_3 = 3$ mm		$e_3 = 5.4$ mm

follows:

$$Error_{mean} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{S_{exp}(\lambda_i) - S_{sim}(\lambda_i)}{S_{exp}(\lambda_i)} \right| \quad (13)$$

with N the number of curve points, $S_{exp}(\lambda)$ the experimental reflectance spectrum, $S_{sim}(\lambda)$ the simulated reflectance spectrum.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Primary validation by comparison to simulation results from literature

The proper operation of our program including our fluorescence algorithm was first verified for absorption and diffuse reflectance without fluorophore. Therefore, our results were compared to other Monte Carlo simulation results referenced in the literature with identical model parametrization [28, 38, 48].

The total diffuse reflectance of a monolayer slab of a turbid medium was computed with the following optical properties: absorption coefficient $\mu_a = 10 \text{ cm}^{-1}$, scattering coefficient $\mu_s = 90 \text{ cm}^{-1}$, anisotropy factor $g = 0.75$, relative refractive index $n = 1$ (i.e. refractive-index-matched boundary), and thickness $e = 0.02 \text{ cm}$. Ten Monte Carlo simulations with 50 000 launched photons per wavelength were completed. The average and the standard error of the total diffuse reflectance are summarized in Table II together with the results from Van de Hulst [48], Prahl *et al* [38] and Wang *et al* [28]. All results agree with each other.

In the same way, we computed the average and the standard error of the total diffuse reflectance for a semi-infinite turbid medium that has mismatched refractive

index with the ambient medium and optical properties: $\mu_a = 10 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 90 \text{ cm}^{-1}$, $g = 0$ (isotropic scattering), $n = 1.5$. Ten Monte Carlo simulations with 5 000 photons per wavelength were completed. Here also, our results are in good correlation with the ones from Giovanelly [49], Prahl *et al* [38] and Wang *et al* results [28] as shown in Table II.

As a primary validation, those results confirm that our program with fluorescence algorithm added operates properly in the absence of fluorophore in the simulation model.

B. Validation with phantoms in solution

The correlation between simulated and measured emission spectra for each fluorophore was first verified using mono-fluorescence phantoms in solution (phantoms L₁, L₂, and L₃). Experimental and simulation curves are shown in Fig. 5. Spectra were normalized with reference to their peak value. A relatively good correlation is obtained with errors values of 2.2, 1.9, and 2.5% respectively for phantoms L₁, L₂, and L₃.

In order to test the proper operation of secondary fluorescence absorption (i.e. cascading fluorescence emission due to the absorption of another “already emitted” fluorescence photon), results in single and multiple (or cascading) excitation were compared for the phantom L₄ (fluorescein, cryptocyanine, ethanol) (Fig. 6).

We observe that there is a good correlation between experimental and simulated reflectance spectra given in Fig. 6 with a mean error of 5.3%. The emission intensity spectra of fluorescein between 480 and 650 nm (peak at 540 nm) and of cryptocyanine at wavelengths above 700 nm (emission peak at 730 nm) can be clearly noticed

TABLE II: Comparison of published simulation results of average and standard errors of total diffuse reflectance R_d obtained for a slab of thickness $e = 0.02$ cm with a matched boundary ($\mu_a = 10 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 90 \text{ cm}^{-1}$, $g = 0.75$, $n = 1$) and for a semi-infinite medium with a mismatched boundary ($\mu_a = 10 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 90 \text{ cm}^{-1}$, $g = 0$, $n = 1.5$).

Model	Source	R_d Average	R_d Error
Slab with a matched boundary ($e=0.02$ cm)	Van de Hulst [48]	0.09739	-
	Prahl <i>et al</i> [38]	0.09711	0.00033
	Wang <i>et al</i> [28]	0.09734	0.00035
	Our program	0.09737	0.00019
Semi-infinite medium with a mismatched boundary	Giovanelli [49]	0.26000	-
	Prahl <i>et al</i> [38]	0.26079	0.00079
	Wang <i>et al</i> [28]	0.25907	0.00170
	Our program	0.26204	0.00138

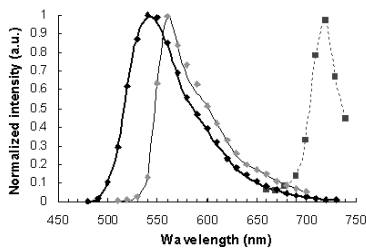


FIG. 5: Diffuse reflectance spectra measured (full line) and simulated (points) for single fluorophore phantoms L_1 , L_2 , and L_3 made respectively of fluorescein / ethanol (full line), eosin / ethanol (thin line), and cryptocyanine / ethanol (dotted line).

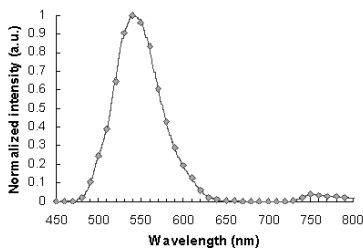


FIG. 6: Experimental (full line) and simulated (points) reflectance spectra for a two-fluorophores phantom in solution L_4 (fluorescein / cryptocyanine / ethanol).

and their proportional contribution are well reproduced by the simulation algorithm including cascading fluorescence.

C. Validation with multi-layered phantoms

Experimental and simulated reflectance spectra for multi-layered phantoms MC_1 (India ink / fluorescein), MC_2 (intralipids / fluorescein), MC_3 (India ink / intralipids / fluorescein) and MC_4 (fluorescein) are given

in Fig. 7. The latter also highlights the way the reflected fluorescence spectra are modified by the presence of absorbing and diffusing layers.

Looking at MC_4 and MC_1 phantom's spectra comparatively, it can be noticed that the addition of a purely absorbing top layer (India ink) leads to a global amplitude attenuation, while the overall shape of the spectrum stays similar. By comparing MC_4 and MC_2 spectra, we may observe that the presence of a diffusing top layer (intralipids) causes a strong attenuation of the collected signal and also a change in the curve shape. In the case of phantom MC_3 , the absorbing and diffusing top layer leads to attenuation and shape modification of the reflected spectra.

For these four different configurations, the results obtained experimentally and by simulation agree well. The lowest mean percent error obtained between experimental and simulated spectra is 2.5% for phantom MC_4 (fluorescein), 6.0% for MC_2 (intralipids, fluorescein), 7.1% for MC_1 (India ink, fluorescein), and the maximum mean percent error is 9.4% for MC_3 (India ink, intralipids, fluorescein). It can be noticed that the mean percent error is slightly higher for the solid phantom MC_4 (2.5%) than for the phantom L_1 in solution (2.2%).

Figures 8(a) and 8(b) represent the measured and simulated reflectance spectra respectively for the bi-layers phantom MC_5 with two fluorophores (eosin in top layer, and fluorescein in bottom layer) and for the tri-layers phantom MC_6 with the same two fluorophore layers and an upper absorbing layer (India ink / eosin / fluorescein). The mean percent error calculated between experimental and simulated spectra is 9.3% for the bi-layers phantom MC_5 with two fluorophores (eosin, fluorescein) and 10.6% for the tri-layers phantom MC_6 (India ink, eosin, fluorescein). It is to noticed that the mean percent error increases with the addition of an absorbing layer, and with the number of layers (increased thickness).

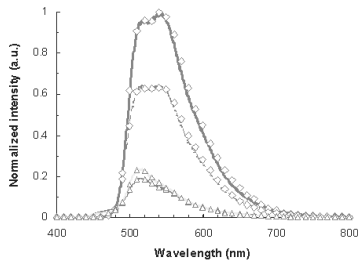


FIG. 7: From top to bottom: experimental (full line) and simulated (points) reflectance spectra for phantoms MC₄ (fluorescein), MC₁ (India ink / fluorescein), MC₃ (India ink / intralipids / fluorescein) and MC₂ (intralipids / fluorescein) from top to bottom.

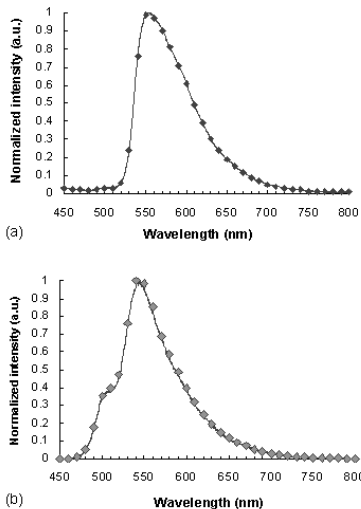


FIG. 8: Measured (full line) and simulated (points) reflectance spectra (a) for a bi-layers phantom MC₅ with two fluorophores (eosin in top layer, and fluorescein in bottom layer), and (b) for a tri-layers phantom MC₆ with the same two fluorophores but with an upper absorbing layer added (India ink / eosin / fluorescein).

Execution times vary with the composition of the phantoms, and more particularly with the optical parameters used in the simulation. Using a pentium 4, 2.4 GHz and 512 Mo RAM computer, execution times (20 million photon per spectra) vary from 6 min for MC₄ (fluorescein, agarose) to 34 min for three-layered phantom MC₆ with two fluorophores (India ink, eosin, fluorescein). Simulation time is doubled between mono-

layer mono-fluorophore phantom MC₄ and bi-layer bi-fluorophore MC₅ (15 min).

IV. CONCLUSION

A Monte Carlo algorithm has been developed for simulating the spectral absorption, diffusion and multiple fluorescence in a multi-layer medium, over a broad spectral band. As a primary validation, the correct operation of our program including our fluorescence algorithm was first verified in relation to other Monte Carlo simulation results referenced in literature for absorption and diffuse reflectance without fluorescence (same parametrization). The main experimental validation consisted in comparing the reflectance spectra measured on phantoms of various complexities to Monte Carlo simulated spectra of their corresponding models (mono- and multi-layered). Four phantoms in solution with three different fluorophores and six mono- and multi-layered solid phantoms with one or two fluorophores were used. The good correlation between simulated and experimentally measured results was quantified based on mean error calculations. For phantoms in solution, the mean percent errors vary from 1.9% (one fluorophore) to 5.3% (two fluorophores). For multi-layered phantoms, these errors go from 6.0% (two layers), to 9.4% for the tri-layers phantom. The error values vary as a function of the complexity of the phantom i.e. the model (for a fixed number of photons launched). Finally, the proper operation of “secondary fluorescence” (fluorescence emission due to the absorption of another already emitted fluorescent photon) has been demonstrated.

This model proves appropriate for applications to biological tissues, in which the contribution of absorbers, scatterers, and fluorophores vary. More specifically this work will be used for *in vivo* tissue diagnosis such as pre-cancer and cancer detection, where the identification of proper values of the optical parameters for these tissues implies to take into account the associated phenomenon of multiple fluorescence.

Acknowledgments

The Authors would like to thank the Region Lorraine and the Ligue Contre le Cancer (CD 52, 54) for their financial support, and C. Frochot (DCPR, Nancy) for complementary spectrophotometric measurements.

[1] E. Drakaki, M. Makropoulou, and A. Serafetinides, “*In vitro* fluorescence measurements and Monte Carlo simulation of laser irradiation propagation in porcine skin tissue,” *Lasers in Medical Science*, 2007, epub ahead of print.

