

**Spectroscopie bimodale en diffusion élastique
et autofluorescence résolue spatialement :**
instrumentation, modélisation des interactions lumière-tissus
et application à la caractérisation de tissus biologiques
ex vivo et *in vivo* pour la détection de cancers

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 31 octobre 2007

pour l'obtention du

Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Spécialité Automatique et Traitement du Signal

par

Emilie PÉRY

Composition du jury

<i>Président :</i>	Hugues Garnier	CRAN, Nancy
<i>Rapporteurs :</i>	Anne Humeau Hervé Saint-Jalmes	Groupe ESAIP, LISA, Angers PRISM Villejean, Rennes
<i>Examineurs :</i>	Irving Bigio Walter C.P.M. Blondel Geneviève Bourg-Heckly François Guillemin	Biomedical Optics Laboratory, Boston, USA CRAN, Nancy BioMoCeTi, Évry Centre Alexis Vautrin-CRAN, Nancy



Mis en page avec la classe thloria.

Remerciements

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire ont été effectués au **Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN)**, Unité Mixte de Recherche Nancy-Université, CNRS (UMR 7039), dans le groupe thématique Ingénierie Pour la Santé (IPS), groupe dirigé par **Monsieur le Professeur Didier WOLF**.

J'exprime mes profonds remerciements à mes deux directeurs de thèse :

Monsieur le Professeur François GUILLEMIN,

Honorée qu'il ait accepté ce travail, je lui fais part de ma gratitude et veux lui dire mon admiration pour sa vision synthétique des problématiques, sa projection futuriste, ce qui m'a permis de mener à bien ces travaux. Qu'il soit remercié pour sa disponibilité et la confiance qu'il m'a accordée et qu'il trouve ici les marques de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Walter BLONDEL,

Très reconnaissante pour sa disponibilité, sa rigueur, ses précieux conseils, son assistance, sa patience, je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée pendant toute la réalisation de ma thèse et pour nos nombreux échanges scientifiques. Je tiens à saluer son audace scientifique, qui l'oriente vers des collaborations multidisciplinaires, nous permettant ainsi d'élargir le champ de nos compétences et de nous aventurer sur des terrains scientifiques nouveaux. Grand merci pour tout !

Mes remerciements très chaleureux vont aussi à de nombreuses personnalités :

à Monsieur le **Professeur Alain RICHARD**, directeur du CRAN qui m'a permis de réaliser cette thèse, et à Monsieur le **Professeur Francis LEPAGE**, responsable de l'École Doctorale IAEM Lorraine, pour son engagement dans la formation doctorale.

aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de participer à l'examen de ces travaux :

– **Monsieur le Professeur Hugues GARNIER,**

Qu'il soit assuré de toute ma gratitude et mon profond respect pour l'attention qu'il a portée à mon travail en acceptant de présider ce jury de thèse.

– **Madame le Docteur Anne HUMEAU et Monsieur le Professeur Hervé SAINT-JALMES,**

Ce fut un honneur pour moi qu'ils aient accepté d'évaluer mes travaux en tant que rapporteurs. Je les prie de croire ici en ma haute considération.

- **Monsieur le Professeur Irving BIGIO,**
It was my privilege he accepted to be a member of my PhD committee and to assess my work.
- **Madame le Docteur Geneviève BOURG-HECKLY,**
Je lui suis profondément reconnaissante d’avoir accepté d’évaluer mon travail, témoignant ainsi de son intérêt.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance et ma sympathie à tous ceux qui m’ont aidée au cours de ces années, notamment :

Monsieur le Docteur Jacques DIDELON,
Pour son aide lors de la réalisation de l’instrumentation bimodale, pour ses conseils avisés, son soutien et sa grande courtoisie.

Monsieur Christophe CHOSEROT,
Pour sa collaboration lors du développement du banc de test mécanique et de l’instrumentation électronique associée lors de l’étude *in vitro*.

Monsieur le Docteur Dominique DUMAS,
Pour sa participation à la réalisation des images en microscopie confocale.

Madame le Docteur Céline FROCHOT,
Pour sa disponibilité lors des expériences réalisées au Département de Chimie Physique des Réactions.

Madame le Docteur Marie-Ange D’HALLEWIN,
Pour l’expertise histologique des coupes de vessie de rats.

Yahir HERNÁNDEZ MIER, mon collègue de travail,
Ton soutien constant, ton amitié et ta bonne humeur ont éclairé ces nombreuses années.

Cédric THOMAS,
Je tiens à souligner ta motivation et ton investissement et je te souhaite le meilleur pour la suite.