[2] H. Zeng, C. MacAulay, D. McLean, and B. Palcic, “Reconstruction of *in vivo* skin autofluorescence spectrum from microscopic properties by Monte Carlo simulation,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol. 38, no. 2-3, pp. 238–240, 1997.

- [3] I. Meglinski and S. Matcher, "Quantitative assessment of skin layers absorption and skin reflectance spectra simulation in the visible and near-infrared spectral regions," *Physiological Measurement*, vol. 23, pp. 741–753, 2002.
- [4] G. Palmer, C. Marshek, K. Vrotsos, and N. Ramanujam, "Optimal methods for fluorescence and diffuse reflectance measurements of tissue biopsy samples," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 30, no. 3, pp. 191–200, 2002.
- [5] P. Thueler, I. Charvet, F. Bevilacqua, M. Ghislain, G. Ory, P. Marquet, P. Meda, B. Vermeulen, and C. Depeursinge, "In vivo endoscopic tissue diagnostics based on spectroscopic absorption, scattering, and phase function properties," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 8, no. 3, pp. 495–503, 2003.
- [6] I. Bigio and J. Mourant, "Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 42, pp. 803–814, 1997.
- [7] J. Tunnel, A. Desjardins, L. Galindo, I. Georgakoudi, S. McGee, J. Mirkovic, M. Mueller, J. Nazemi, F. Nguyen, A. Wax, Q. Zhang, R. Dasari, and M. Feld, "Instrumentation for multi-modal spectroscopic diagnosis of epithelial dysplasia," *Technology in Cancer Research and Treatment*, vol. 2, no. 6, pp. 505–514, 2003.
- [8] S. Chang, Y. Mirabal, E. Atkinson, D. Cox, A. Malpica, M. Follen, and R. Richards-Kortum, "Combined reflectance and fluorescence spectroscopy for in vivo detection of cervical pre-cancer," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 10, no. 2, pp. 1–11, 2005.
- [9] Y. Wu and J. Qu, "Autofluorescence spectroscopy of epithelial tissues," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 11, no. 5, pp. 1–11, 2006.
- [10] V. Tuchin, *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*. The International Society for Optical Engineering, 2002, ch. Pulse and frequency-domain techniques for tissue spectroscopy and imaging, pp. 355–986.
- [11] O. A'Amar and I. Bigio, "Spectroscopy for the Assessment of Melanomas," in *Reviews in Fluorescence 2006*, vol. 3. Springer, New York, 2006, pp. 359–386.
- [12] L. Brancalion, A. Durkin, J. Tu, G. Menaker, J. Fallon, and N. Kollias, "In vivo fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 73, no. 2, pp. 178–183, 2001.
- [13] N. Marin, A. Milbourne, H. Rhodes, T. Ehlen, D. Miller, L. Benedet, R. Richards-Kortum, and M. Follen, "Diffuse reflectance patterns in cervical spectroscopy," *Gynecologic Oncology*, vol. 99, no. 3, pp. S116–S120, 2005.
- [14] D. De Veld, M. Skurichina, M. Witjes, R. Duin, H. Sterenberg, and J. Roodenburg, "Clinical study for classification of benign, dysplastic, and malignant oral lesions using autofluorescence spectroscopy," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 9, no. 5, pp. 940–950, 2004.
- [15] D. De Veld, M. Witjes, H. Sterenberg, and J. Roodenburg, "The status of in vivo autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology: Review," *Oral Oncology*, vol. 41, no. 2, pp. 117–31, 2005.
- [16] W. Zheng, W. Lau, C. Cheng, K. Soo, and M. Olivo, "Optimal excitation-emission wavelengths for autofluorescence diagnosis of bladder tumors," *International Journal of Cancer*, vol. 104, pp. 477–481, 2003.
- [17] C. Zhu, G. M. Palmer, T. Breslin, J. Harter, and N. Ramanujam, "Diagnosis of breast cancer using diffuse reflectance spectroscopy: Comparison of a Monte Carlo versus partial least squares analysis based feature extraction technique," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 38, pp. 714–724, 2006.
- [18] I. Georgakoudi, E. Sheets, M. Müller, V. Backman, C. Crum, K. Badizadegan, R. Dasari, and M. Feld, "Trimodal spectroscopy for the detection and characterization of cervical precancers in vivo," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 186, no. 3, pp. 374–382, 2002.
- [19] T. Breslin, F. Xu, G. Palmer, C. Zhu, K. Gilchrist, and N. Ramanujam, "Autofluorescence and Diffuse Reflectance Properties of Malignant and Benign Breast Tissues," *Annals of Surgical Oncology*, vol. 11, no. 1, pp. 65–70, 2004.
- [20] M. Muller, T. Valdez, I. Georgakoudi, V. Backman, C. Fuentes, S. Kabani, N. Laver, Z. Wang, C. Boone, R. Dasari, S. Shapshai, and M. Feld, "Spectroscopic Detection and Evaluation of Morphologic and Biochemical Changes in Early Human Oral Carcinoma," *Cancer*, vol. 97, no. 7, pp. 1681–1692, 2003.
- [21] M. Bard, A. Amelink, M. Skurichina, V. N. Hegt, R. Duin, H. Sterenberg, H. Hoogsteden, and J. Aerts, "Optical spectroscopy for the classification of malignant lesions of the bronchial tree," *American College of Chest Physicians*, vol. 129, no. 4, pp. 995–1001, 2006.
- [22] D. De Veld, M. Skurichina, M. Witjes, R. Duin, H. Sterenberg, and J. Roodenburg, "Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy for oral oncology," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 36, no. 5, p. 356–364, 2005.
- [23] M. Müller, I. Georgakoudi, Q. Zhang, J. Wu, and M. Feld, "Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: disentangling effects of scattering and absorption," *Applied Optics*, vol. 40, no. 25, pp. 4633–4646, 2001.
- [24] I. Meglinski and S. Matcher, "Computer simulation of the skin reflectance spectra," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 70, pp. 179–186, 2003.
- [25] P. Diagaradjane, M. Yaseen, J. Yu, M. Wong, and B. Anvari, "Autofluorescence characterization for the early diagnosis of neoplastic changes in DMBA/TPA-induced mouse skin carcinogenesis," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 37, no. 5, pp. 382–395, 2005.
- [26] G. Ma, J.-F. Delorme, P. Gallant, and D. Boas, "Comparison of simplified Monte Carlo simulation and diffusion approximation for the fluorescence signal from phantoms with typical mouse tissue optical properties," *Applied Optics*, vol. 46, no. 10, pp. 1686–1692, 2007.
- [27] Q. Liu, C. Zhu, and N. Ramanujam, "Experimental validation of Monte Carlo modeling of fluorescence in tissues in the UV-visible spectrum," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 8, pp. 223–236, 2003.
- [28] L.-H. Wang, S. Jacques, and L.-Q. Zheng, "MCML - Monte Carlo modelling of light transport in multi-layered tissues," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 47, pp. 131–146, 1995.
- [29] B. Wilson and G. Adam, "A Monte Carlo model for the absorption and flux distribution of light in tissue," *Medical Physics*, vol. 10, pp. 824–830, 1983.
- [30] S. Flock, S. Jacques, B. Wilson, W. Star, and M. van Gemert, "Optical Properties of Intralipid: A phantom medium for light propagation studies," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 12, pp. 510–519, 1992.
- [31] J. Wu, M. Feld, and R. Rava, "Analytical model for ex-

- tracting intrinsic fluorescence in turbid media,” *Applied Optics*, vol. 32, no. 19, pp. 3585–3595, 1993.
- [32] O. OMLC, “Optical Spectra,” <http://omlc.ogi.edu/spectra/>, 2004.
- [33] I. M. D.Y. Churmakov and D. Greenhalgh, “Influence of refractive index matching on the photon diffuse reflectance,” *Physics in Medicine and Biology*, vol. 47, no. 23, pp. 4271–4285, 2002.
- [34] G. Palmer and N. Ramanujam, “Monte Carlo-based inverse model for calculating tissue optical properties. Part I: Theory and validation on synthetic phantoms,” *Applied Optics*, vol. 45, no. 5, pp. 1062–1071, 2006.
- [35] G. Palmer, Z. Changfang, T. Breslin, X. Fushen, K. Gilchrist, and N. Ramanujam, “Monte Carlo-based inverse model for calculating tissue optical properties. Part II: Application to breast cancer diagnosis,” *Applied Optics*, vol. 45, no. 5, pp. 1072–1078, 2006.
- [36] A. Welch, C. Gardner, R. Richards-Kortum, E. Chan, G. Criswell, J. Pfefer, and S. Warren, “Propagation of Fluorescent Light,” *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 21, pp. 166–178, 1997.
- [37] R. Drezek, K. Sokolv, U. Utzinger, I. Boiko, A. Malpica, M. Follen, and R. Richards-Kortum, “Understanding the contributions of NADH and collagen to cervical tissue fluorescence spectra: Modeling, measurements, and implications,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 6, no. 4, pp. 385–396, 2001.
- [38] S. Prahl, M. Keijzer, S. Jacques, and A. Welch, “A Monte Carlo Model of Light Propagation in Tissue,” P. of SPIE, Ed., vol. IS 5, 1989, pp. 102–111.
- [39] S. Jacques, “Light distributions from point, line and plane sources for photochemical reactions and fluorescence in turbid biological tissues,” *Photochemistry and Photobiology*, vol. 67, no. 1, pp. 23–62, 1998.
- [40] L. Henyey and J. Greenstein, “Diffuse radiation in the galaxy,” *Astrophysical Journal*, vol. 93, pp. 70–83, 1941.
- [41] D. Churmakov, I. Meglinsky, S. Piletsky, and D. Greenhalgh, “Analysis of skin fluorescence distribution by the Monte Carlo simulation,” *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 36, pp. 1722–1728, 2003.
- [42] S. Chang, D. Arifler, R. Drezek, M. Follen, and R. Richards-Kortum, “Analytical model to describe fluorescence spectra of normal and preneoplastic epithelial tissue: comparison with Monte Carlo simulations and clinical measurements,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 9, no. 3, pp. 511–522, 2004.
- [43] Z. Matuszak, A. Sawow, and M. Wasilewska-Radwanska, “Fluorescence spectra of some photosensitizers in solutions and in tissue-like media. Experiment and Monte Carlo simulation,” *Polish Journal of Medical Physics and Engineering*, vol. 10, no. 4, pp. 209–221, 2004.
- [44] H. van Staveren, C. Moes, J. van Marle, S. Prahl, and M. van Gemert, “Light scattering in Intralipid-10% in the wavelength range of 400-1100 nanometers,” *Applied Optics*, vol. 30, pp. 4507–4514, 1991.
- [45] A. Giusto, R. Saija, M. Iat, P. Denti, F. Borghese, and O. Sindoni, “Optical properties of high-density dispersions of particles: Application to intralipid solutions,” *Applied Optics*, vol. 42, no. 21, pp. 4375–4380, 2003.
- [46] K. Vishwanath, B. Pogue, and M. Mycek, “Quantitative fluorescence lifetime spectroscopy in turbid media: comparison of theoretical, experimental and computational methods,” *Physics in Medicine and Biology*, vol. 47, pp. 3387–3405, 2002.
- [47] V. Yadavalli, R. Russell, M. Pishko, M. McShane, and G. Cote, “A Monte Carlo simulation of photon propagation in fluorescent poly(ethylene glycol)hydrogel microsensors,” *Sensors and Actuators B*, vol. 105, pp. 365–377, 2004.
- [48] H. Van de Hulst, *Multiple Light Scattering: Tables, Formulas, and Applications*. New York: Academic Press, 1980, vol. 2.
- [49] R. Giovanelli, “Reflection by Semi-infinite Diffusers,” *Journal of Modern Optics*, vol. 2, no. 4, pp. 153–162, 1955.