Diego, Ivan, Laurentiu,
Pour votre soutien et les discussions en anglais qui animaient les pauses repas.

Mes collègues de l’ENSEM : Mohamed, Gabriel, Gilberto, Sophie, Hamid, Hugo et Rebeca, Michel, Loïc, Marine,
Pour les échanges scientifiques et les agréables moments vécus en votre compagnie.

Jean-Christophe GOEBEL,

Pour ton soutien, ta gentillesse et pour les quelques nuits blanches... réservées aux expériences sur les artères.

Saoussen BERRAHMOUNE,

Pour m'avoir initiée au protocole expérimental utilisé lors des expériences sur les vessies de rats.

Madame Anne-Laure LEBLANC,

Pour son efficacité au sein de l'animalerie.

Tout le personnel professoral et administratif du **Centre de Recherche en Automatique** de **Nancy** et du **Centre Alexis Vautrin**,

Pour son soutien et sa disponibilité.

Le Docteur Agnès LEROUX et ses collaborateurs du service d'Anatomie Pathologique du **Centre Alexis Vautrin**,

Pour leur disponibilité lors de la réalisation des coupes histologiques.

Tout le personnel professoral et administratif de l'**IUT Nancy-Brabois**, particulièrement le **Professeur David BRIE**, le **Docteur Brice VINCENT** et **Monsieur Dominique RICHIER**,

Pour leurs encouragements et leur sympathie.

Mes amis : Anne, Arnaud, Betty, Fadil, Hervé, Yaya...

Pour leur soutien moral jamais démenti.

La Région Lorraine,

Je lui suis profondément reconnaissante pour le soutien financier apporté à ce travail de recherche durant trois ans.

La ligue Contre Le Cancer, Comités Lorrains,

Pour leur soutien financier, notamment à l'action SpID (Spectro-Imagerie de Diagnostic) du groupe IPS.

Que ceux que j'aurais oubliés ne m'en tiennent pas rigueur. Les nombreuses rencontres que j'ai faites pendant ces années de recherche ont toujours été pour moi source d'ouverture et d'évolution tant sur les plans personnel et professionnel. Qu'ils trouvent là, la marque de ma profonde gratitude.

Enfin, mes remerciements les plus chaleureux vont à ma famille : à mes **parents**, à mon **frère** et à ma **soeur**, pour m'avoir soutenue pendant toute la durée de mes recherches.

À mes parents,

Table des matières

Production scientifique	xiii
Table des figures	xvii
Liste des tableaux	xxi
Liste des acronymes	xxiii
Nomenclature	xxv
Introduction	1
Chapitre 1 Contexte de l'étude et problématique scientifique	5
1.1 Cadre Applicatif de l'étude	5
1.1.1 Le cancer	5
1.1.1.1 Définitions	6
1.1.1.2 Tissus épithéliaux	7
1.1.2 Du dépistage au diagnostic du cancer	9
1.1.2.1 Le dépistage	9
1.1.2.2 Le diagnostic	9
1.1.2.3 Critères d'évaluation d'une technique de dépistage et/ou de diag- nostic	10
1.1.3 Classification des tumeurs : cancer de la vessie	12
1.1.3.1 Physiologie du système urinaire	12
1.1.3.2 Epidémiologie et symptômes	13
1.1.3.3 Types et classification TNM	14
1.1.3.4 Méthodes optiques pour le diagnostic	17
1.2 Problématique scientifique	25
1.2.1 Motivations cliniques	25
1.2.2 But et organisation des travaux	26
1.2.3 Objectifs spécifiques	26