III.5 European Journal of Physics – Applied Physics, 2008, accepté pour publication

Bimodal spectroscopic evaluation of ultra violet-irradiated mouse skin inflammatory and pre-cancerous stages: instrumentation, spectral feature extraction/selection and classification (k-NN, LDA and SVM)

G. Díaz-Ayil¹, M. Amouroux¹, W.C.P.M. Blondel¹, G. Bourg-Heckly², A. Leroux³, F. Guillemin^{1,3} and Y. Granjon¹

¹ Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Nancy-University, CRAN UMR 7039 CNRS-Nancy University, 2 avenue de la Forêt de Haye, 54516 Vandoeuvre-les-Nancy, France

² Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Cellulaire et Tissulaire, BioMoCeTi UMR 7033 CNRS-Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Genopole Campus 1, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France

³ Centre Alexis Vautrin, 6 avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France

Received: date / Revised version: date

Abstract. This paper deals with the development and application of in vivo spatially-resolved bimodal spectroscopy (AutoFluorescence AF and Diffuse Reflectance DR), to discriminate various stages of skin precancer in a pre-clinical model (UV-irradiated mouse): Compensatory Hyperplasia CH, Atypical Hyperplasia AH and Dysplasia D. A programmable instrumentation was developed for acquiring AF emission spectra using 7 excitation wavelengths: 360, 368, 390, 400, 410, 420 and 430 nm, and DR spectra in the 390-720 nm wavelength range. After various steps of intensity spectra preprocessing (filtering, spectral correction and intensity normalization), several sets of spectral characteristics were extracted and selected based on their discrimination power statistically tested for every pair-wise comparison of histological classes. Data reduction with Principal Components Analysis (PCA) was performed and 3 classification methods were implemented (k-NN, LDA and SVM), in order to compare diagnostic performance of each method. Diagnostic performance was studied and assessed in terms of Sensibility (Se) and Specificity (Sp) as a function of the selected features, of the combinations of 3 different inter-fibres distances and of the numbers of principal components, such that: Se and $Sp \approx 100\%$ when discriminating CH *vs.* others; $Sp \approx 100\%$ and $Se > 95\%$ when discriminating Healthy *vs.* AH or D; $Sp \approx 74\%$ and $Se \approx 63\%$ for AH *vs.* D.

Keywords: spectral data classification, in vivo spectroscopy, autofluorescence, diffuse reflectance.

PACS. 87.64.-t Spectroscopic and microscopic techniques in biophysics and medical physics – 87.80.-y Biophysical techniques (research methods) – 07.60.-j Optical instruments and equipment

1 Introduction

Because outdoor activities and esthetic considerations (such as skin tanning) are of growing interest in western countries, fair-skinned populations have been more and more exposed to sun light in the past decades. Since solar ultra-violet (UV) radiation is the main environmental cause of skin cancer, the incidence of the three major forms of skin cancer (melanoma, squamous cell carcinoma (SCC) and basal cell carcinoma) is growing. Even though most deaths are attributable to melanoma, SCC is the most common life-threatening cancer type [1]. In dermatology, diagnosis is based on direct visualisation of the lesion. Because such observation depends on personal experience of the physician, lesions may be falsely considered benign, may not undergo biopsy, and therefore may not be subjected to the reference diagnostic gold

standard i.e. histo-pathology [2]. Currently, full diagnosis of suspicious skin lesions implies excision-biopsy of the lesion followed by anatomo-pathological examination. Such a diagnosis process is invasive and thus implies pain, increased morbidity and substantial damage to nearby healthy skin (esthetic inconvenience). Moreover the sensitivity of this method is limited because only a few tissue samples can be biopsied in a suspicious area. Noninvasive methods such as MRI, ultrasounds and spectroscopy have the potential to eliminate these problems and also to permit the monitoring of treatment effects [3]. Optical methods (imaging and spectroscopy) in the UV - Visible - Near-Infra-Red spectral range are of particular interest because they are harmless (using the non-ionizing part of the electromagnetic spectrum) and sensitive to morphologic and functional modifications of biological

tissues occurring during early stages of cancer development [4]. Furthermore to improve inter-observer agreement and diagnosis accuracy (sensitivity and specificity), optical spectroscopy can be useful by providing physicians with more objective criteria. Spectroscopy methods are based on interactions of light with biological tissues. During the past twenty years, Diffuse Reflectance (DR) and AutoFluorescence (AF) spectroscopies have been the most investigated spectroscopy modalities [4]. DR spectroscopy is based on elastic scattering of photons within biological tissues. Elastic scattering is caused by variations in the refractive index of small particles in the medium, resulting in dispersion of light in all directions, without loss of energy, i.e. no wavelength shift between incident and reflected light. Different types and sizes of scattering centers can be found within the tissue: collagen fibers, cellular membranes and subcellular structures (nuclei, mitochondria) [5]. AF spectroscopy is based on the analysis of fluorescence emission by endogenous molecules, i.e. materials that are natural constituents of biological tissues (intra or extra-cellular metabolic products). Such endogenous fluorophores are usually excited in the 300-450 nm spectral range. These molecules are related to the structure arrangement of cells and tissues (such as collagen, elastin, etc.) and to the cellular metabolism (such as NAD(P)H, flavins, etc.). As a result, different morpho-functional conditions of the skin related to pathologic alterations such as cancer development can be characterized using either AF, DR or both [5]. As shown in previous works [6–8], combining both modalities (DR and AF) provides a more accurate diagnosis (increased sensitivity and specificity). A typical optical spectroscopy set-up includes a light source, an optical fiber bundle (including excitation and collection fibers) put in gentle contact with the skin and a spectrometer. Optical fibers allow spectroscopy to be used not only on skin but also on less accessible anatomical sites such as hollow inner organs (bladder, oesophagus, cervix, etc.) Most optical fibre bundles are currently used with different Collection-to-Excitation Fibre Separations (CEFS) and with various geometrical configurations in order to optimize signal collection [9, 10] and to probe tissues at various depths. Systems for DR spectroscopy (380-950 nm or 300-800 nm) associated to AF excitations between 300 and 500 nm have been built and used in several studies [11–13]. They were composed of an arc-lamp and a monochromator in order to get a large number of fluorescence excitation wavelengths and wide spectral range for diffuse reflectance. These systems used 7 to 46-fibre bundles and highly sensitive multi-track acquisition devices (intensified CCD). The spectroscopic set of acquired data consists in AF and DR spectra whose shape and intensity vary as a function of tissue structure and CEFS. Such a set of spectra represents a large amount of data to be reduced and analyzed. Various methods of processing spectral data were previously described. They usually include three steps: i) features extraction: although full spectra can be directly processed, most of the time, specific spectral features (such as areas, peak intensities, ratios, etc.) are extracted; ii) spectral data set

reduction based on factorial analysis mostly using Principal Component Analysis (PCA); iii) classification based on different types of supervised and non-supervised algorithms, the latter allowing to calculate sensitivity (Se) and Specificity (Sp), both being diagnostic parameters of clinical interest, with reference to histological classes. The choice of the method will influence the obtained values of sensitivity and specificity.

The aim of the current work is to assess bimodal spectroscopy's accuracy in classifying UV-irradiated mouse skin samples into four histological precancerous classes. The objectives are threefold: i) develop a bimodal spectroscopy instrumentation for in vivo acquisition of AF and DR spectra from mouse skin. Since the measurement protocol lasted for several months, calibration and normalization procedures were developed to account for the system throughput variations (light source intensity, acquisition set-up) over the 30-week period of time; ii) extract an extended set of "a priori" spectral data, then select the most discriminative ones with reference to each pair-wise discrimination; iii) investigate whether improvements in classification performance could be obtained using different linear classification methods (namely k-Nearest Neighbor, Linear Discriminant Analysis or Support Vector Machine).

2 Materials and Methods

2.1 Bimodal multi-excitation spectroscopy set-up

Figure 1 presents a scheme of the developed multi-excitation-collection spatially resolved spectroscopic system. Source light injected in the excitation fibre (Fexc) comes from a short-arc 300W Xenon lamp with a parabolic mirror (Eurosep, France). The lamp emits mainly in the 300-800 nm spectral range. An anti-caloric filter (F1) protects optical components from heating by infra-red wavelengths. Light from the lamp is focused at the entrance of the optical excitation fiber (Fexc) using the convex lens L1. A bandpass filter F2 is used to limit the excitation spectral range to 350-450 nm in order to avoid at best the transmission of light interfering with the endogenous fluorescence emission, mainly emit in the 450-700 nm range. The set-up consists in a dynamically-tunable excitation fluorescence system: center wavelength and Full Width at Half Maximum (FWHM) can be set thanks to the combination of linearly variable high-pass (FL1) and low-pass (FL2) filters. Both filters are fixed on translation stages (UMR 8.51, Newport) controlled by a motorized micrometric positioning system (actuators LTA-HS, 0.1 μm precision and XPS controller, Newport) used to tune excitation peaks (between 350 and 460 nm) as well as illumination bandwidths (FWHM between 15 and 25 nm) in a precise and repeatable way. For diffuse reflectance, three illumination spectral bands were selected: 365-545, 450-640 and 550-740 nm. We used a 37-optical fibre bundle (available CEFS are between 250 and 1500 μm). Up to 13 spectra can be acquired simultaneously thanks to a multi-track imaging spectrograph equipped with a UV back-illuminated

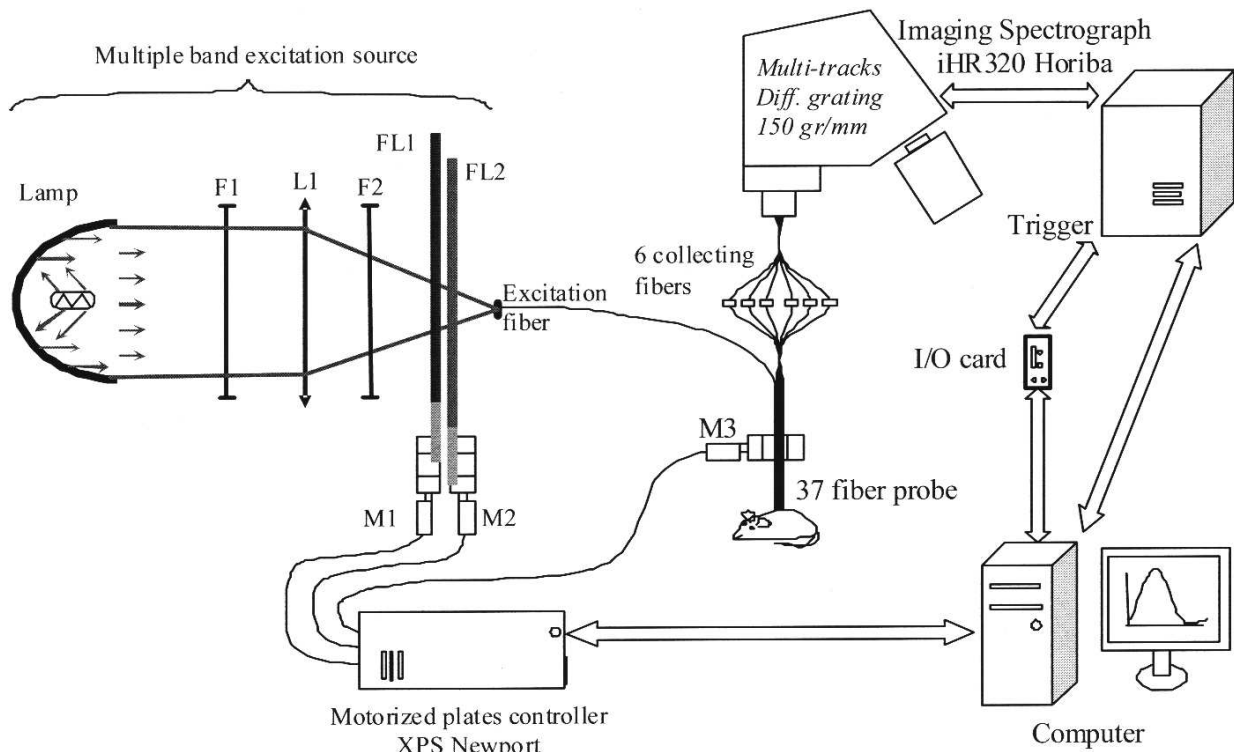


Fig. 1. Scheme of the bimodal spectroscopy device developed. Short arc lamp (300W Xenon), F1: antialoric filter, L1: convex lens, F2: bandpass filter, FL1 and FL2: high-pass and low-pass linearly variable filters, Fexc: exciting optical fibre, M1, M2 and M3: motorized micrometric positioning actuators used for linear displacement.

CCD (iHR 320, Horiba Jobin Yvon, France) and an emission filter-wheel with various filters used to reject the backscattered excitation light. For our application, we selected 3 different CEFS: 271, 536 and 834 μm so as to probe the tissue at various depths; as mentioned by Katika *et al.* [14] for instance, a 250 μm -CEFS provides information from a 100 μm -depth in the skin at 442 nm. Integration times were 500 ms and 50 ms for AF and DR respectively. Spectra were all acquired using a diffraction grating (150 lines/mm) blazed at 600 nm.

A dedicated software was developed using Visual C++ 6.0 (Microsoft corporation) in order to control the translation stage displacements (for excitation peaks and bands tuning) and to synchronize the excitation system with the iHR320 spectrometer acquisition using external triggering.

The system automatically switches from each acquisition wavelength to the following one. Such a combination of procedures can be repeated as many times as required. For each excitation, 3 spectra were acquired and averaged in order to improve signal-to-noise ratio.

2.2 Skin cancer animal model and experimental protocol

The device being described in the current paper was developed in order to diagnose pre-cancerous stages of Squamous Cell Carcinomas (SCC) which is the most lethal

form of non melanoma skin cancers. Skin tumours are induced by UV-irradiation of SKH1 mice (albino and hairless). We chose this way of inducing tumours (also called 'spontaneous' tumours) in order to remain as close to human etiology as possible. Twenty-eight mice were divided into three groups: group I included 8 sham-irradiated mice (control group), group II included 10 mice irradiated for 1 month (50 mJ/cm^2 weekly dose) and group III included 10 mice irradiated for 6 months (50 mJ/cm^2 once a week for the first 15 weeks then twice a week for the rest of the irradiation protocol). Mice were anesthetized with a mix of Ketamine and Xylazine during spectroscopic measurements. During the 30-week protocol, 2 mice a week were regularly euthanized and back skin was sampled. Each piece of skin was further fixed in 10% formaldehyde solution and 5 μm -slices were stained with standard Hematoxylin and Eosin (to evaluate epidermis features) and specific Weigert staining (to evaluate dermal elastic fibers). Then, based on histo-pathological criteria, main precancerous mouse skin stages characteristics were identified and skin samples were further classified in each of the four following classes: Healthy (H), Compensatory Hyperplasia (CH), Atypical Hyperplasia (AH) and Dysplasia (D). Such a classification was made thanks to a pathologist evaluation of epidermis and dermis features: epidermis thickness, presence of mitosis in upper layers of epidermis, hyperkeratosis, nucleated upper layers, heterogenous chromatin, cell layer disorganization,

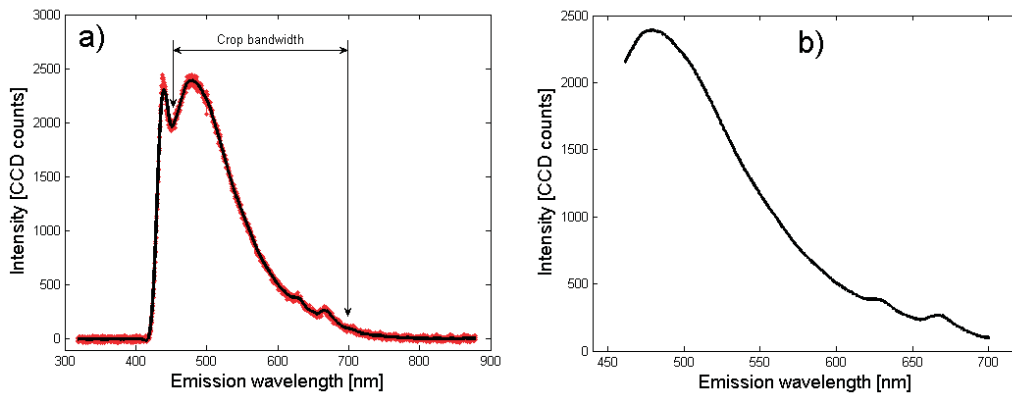


Fig. 2. Crop bandwidth, mean and filtered AF-410 nm emission. a) mean spectra (red), filtered spectra (black); b) crop bandwidth.

parakeratosis, dyskeratosis and elastosis.

Finally, the histological set of data used in the present contribution consisted of 84 healthy, 47 compensatory hyperplastic, 64 atypical hyperplastic and 57 dysplastic hyperplastic skin samples.

Colocalized AF and DR spectra were acquired on twelve spots of each mouse's back skin: six spots along the backbone on each side (left and right). Seven excitation wavelengths (360, 368, 380, 390, 400, 410, 420 and 430 nm) were used for AF spectroscopy and three illumination bands (365-545, 450-640 and 550-740 nm) were used for DR spectroscopy. Three Collection to Excitation Fibers Separations (CEFS) were used: 271, 536 and 834 μm .

2.3 Spectral Data Processing

2.3.1 Preprocessing (filtering, spectral correction, normalization)

After building 3D-matrices made of three (number of CEFS) 2D-matrices of 30 intensity spectra each (7 excitations for AF and 3 DR illumination bands, $n=3$ for each), a 6-step preprocessing was performed on raw AutoFluorescence (AF) spectra:

1. High amplitude narrow peak artefacts suppression: a 4 nm-width (15 points) sliding window was applied over the entire intensity spectra. Artefacts are detected based on a variance variation of more than 400% between successive windows. Then parasitic points are suppressed based on a 30 time-averaging with the previous data point.
2. The raw spectral intensity curves acquired are affected by a random measurement noise characterized by a Gaussian distribution. In order to improve the signal signal-to-noise ratio [15,7] 3 acquisitions in a row were systematically performed then averaged ($n=3$, maximum number compatible with acquisition time); by this way noise amplitude was reduced by 40%.
3. Residual high frequency was removed using a polynomial smooth filtering (Stavizky-Golay) [16]. The window size and order of the filter were determined for

each type of spectra (AF or DR) with reference to their specific shape characteristics. A 22 nm width window (2nd order) was applied to all AF spectra and 15 to 30 nm width window (2nd order) were used for DR depending on the spectra width band. The windows widths and filter order of the implemented filters were defined in particular to smooth "correctly" the informative narrowest parts of the curves while preserving the main shape (for instance porphyrin emission peaks of width 35-40 nm visible in the 620-690 nm band, figure 2a).

4. The curve of a typical AF emission spectrum (figure 2a) acquired can be subdivided in 3 parts, the central part being the useful informative one. The lower wavelengths part may exhibit residual intensities due to the backscattered excitation light (although filtered), and no more AF signals is observed above 700 nm. In order to only keep the useful part of the emission spectra acquired (figure 2b, crop bandwidth for 410 AF), we defined the following crop bandwidths of interest: 410-700nm for AF360 and AF368; 460-700nm for AF390, AF400 and AF410; 463-700nm for AF420; 476-700nm for AF430; and 390-720nm for DR.
5. The various components of the acquisition system i.e. optical probe, fibers, lenses, mirrors, diffraction gratings, CCD, have specific spectral responses which affect the shape and amplitude of the acquired spectra. Therefore a correction of the system throughput is needed and was applied thanks to a calibration lamp (HL 2000-CAL, Ocean Optics). Correction coefficients were calculated by dividing the experimentally measured calibration lamp spectrum (acquired with the same acquisition configurations as the ones that were used during mouse skin measurements) by the reference or calibrated spectrum of the lamp.
6. The excitation source (Lamp Xenon 300W) has a relative power output that decreases with the operation time. As measurement protocol lasted for several weeks, a correction method was implemented to take this diminution into account. Source light intensity variations were taken into account thanks to power measurements at the probe tip every day at start of

the experiment (Powermeter 841PE and detector UV 818-UV, Newport Corp.). Corrections were performed thanks to the division of raw spectra by the excitation light power measured on the same day of experiment.

For Diffuse Reflectance (DR) spectra, preprocessing approach was the same as the one used for AF spectra up to step # 4. In this case, once bandwidths of interest were defined, skin spectra were normalized by standard spectra acquired on a Lambertian surface (WS-1 Diffuse Reflection Standard, Ocean Optics) obtained at the shortest CEFS (271 μm).

2.3.2 Spectral features selection and data reduction

Based on our own observations of the main intensity and shape variations of acquired spectra and on previously published studies [17–23], we extracted 762 spectral features from each of the 24 spectra acquired on each skin spot (7 AF + 1 DR at each of the 3 CEFS):

- Areas: under the spectrum between λ_a and λ_b ($A_{\lambda_a-\lambda_b}$), under the the spectrum between λ_a and λ_b + spectral intensity contribution ($AT_{\lambda_a-\lambda_b}$), above the spectrum ($AA_{\lambda_a-\lambda_b}$), and normalized areas ($AN_{\lambda_a-\lambda_b}$)
- Ratio of intensities at λ_a and λ_b ($R_{\lambda_a-\lambda_b}$) and ratio of areas ($A_{\lambda_a-\lambda_b}/A_{\lambda_b-\lambda_c}$)
- Spectral fitting residual (F): a 10th – *degre* polynomial curve was fitted on the entire spectra and residual value registered
- Slope between λ_a and λ_b ($S_{\lambda_a-\lambda_b}$) and normalized slope ($NS_{\lambda_a-\lambda_b}$)
- Median (Me), mean (M) and standard deviation (SD) of the entire spectra

All these spectral characteristics for AF and DR are given in detail in Table 1.

A normality Lilliefors test was implemented in order to keep (for next statistical test) only the spectral characteristics with normal statistical distribution. Then, a T-Student test was performed between all pairs of histological classes to set 3 groups of spectral features that give a pair-wise discrimination of either 6, 5 or 4 pairs of histological skin classes (Table 2). Spectral features were extracted for each of the 3 CEFS: 271 (D1), 536 (D2) and 834 (D3) μm .

In order to test spatially-resolved bimodal spectroscopy's accuracy in discriminating either 6, 5 or 4 pairs of histological classes, we combined spectral features as indicated in Table 2: (D1 and D2), (D1 and D3), (D2 and D3) and (D1 and D2 and D3).

Once all the spectral features combinations were established, data were mean centered and Principal Component Analysis (PCA) was performed in order to reduce data set to a lower dimension and to provide uncorrelated data (Principal Components: PCs) for classification.

2.3.3 Classification

The results of three types of linear classification algorithm (k-NN, LDA and SVM) were compared. A super-

Table 2. Number of characteristics finally selected after statistical tests using each of the CEFS combinations of spatially-resolved bimodal spectroscopy (each distance D1, D2, D3 and their 4 possible combinations) for spectral features that allowed a pair-wise discrimination of either 6, 5 or 4 pairs of histological skin classes

Distance	D1	D2	D3	D1+D2+D3	D1+D2	D1+D3	D2+D3
6 pairs	6	2	5	13	8	11	7
≤ 5 pairs	44	59	83	186	103	127	142
≤ 4 pairs	83	98	125	306	181	208	223

vised classification was performed based on the results of histological analysis. The performance of this classification was expressed in the form of Sensibility Se (number of well classified pathologic samples) and Specificity Sp (number of well classified healthy samples) calculation. k-Nearest Neighbors (k-NN) is a simple classification method giving good results with normal and non normal populations [24]. Using the Euclidean distance measure, the distances between validation data set and the calibration data set is computed with k neighbors samples number, then each measurement in the validation set is assigned the majority class belonging to its closest k neighbors in the training set. A difficulty for this method is the determination of the appropriate k-value, this is the reason why we proposed to test a wide range of values (typically 1 to 15).

The Linear Discriminant Analysis (LDA) aims at defining a set of axes (so-called linear discriminant functions) that best represent the distances existing between groups of data with reference to their variances. This method maximizes the ratio of between-class variance to the within-class variance in any particular data set thereby guaranteeing maximal separability. It requires the data set to be normally distributed [25].

The Support Vector Machines (SVM) applies a transformation to the data (linear or nonlinear) in a greater dimension space, then applies a linear discrimination to separate the data. The objective of SVM is to obtain an optimal separating hyper-plane that maximizes the margin between two classes in a multidimensional data space. SVM was designed to be particularly effective in developing a reliable classifier from a training set with a small sample size [26–28].

For each of the three classification methods, algorithms to discriminate the 6 pairs of histological classes (H vs. CH, H vs. AH, H vs. D, CH vs. AH, CH vs. D and AH vs. D) were developed. True positives (pathologic skin samples that were correctly classified) and true negatives ("healthy" skin samples that were correctly classified) were used to evaluate sensitivity and specificity of the classification method. In order to test the robustness (generalization capacity), each algorithm was applied on 100 training and validation cycles with random selection of 66% of spectra as training set of data and the 34% left kept as the validation set of data.

k-NN algorithms were performed using several combinations of number of neighbors (k) and Principal Com-

Table 1. Spectral characteristics extracted for spectra acquired for each Autofluorescence excitation (e.g. AF-360 for the 360 nm excitation) and for DR spectra. Total area (AT), Normalized Area (AN) Normalized Slope (NS), Slope (S), Ratio (R) Mean (M), Standard Deviation (SD), Median (Me), Fitting Residual (F)

$\lambda_{exc}(nm)$	Spectral characteristics
AF-360 and AF-368	$AT_{410-700}, NS_{410-445}, NS_{410-700}, S_{410-445}, S_{410-700}, R_{455-595}, A_{410-500}/AT_{500-700}, M, SD, Me$ and F
AF-390	$AT_{460-700}, AT_{460-545}, A_{460-545}, AN_{460-545}, AT_{615-650}, A_{615-650}, AN_{615-650}, AT_{655-690}, A_{655-690}, AN_{655-690}$ $NS_{460-700}, NS_{460-545}, NS_{615-650}, NS_{655-690}, NS_{460-470}, NS_{470-595}, NS_{633-670}, NS_{470-633}, S_{460-700}, S_{460-545}$ $S_{615-650}, S_{655-690}, S_{460-470}, S_{470-595}, S_{633-670}, S_{470-633}, R_{470-595}, R_{470-633}, R_{545-633}, R_{470-670}, R_{450-670}$ $R_{633-670}, A_{615-650}/A_{655-690}, A_{460-545}/A_{545-700}, , M, SD, Me$ and F
AF-400	$AT_{460-700}, AT_{460-550}, A_{460-550}, AN_{460-550}, AT_{615-650}, A_{615-650}, AN_{615-650}, AT_{655-690}, A_{655-690}, AN_{655-690}$ $NS_{460-700}, NS_{460-550}, NS_{615-650}, NS_{655-690}, NS_{460-475}, NS_{485-595}, NS_{633.5-669}, NS_{485-633.5}, S_{460-700}, S_{460-550}$ $S_{615-650}, S_{655-690}, S_{460-475}, S_{485-595}, S_{633.5-669}, S_{485-633.5}, R_{485-595}, R_{485-633.5}, R_{550-633.5}, R_{485-669}, R_{550-669}$ $R_{633.5-669}, A_{615-650}/A_{655-690}, A_{460-550}/A_{550-700}, , M, SD, Me$ and F
AF-410	$AT_{460-700}, AT_{460-550}, A_{460-550}, AN_{460-550}, AT_{615-650}, A_{615-650}, AN_{615-650}, AT_{655-690}, A_{655-690}, AN_{655-690}$ $NS_{460-700}, NS_{460-550}, NS_{615-650}, NS_{655-690}, NS_{460-485}, NS_{492-595}, NS_{633-668}, NS_{492-633}, S_{460-700}, S_{460-550}$ $S_{615-650}, S_{655-690}, S_{460-485}, S_{492-595}, S_{633-668}, S_{492-633}, R_{492-595}, R_{492-633}, R_{550-633}, R_{492-668}, R_{550-668}$ $R_{633-668}, A_{615-650}/A_{655-690}, A_{460-550}/A_{550-700}, , M, SD, Me$ and F
AF-420	$AT_{463-700}, AT_{463-550}, A_{463-550}, AN_{463-550}, AT_{615-650}, A_{615-650}, AN_{615-650}, AT_{655-690}, A_{655-690}, AN_{655-690}$ $NS_{463-700}, NS_{463-550}, NS_{615-650}, NS_{655-690}, NS_{463-490}, NS_{505-595}, NS_{633-668}, NS_{505-633}, S_{463-700}, S_{463-550}$ $S_{615-650}, S_{655-690}, S_{463-490}, S_{505-595}, S_{633-668}, S_{505-633}, R_{505-595}, R_{505-633}, R_{550-633}, R_{505-668}, R_{550-668}$ $R_{633-668}, A_{615-650}/A_{655-690}, A_{463-550}/A_{550-700}, , M, SD, Me$ and F
AF-430	$AT_{476-700}, AT_{476-560}, A_{476-560}, AN_{476-560}, AT_{615-650}, A_{615-650}, AN_{615-650}, AT_{655-690}, A_{655-690}, AN_{655-690}$ $NS_{476-700}, NS_{476-560}, NS_{615-650}, NS_{655-690}, NS_{476-490}, NS_{507-595}, NS_{633-669}, NS_{507-633}, S_{476-700}, S_{476-560}$ $S_{615-650}, S_{655-690}, S_{476-490}, S_{507-595}, S_{633-669}, S_{507-633}, R_{507-595}, R_{507-633}, R_{560-633}, R_{507-668}, R_{560-669}$ $R_{633-669}, A_{615-650}/A_{655-690}, A_{476-560}/A_{560-700}, , M, SD, Me$ and F
DR 390-720	$AT_{390-710}, AT_{390-450}, AA_{390-450}, AT_{430-540}, AA_{500-600}, AT_{500-600}, NS_{390-720}, NS_{390-450}, NS_{500-600}$ $NS_{390-600}, NS_{430-540}, NS_{470-600}, NS_{580-600}, NS_{580-600}, NS_{640-720}, NS_{430-450}, S_{390-720}, S_{390-450}, S_{500-600}, S_{390-600}$ $S_{430-540}, S_{470-600}, S_{580-600}, S_{640-720}, S_{430-450}, R_{390-720}, R_{390-450}, R_{500-600}, R_{390-600}, R_{430-540}, R_{470-600}$ $R_{600-580}, R_{680-720}, R_{420-470}, R_{420-550}, R_{420-575}, R_{575-470}, R_{575-550}, R_{540-550}, M, SD, Me$ and F

Table 3. Number of Principal Components (PCs) and nearest neighbors (K) used to evaluate k-Nearest Neighbors classification performance using each of the CEFS combinations of spatially-resolved bimodal spectroscopy (each distance D1, D2, D3 and their 4 possible combinations) for spectral features that allowed a pair-wise discrimination of either 6, 5 or 4 pairs of histological skin classes

Distance	D1	D2	D3	D1+D2+D3	D1+D2	D1+D3	D2+D3
6 pairs	PC=1,2,..., 5 K=1, 2, ...,15	PC=1,2 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,3,4 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 9 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 6 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 8 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 5 K=1, 2, ...,15
≤ 5 pairs	PC=1,2,..., 19 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 21 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 30 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 53 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 34 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 42 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 43 K=1, 2, ...,15
≤ 4 pairs	PC=1,2,..., 23 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 33 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 38 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 70 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 47 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 52 K=1, 2, ...,15	PC=1,2,..., 60 K=1, 2, ...,15

Table 4. Number of Principal Components (PCs) used to evaluate Linear Discriminating Analysis (LDA) and Support Vector Machine (SVM) each of the CEFS combinations of spatially-resolved bimodal spectroscopy (each distance D1, D2, D3 and their 4 possible combinations) for spectral features that allowed a pair-wise discrimination of either 6, 5 or 4 pairs of histological skin classes

Distance	D1	D2	D3	D1+D2+D3	D1+D2	D1+D3	D2+D3
6 pairs	PC=1,2,..., 5	PC=1,2	PC=1,2,3,4	PC=1,2,..., 9	PC=1,2,..., 6	PC=1,2,..., 8	PC=1,2,..., 5
≤ 5 pairs	PC=1,2,..., 19	PC=1,2,..., 21	PC=1,2,..., 30	PC=1,2,..., 53	PC=1,2,..., 34	PC=1,2,..., 42	PC=1,2,..., 43
≤ 4 pairs	PC=1,2,..., 23	PC=1,2,..., 33	PC=1,2,..., 38	PC=1,2,..., 70	PC=1,2,..., 47	PC=1,2,..., 52	PC=1,2,..., 60

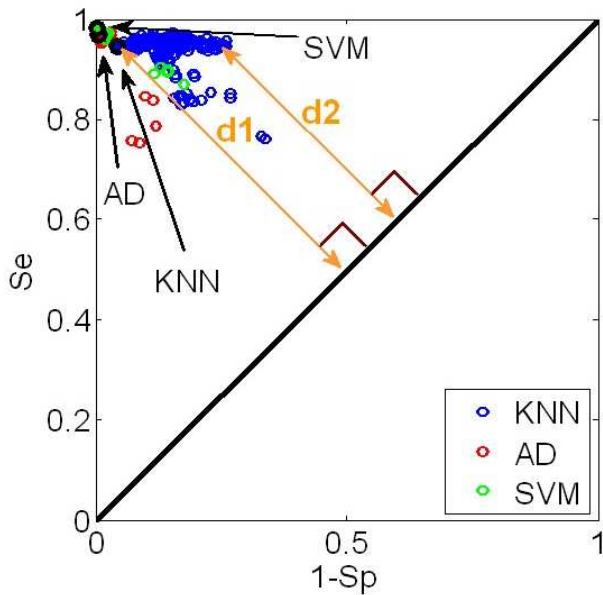


Fig. 3. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve. The best global diagnostic performance for the (SE,SP) couple is achieved when the data point is the furthest away from the median line.

ponents (PCs accounting for up to 99% of the information contained in the original set of data) in order to get the optimum results for sensitivity and specificity. Combinations of the different numbers of k and PCs retained for each CEFS combinations tested are shown in Table 3. As shown in Table 4, PCs accounting for up to 99% were taken into account for both LDA and SVM algorithms. The best classification accuracy achieved by each of the 378 algorithms tested (21 groups of spectral characteristics \times 3 methods of classification \times 6 pairs of histological classes) i.e. the optimum (Se , Sp) couple is found using a Receiver Operating Characteristic (ROC) test (see Fig. 3) that plots sensitivity as a function of (1 - specificity).

3 Results

An example of mean AF spectra for a 410 nm-excitation at the shortest CEFS ($D1=271 \mu\text{m}$) is given in Figure 4a) for each histological class: H ($n=84$), CH ($n=47$), AH ($n=64$) and D ($n=56$). Significant global intensity differences can be noticed between H, CH and D on one hand and CH on the other hand. Global intensity is the highest for H, a little lower for AH and D (that are close to one another) and the lowest for CH. Focusing on the 500 nm main emission peak, AH and D display very close intensities (flavins characteristic emission). Typical emission porphyrins double peaks can be observed at 633 and 670 nm. A slight difference between D and AH is observed at the 633-nm emission peak (increased intensity for D). An example of mean DR spectra obtained at the shortest CEFS ($D1$) is given for each histological class (H, CH, AH and D) in Figure 4b). Same type of observation as for AF can be made: CH displays a significantly decreased

intensity level than H, AH and D. H displays a significantly decreased intensity compared to both AH and D in the 450-700 nm spectral range, especially for wavelengths longer than 600 nm. It is to be noticed that the global spectral shape of H classified tissues is very different from the three others. Conversely, intensity and shape of AH and D mean spectra are very similar. Finally, haemoglobin absorption 577 nm-peak is deeper for CH, AH and D than for H.

Sensitivity (SE) and specificity (SP) of pair-wise classification are given in the left and the right columns respectively of Figures 5 and 6: a) H vs. CH, b) H vs. AH, c) H vs. D, d) CH vs. AH, e) CH vs. D, f) AH vs. D. Each histogram displays results for the three classification algorithms (k-NN, LDA and SVM) at each of the possible combinations of CEFS tested: D1 alone, D2 alone, D3 alone, and D1D2D3, D1D2, D1D3, D2D3.

Results in Figure 5 were obtained from a set of 13 characteristics that are common to the discrimination of the 6 pairs of histological classes. Results in Figure 6 were obtained using a set of 186 characteristics that are common to the discrimination of at least 5 pairs of histological classes out of the 6 tested.

No increase in discrimination accuracy was obtained using a more extended set of spectral characteristics (306) common to the discrimination of 4 out of 6 pairs of histological classes compared to the 186 characteristics previously tested. Thus such results are not showed in the current paper.

Using any of the classification algorithm for D1 and for the D1D2D3 combination, very high sensitivity and specificity levels are obtained (close to 100%) using 13 ($D1=6$, $D2=2$ and $D3=5$) spectral characteristics (Figure 5). When discriminating H vs. AH and D, both sensitivity and specificity increase ($Se < 90\%$ and Sp close to 100%) when using the D1D2D3 combination. In the latter case, sensitivity is higher using the SVM algorithm than the two others. However, both sensitivity (around 65%) and specificity ($< 80\%$) are very low when discriminating AH from D. In that case, it is to be noticed that sensitivity is higher when using the k-NN method than when using the two others; however specificity is higher using D1 and on a global scale, SVM gives the highest results using any of the CEFS combinations.

When considering the 6 pairs of histological classes to discriminate, the D1D2D3 combination reaches higher scores except for the discrimination of AH and D. SVM tends to discriminate healthy (H) from any class of pathologic tissue (CH, AH and D) slightly better than k-NN and LDA algorithms. k-NN is slightly more efficient for longest CEFS in discriminating pathologic tissues from one another than LDA and SVM. Such results are always obtained for a large number of PCs, i.e. accounting for more than 99% of the information contained in the original data set.

Results using the 186 ($D1=44$, $D2=59$ and $D3=83$) characteristics discriminating at least 5 out the 6 pairs of histological classes are shown in Figure 6. Same types of results as the ones using 13 ($D1=6$, $D2=2$ and $D3=5$) char-

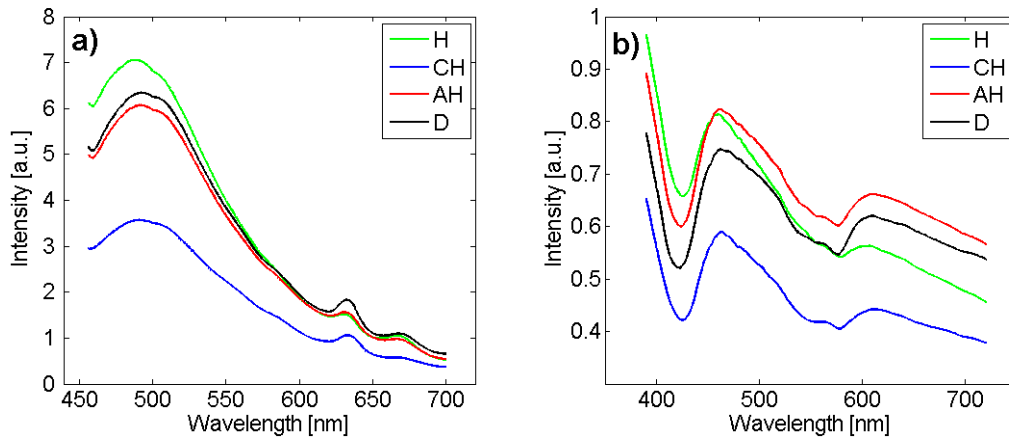


Fig. 4. Mean preprocessed spectra acquired with the developed spectroscopy set-up at the shortest CEFS ($D1 = 271 \mu\text{m}$) for each of the four histological classes (H : $n=84$, CH : $n=47$, AH : $n=64$ and D : $n=57$). a) AF spectra obtained for a 410-nm excitation. b) DR spectra.

acteristics are obtained when discriminating CH from any other histological class: both sensitivity and specificity get very high (close to 100%) using the D1D2D3 combination and any classification algorithm. Results obtained with extended sets of characteristics (Figure 6) are better than the ones with reduced sets (Figure 5), when considering the use of D2 or D3 alone and when considering the discrimination between H from AH and D ($Se > 95\%$ and Sp close to 100%) using the D1D2D3 combination. In such cases, LDA and SVM give better results than the k-NN algorithm. Compared to results obtained in Figure 5, a global increase in the discrimination accuracy is noticed when discriminating AH from D: sensitivity is the highest when using D1 alone, D2 alone or D3 alone and specificity is the highest when using any of the three combinations of CEFS. The highest sensitivity (65%) is obtained using D1D2D3 with the LDA algorithm. The highest specificity (80%) is obtained using the D2D3 combination using the k-NN method (better than both DA and SVM for any CEFS in this case). Neither sensitivity nor specificity is significantly increased compared to the scores obtained and plotted in Figure 5 but they are more "balanced" at each CEFS alone or in combination. Thus the overall accuracy seems better even though it remains low.

The overall classification accuracy is increased especially when discriminating H vs. AH and D, using the D1D2D3 combination and using an extended set of spectral characteristics (from 13 to 186). Such best results are obtained for 10 to 20 PCs i.e. accounting for 90 to 95% of the information contained in the initial set of data.

Finally, sensitivity and specificity are close to 100% for all pairs of histological classes (except for AH vs. D) using the D1D2D3 combination and for spectral characteristics discriminating at least 5 out of the 6 pairs of histological classes. SVM and LDA seem globally a little more performant than k-NN. However, when discriminating AH from D, both sensitivity and specificity remain lower than 70 and 80% respectively.

4 Discussion

Our results confirm and extend other works published namely by Diagardjane *et al.* [19] in AF multi-excitation on chemically-induced mice skin cancers, by Chang *et al.* [6] and Georgakoudi *et al.* [29] in bimodal and trimodal spectroscopies (AF multi-excitation and DR) on the cervix or by Inaguama *et al.* [30] in AF mono-excitation at 410 nm on human oral cancer. In these studies the authors mentioned that haemoglobin absorption peaks ($\approx 420, 545$ and 575 nm) related to progressive hyperplastic vascular activity and autofluorescence emissions related to flavins, collagen, NADH and porphyrins (≈ 633 and 672 nm) can be used as biomarkers to differentiate between various precancerous tissue states. More specifically, the presence of increased porphyrin intensity peaks is also associated with hyperplastic modifications implying haemoglobin transformations [31–33], or changes in the cellular environment [20]. Inaguama *et al.* [30] also stated that porphyrin may be continuously excreted by cancerous tissue as metabolites, therefore being found not only in advanced cancer but also in early cancer stages.

The spectral characteristics (slopes, ratios, areas, *etc.*) extracted and selected from our DR spectra are namely related to haemoglobin absorption peaks and those from AF spectra are related to endogenous fluorophores emission spectra of flavins, collagen, NADH and porphyrins. Looking at the averaged and standardized AF emission spectra for excitations at 390, 400, 410, 420 and 430 nm we observed that the overall intensity of the mean spectral curve in the emission band from 450 to 550 nm (related to collagen, NADH and flavins), for healthy classified spectra is higher than the one of the three other classes, for CH class is lower than the one of the other three classes, for D is slightly higher than AH ones. In the wavelength band 550 to 700 nm (related to flavins and porphyrins), the overall intensity of the mean spectral curve for CH is higher than the one of the three other classes, for H

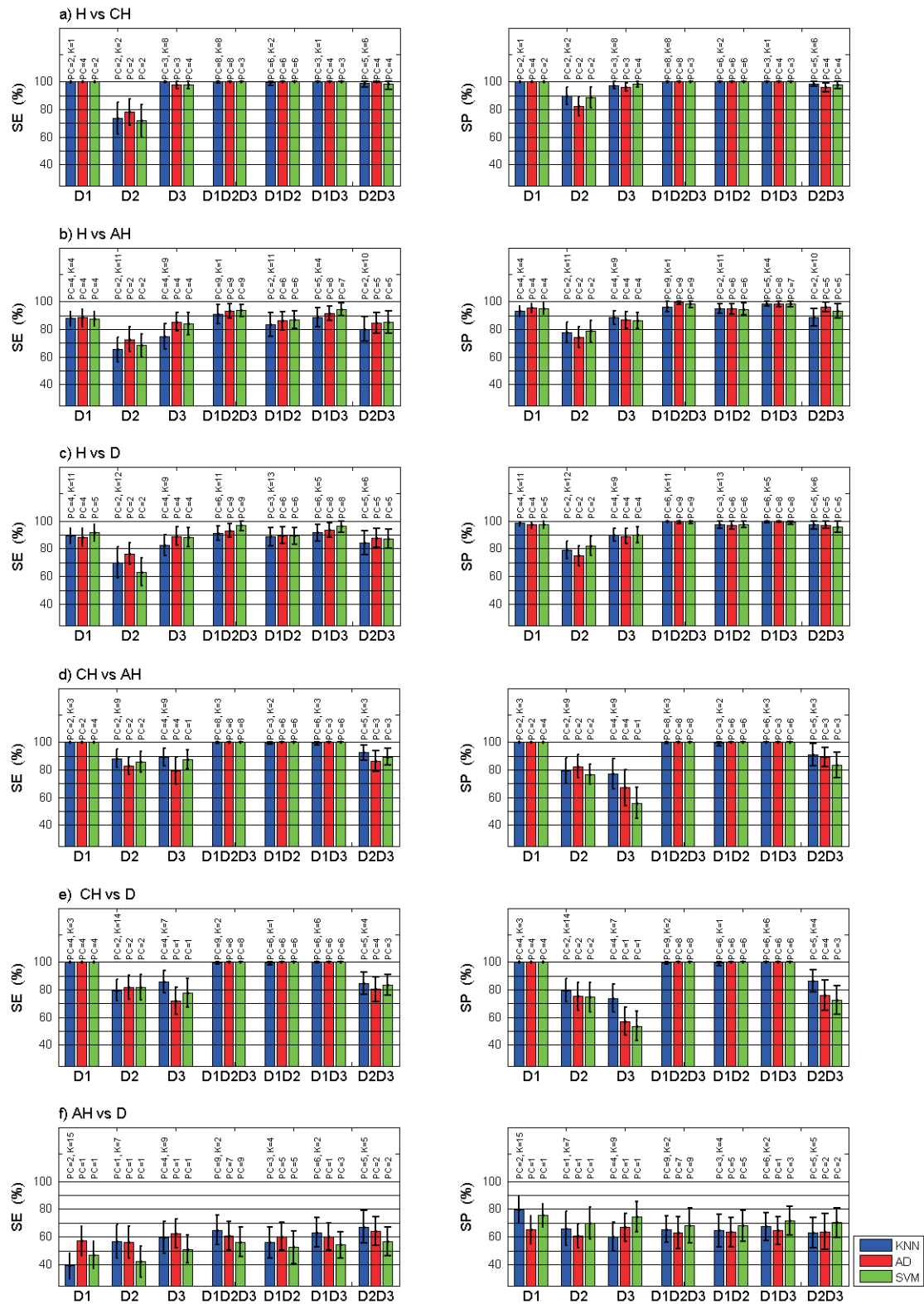


Fig. 5. Mean sensitivity (SE) and specificity (SP) using 13 (D1=6, D2=2 and D3=5) characteristics common to the discrimination of the 6 pairs of histological classes: a) H (healthy) vs. CH (Compensatory Hyperplasia), b) H vs. AH (Atypical Hyperplasia), c) H vs. D (Dysplasia), d) CH vs. AH, e) CH vs. D or f) AH vs. D using several combinations of Collection to Excitation Fiber Separation (CEFS): D1=271 μ m alone, D2 = 536 μ m alone or D3 = 834 μ m alone, or D1D2D3 or D1D2 or D1D3 or D2D3 and using each of the three classification algorithms: k-NN (k-Nearest Neighbor), LDA (Linear Discriminant Analysis) et SVM (Support Vector Machine). Error bars: standard deviation. PC and K indicated on top of each histogram correspond to the number of Principal Components (PC) and of neighbors (K) used to obtain optimum results displayed here.

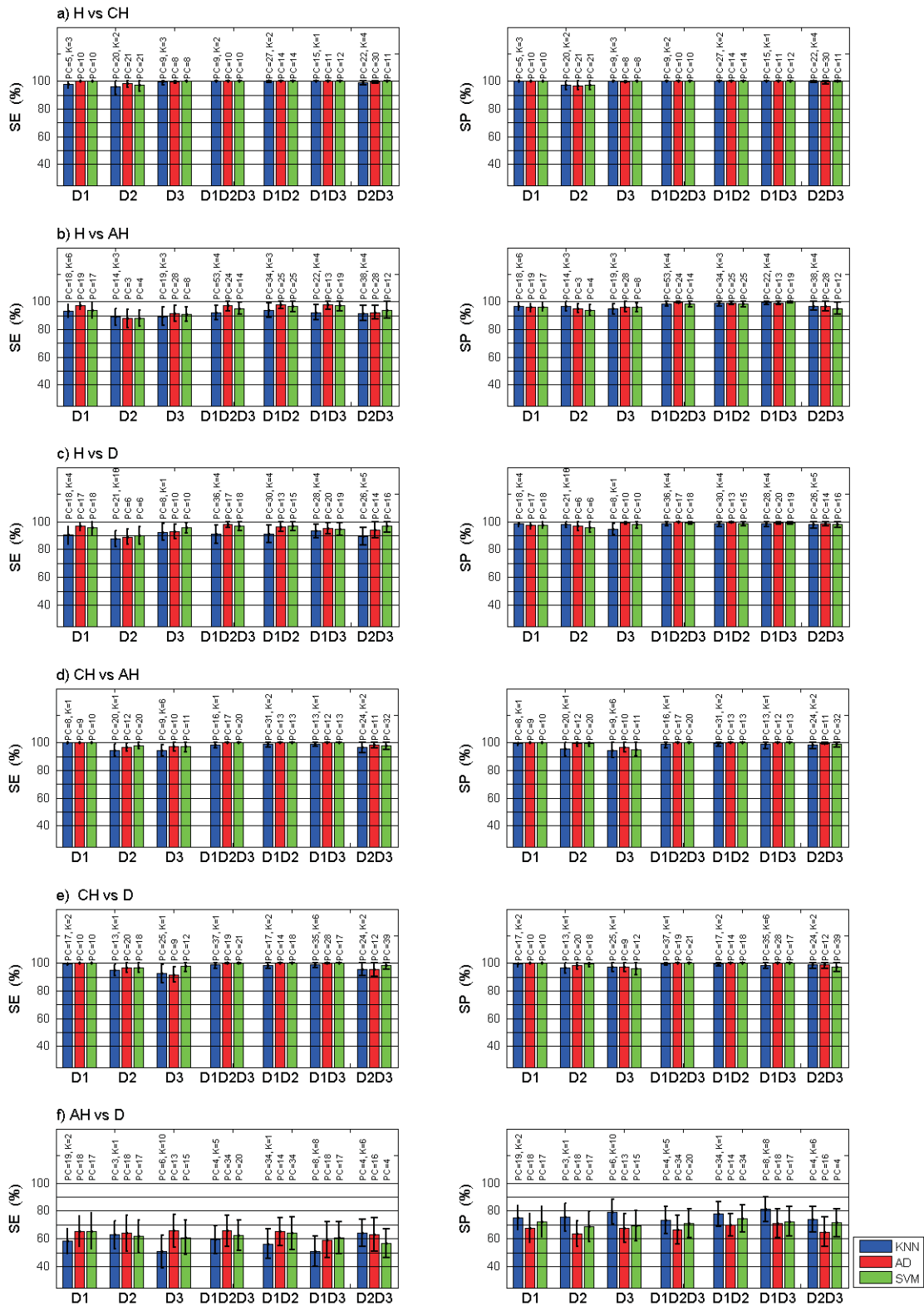


Fig. 6. Mean sensitivity (SE) and specificity (SP) using 186 (D1=44, D2=59 and D3=83) spectral characteristics common to the discrimination of at least 5 out the 6 pairs of histological classes : a) H (healthy) *vs.* CH (Compensatory Hyperplasia), b) H *vs.* AH (Atypical Hyperplasia), c) H *vs.* D (Dysplasia), d) CH *vs.* AH, e) CH *vs.* D et f) AH *vs.* D using several combinations of Collection to Excitation Fiber Separation (CEFS): D1=271 μ m alone, D2= 536 μ m alone or D3 = 834 μ m alone, or D1D2D3 or D1D2 or D1D3 or D2D3 and using each of the three classification algorithms: k-NN (k-Nearest Neighbor), LDA (Linear Discriminant Analysis) et SVM (Support Vector Machine). Error bars: standard deviation. PC and K indicated on top of each histogram correspond to the number of Principal Components (PC) and of neighbors (K) used to obtain optimum results displayed here.

class is lower than the one of the three other classes, for AH class is slightly higher than D ones. For DR spectra acquired at distances D1, D2 and D3, the overall intensity of the mean spectral curve for CH classified spectra is lower than AH and D classes, for AH class is higher than CH and D classes, for D class is slightly lower than AH class. The overall intensity of the spectral curve of the class H is very different from the three others: for D1 in the wavelength band 390-450 nm (haemoglobin absorption peak at 420 nm) it is higher than the 3 others; in the band 450-575 nm it is lower than AH and in the band 575-720 nm it is lower than AH and D. Towards D2 and D3 the overall intensity of the mean spectral curve decreases for H classified spectra: in wavelength band 390-450 nm it is lower than AH but of the same amplitude as D; in the band 450-720 nm it is lower than AH and D.

While two valleys related to haemoglobin absorption peaks (545 and 575 nm) are slightly visible for AF spectra acquired at distance D1, these valleys are more clearly visible (increased) for AF spectra acquired at distance D3; furthermore the emission peak intensity at 633 nm (porphyrin) is also increased for AF spectra acquired at distance D3. In DR spectra acquired at distance D3, the haemoglobin absorption peaks are increased compared to those acquired at D1. When the distance between excitation-reception fibers increases, the depth of skin probed increases [14], therefore absorption (in DR and AF) and porphyrin emission (in AF) increases (are more visible) for D3.

In a study characterizing early neoplastic changes in DMBA/TPA-induced mouse skin tumor model, using AF multi-excitation in the wavelength band 280-460 nm and LDA classification, Diagardjane *et al.* [19] obtained good results in discriminating different precancerous states. They defined 5 categories: category I (Healthy), category II (Inflammation and Hyperplasia), category III (Hyperplasia and Dysplasia), category IV (Moderately Differentiated Squamous Cell Carcinoma) and category V (Poorly Differentiated Squamous Cell Carcinoma). Considering classifications for categories I, II and III using excitations in the wavelength band 360-420, their results were $62.1\% < Se < 69.0\%$ and $82.2\% < Sp < 95.6\%$. In our work we concentrated on a refined classification within corresponding categories II and III and obtained higher Se and Sp , while only using NUV-UV excitations wavelengths higher than 360 nm (i.e. wavelengths with lowest or no mutagenic potential, in perspective of clinical implementation). Chang *et al.* [6] discriminated healthy (Squamous Normal, SN) *vs.* Low and High Grades of Squamous Intraepithelial cervical Lesions (LGSIL, HGSIL), using AF multi-excitation in the range 330-480 nm and DR spectroscopies, in combination with PCA and Mahalanobis distance algorithm. Several pairs of discrimination were defined (SN *vs.* CN, SN *vs.* LGSIL, SN *vs.* HGSIL, CN *vs.* LGSIL and CN *vs.* HGSIL). Considering classification of discrimination pairs with SN and LHSIL using AF multi-excitation and DR, their results were $53\% < Se < 95\%$ and $69\% < Sp < 91\%$. Although our work concerns another type of epithelium, we proposed here a refined classifica-

tion of normal and low grades lesions into 4 subclasses (H, CH) and (AH, D). Our results are globally higher with Se and $Sp > 95\%$ and a lowest discriminating capability for AH *vs.* D with $Sp \approx 74\%$ and $Se \approx 63\%$.

Our results (Se and $Sp \approx 100\%$ for CH *vs.* others; $Sp \approx 100\%$ and $Se > 95\%$ for H *vs.* AH or D; $Sp \approx 74\%$ and $Se \approx 63\%$ for AH *vs.* D) are also in good agreement with various works that have used classification techniques like SVM or Artificial Neural Networks (ANN). Lin *et al.* [26] developed an algorithm based on SVM (linear and non linear), using AF excitations at 405 and 436 nm for discriminating normal and cancerous nasopharyngeal tissues. They achieved $Se = 94\%$ and $Sp = 97\%$ using linear SVM and $Se = 95\%$ and $Sp = 99\%$ with non linear SVM. PCA can substantially reduce the complexity of an SVM algorithm without sacrificing the performance of the algorithm. But when they combined PCA and SVM methods, these algorithms produced the same results. Nayak *et al.* [34] developed algorithms based on PCA and ANN, using pulsed laser-induced autofluorescence at 325 nm excitation for discriminating normal, premalignant and malignant human oral tissues. They achieved $Se = 100\%$ and $Sp = 92.9\%$ using linear PCA and $Se = 100\%$ and $Sp = 96.5\%$ with ANN. Majunder *et al.* [35] developed an algorithm based on SVM, using AF excitation at 337 nm for discriminating healthy squamous *vs.* early SCC human oral tissues. They achieved $Se = 91\%$ and $Sp = 96\%$.

Finally, in order to improve the discrimination efficiency of AH *vs.* D (lowest discriminating capability with $Sp \approx 74\%$ and $Se \approx 63\%$), we carried out classification by adding more characteristics which exclusively discriminate AH *vs.* D to the set of spectral characteristics selected. This approach did not improve significantly the previous results achieved. New methods of nonlinear spectral characteristics selection and nonlinear classification algorithms are to be tested to further investigate increased performance for AH *vs.* D classification.

5 Conclusion

A simple and tunable instrumentation was developed to acquire both AF and DR spectra in a bimodal approach at several CEFS and applied to monitor healthy to pre-cancerous evolution in vivo of skin mice due to chronic UV-irradiation. Bimodal spectroscopy's accuracy in discriminating four classes of mouse skin histological stages was evaluated. Various sets of spectral characteristics (extracted from the spectral intensity curves) were selected based on statistical discrimination of the pair-wise classes. After data reduction by PCA results obtained with three classification algorithms were compared. Since both sensitivity and specificity are very high when discriminating healthy from any type of hyperplastic tissue on one hand and CH from AH and D on the other hand, bimodal spectroscopy seems a promising tool to help dermatologists and histo-pathologists to increase diagnostic accuracy of skin lesions. However lowest diagnostic accuracy was

achieved when discriminating AH from D using any of the three linear classification algorithm we tested. It is to be noticed that for these 5 pairs of histological classes, spatial resolution improves classification accuracy and SVM and LDA give better results than the k-NN algorithm. Further studies need to be done to confirm these results on human patients.

Acknowledgments

This work was supported by the French association Ligue Contre le Cancer (CD 52, 54), Nancy-University, the Region Lorraine and the Programme Alþan, the European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America, scholarship No. E05D057651MX.

References

1. M. Takata, *Int. J. Clin* 10 (2005) 391–397.
2. M. Rajeswari, *Lab. Invest.* 83(9) (2003) 1279–1283.
3. J. Oh, *J. Biomed. Opt.* 11(3) (2006) 032034.
4. I. Bigio, *Phys. Med. Biol* 42 (1997) 803.
5. V. Tuchin, *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*, 2002.
6. S. Chang, *J. Biomed. Opt.* 10(2) (2005) 024031.
7. D. Veld, *Lasers Surg. Med.* 36 (2005) 356.
8. I. Georgakoudi, *Gastroenterol.* 120 (2001) 1620.
9. U. Utzinger, *J. Biomed. Opt.* 8(1) (2003) 121.
10. C. Zhu, *J. Biomed. Opt.* 10(02) (2005) 024032.
11. J. Tunnell, *Technol. Cancer Res. Treat.* 2 (2003) 505.
12. R. Zangaro, *Appl. Opt.* 35 (1996) 5211.
13. A. Zuluaga, *Appl. Spectrosc.* 53 (1999) 302.
14. K. Katika, *Appl. Opt.* 45(17) (2006) 4174–4183.
15. D. Veld, *J. Biomed. Opt.* 9(5) (2004) 940–950.
16. N. Marín, *J. Biomed. Opt.* 11(1) (2006) 014010.
17. E. Péry, Ph.D. thesis, Institut National Polytechnique of Lorraine (2007).
18. V. Wallace, *Phys. Med. Biol.* 45 (2000) 735–751.
19. P. Diagardjane, *Lasers Surg. Med.* 37 (2005) 382.
20. S. Balasubramanian, *Carcinogenesis* 16 (1995) 2461.
21. B. Murphy, *J. Biomed. Opt.* 10(6) (2005) 064020.
22. N. Marín, *Gyneco. Oncol.* 99 (2005) S116–S120.
23. S. Kamath, *J. Biomed. Opt.* 12(1) (2007) 014028.
24. D. Peña, *Análisis de datos multivariantes*, 2002.
25. N. H. Timm, *Applied multivariate analysis*, 2002.
26. W. Lin, *J. Biomed. Opt.* 9(1) (2004) 180–186.
27. C. Burges, *Data Min. Knowl. Discov.* 2 (1998) 121–167.
28. V. Vapnik, *The Nature of Statistical Learning Theory*, 1995.
29. I. Georgakoudi, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 186(3) (2002) 374–382.
30. M. Inaguma, *Cancer* 86 (1999) 32201–11.
31. Y. Yang, *Lasers Surg. Med.* 7 (1987) 528–532.
32. Z. Malik, *Cell Differentiation* 8 (1979) 223–33.
33. T. Nishisaka, *J. Jpn. Soc. Laser Med.* 16 (1995) 11–15.
34. G. Nayak, *Biopolymers* 82 (2006) 152–166.
35. S. Majumder, *Lasers Surg. Med.* 36 (2005) 323–333.

Résumé

Ce manuscrit se compose de 3 grandes parties.

La première présente d'une part, un court curriculum vitae et d'autre part, une notice exposant l'ensemble de mes activités en matière d'enseignement, de recherche, d'administration et autres responsabilités individuelles et collectives depuis 1997.

La deuxième grande partie est consacrée à une description du projet de recherche mené au CRAN depuis 2002-2003, dans le domaine de la caractérisation de tissus biologiques à l'aide de méthodes d'imagerie et de spectroscopie optique UV-Visible, au travers d'une approche "multi-échelles" et "multi-modalités". Leurs applications notamment au photodiagnostic *in vivo* en cancérologie (vessie, peau) sont développée au travers de 2 axes de recherche en :

- imagerie endoscopique panoramique en lumière blanche (LB) et fluorescence (F), avec la construction automatique et rapide d'images panoramiques de parois internes de vessies par recalage et mosaïquage des images cystoscopiques, les validations quantitatives et qualitatives des performances des algorithmes développés, et la validation de la superposition d'images panoramiques LB/F au moyen d'un système d'excitation et d'acquisition Visible/UV multiplexées dans le temps,
- spectroscopie fibrée d'autofluorescence (AF) et de diffusion élastique (DE) résolue spatialement, avec le développement et la validation métrologique d'un système de multiple excitation d'AF 360-460 nm et de DE 360-760 nm, le traitement des données spectroscopiques multi-dimensionnelles, l'extraction, la sélection et la classification supervisée / non-supervisée de caractéristiques spectrales, l'identification de paramètres optiques de tissus à l'aide de simulations statistiques (Monte Carlo, modèles multi-couches), enfin l'application de la méthode à plusieurs études de différenciation *in vivo* entre les états sains/inflammatoires/cancéreux de la vessie de rats et entre les états sains/hyperplasiques/dysplasiques de la peau de souris.

Pour chacun de ces axes, les problématiques, objectifs, principaux résultats et perspectives sont précisées.

Finalement, la troisième et dernière grande partie de ce manuscrit donne la production scientifique et la version intégrale de plusieurs articles représentatifs.

Mots-clés: instrumentation, calibrage, cystoscopie, spectroscopie optique, multi-modalités, autofluorescence, diffusion élastique, simulation statistique, biopsie optique, diagnostic du cancer *in vivo*, vessie, peau, recalage et mosaïquage d'images, extraction et sélection de caractéristiques, classification de données

Abstract

The present manuscript is made of 3 main parts.

The first part includes a short curriculum vitae followed by a notice reporting all my activities in terms of teaching, research and administration or other individual and group responsibilities since 1997.

The second main part is dedicated to the description of the research project developed in the laboratory CRAN since 2002-2003, in the field of biological tissue characterization with use of UV-visible optical spectroscopy and imaging methods, through a "multi-scales" and "multi-modalities" approach. Their applications to *in vivo* photodiagnosis in cancerology (bladder, skin), are presented with reference to 2 research axes :

- panoramic endoscopic imaging in white light (WL) and fluorescence (F), including the automatic and fast construction of panoramic images of internal walls of bladders using cystoscopic image registration and mosaicing, the quantitative and qualitative validations of the performances of the algorithms developed, and the validation of the superposition of WL/F panoramic images by means of a time multiplexed Visible/UV excitation and acquisition system,

- spatially resolved autofluorescence (AF) and elastic scattering (ES) fibred spectroscopy, including the development, calibration and validation of an instrumentation system with multiple AF excitation 360-460 nm and ES 360-760 nm, the multi-dimensional spectroscopic data processing, the extraction, selection and supervised / unsupervised classification of spectral characteristics, the identification of optical parameters of tissues by means of statistical simulations (Monte Carlo, multi-layers models), and finally the application of the method to some studies for differentiating *in vivo* between healthy/inflammatory/cancerous stages in rat bladder tissues and between healthy/hyperplastic/dysplastic stages of mice skin.

For each of these axes, the scientific questions, objectives, main results and perspectives are given.

Finally, the third and last main part of the present document summarizes my scientific production and gives the full texts of various representative articles.

Keywords: instrumentation, calibration, cystoscopy, optical spectroscopy optique, multi-modalities, autofluorescence, elastic scattering, statistical simulation, optical biopsy, *in vivo* cancer diagnosis, bladder, skin, image registration and mosaicing, characteristics extraction and sélection, data classification