1.2.3.1	Instrumentation	26
1.2.3.2	Modélisation des propriétés optiques des tissus biologiques . . .	27
1.2.3.3	Validation expérimentale	28
1.3	Spectroscopies tissulaires appliquées au diagnostic <i>in vivo</i> : étude bibliographique	28
1.3.1	Quelques définitions	28
1.3.2	Spectroscopie Raman	29
1.3.2.1	Principe	29
1.3.2.2	Avantages et limites de cette méthode	30
1.3.2.3	Applications	31
1.3.3	Spectroscopie de diffusion élastique	32
1.3.3.1	Principe	32
1.3.3.2	Avantages et limites de cette méthode	34
1.3.3.3	Applications	34
1.3.4	Spectroscopie d'autofluorescence	38
1.3.4.1	Principe	38
1.3.4.2	Avantages et limites de cette méthode	42
1.3.4.3	Applications	43
1.3.5	Multi-modalités	45
1.4	Conclusion du chapitre et organisation des chapitres suivants	47
Chapitre 2 Instrumentation		49
2.1	Instrumentation existante utilisée	49
2.1.1	Spectrofluorimètre portable	49
2.1.2	Maquette de diffusion élastique	52
2.1.3	Justification du besoin d'un nouveau développement instrumental	53
2.2	Étude de différentes solutions technologiques et caractéristiques du système mis en place au laboratoire	54
2.2.1	Objectifs, originalités et verrous techniques	54
2.2.2	Solutions technologiques envisagées, testées et retenues	55
2.2.2.1	Sonde à fibres optiques	55
2.2.2.2	Partie multi-excitation	60
2.2.2.3	Système de réception	63
2.3	Conclusion et perspectives	67
Chapitre 3 Modélisation statistique		69
3.1	Interactions lumière-tissus	69
3.1.1	Caractéristiques des tissus biologiques	69

3.1.1.1	Photons balistiques vs photons serpentiles vs photons multidiffusés	69
3.1.1.2	Hypothèses sur la nature des milieux	70
3.1.2	Théorie électromagnétique	71
3.1.2.1	Relations fondamentales : équations de Maxwell	71
3.1.2.2	Relations constitutives liées aux caractéristiques physiques du milieu	72
3.1.2.3	Propagation d'ondes planes	73
3.1.2.4	Vecteur de Poynting et énergie	74
3.1.2.5	Vitesse de phase	74
3.1.2.6	Indice de réfraction complexe	75
3.1.3	Définition des propriétés optiques des tissus biologiques	75
3.1.3.1	Indice de réfraction d'un milieu et chemin optique	75
3.1.3.2	Absorption	78
3.1.3.3	Régimes de diffusion élastique	80
3.1.3.4	Caractérisation des propriétés optiques des tissus	88
3.2	Modélisation du transport des photons dans les tissus biologiques	88
3.2.1	Équation de transfert radiatif (ETR)	89
3.2.2	Simulation statistique et problématique	92
3.2.2.1	Applications	93
3.2.2.2	Principe général de la simulation de propagation de photons par méthode de Monte Carlo	94
3.2.2.3	Problématique	95
3.2.2.4	Caractéristiques du simulateur développé	97
3.3	Solution proposée pour implémenter la fluorescence multiple	104
3.4	Validation théorique	106
3.4.1	Exemples de résultats de simulation en absorption/diffusion	107
3.4.2	Comparaison des données issues de notre algorithme et des données de la littérature	108
3.5	Validation expérimentale sur fantômes	109
3.5.1	Protocole et description des fantômes	109
3.5.2	Résultats expérimentaux	110
3.5.2.1	Fantômes liquides	110
3.5.2.2	Fantômes multi-couches	112
3.6	Conclusion et Perspectives	116
Chapitre 4 Étude vasculaire <i>ex vivo</i>		117
4.1	Problématique, objectifs de l'étude et caractéristiques des artères	118

4.1.1	Motivation et objectifs de l'étude	118
4.1.2	Histologie artérielle	118
4.1.3	Propriétés mécaniques des artères	120
4.2	Matériels et Méthodes	122
4.2.1	Banc de test	122
4.2.1.1	Banc de test mécanique	122
4.2.1.2	Systèmes de mesures spectrométriques	122
4.2.1.3	Calibrages	123
4.2.2	Modélisation mécanique	124
4.2.2.1	Mesures des dimensions initiales des anneaux artériels	124
4.2.2.2	Paramètres mécaniques	124
4.2.3	Mesures préliminaires	126
4.2.4	Calibrage, traitements et analyse statistique	126
4.2.4.1	Dispositif d'autofluorescence	126
4.2.4.2	Dispositif de diffusion élastique	128
4.2.4.3	Analyse statistique des données	128
4.2.5	Conditionnement des échantillons biologiques et protocole	129
4.2.5.1	Prélèvements	129
4.2.5.2	Cryoconservation, décongélation	129
4.2.5.3	Tests mécaniques et spectrométriques	130
4.2.5.4	Coupes histologiques	130
4.2.6	Simulation, paramétrage	130
4.3	Résultats et Discussion	131
4.3.1	Données histologiques	131
4.3.2	Résultats mécaniques	132
4.3.3	Résultats spectrométriques	134
4.3.3.1	Autofluorescence	134
4.3.3.2	Diffusion Élastique	137
4.3.4	Simulations	139
4.3.4.1	Simulations réalisées avec les paramètres optiques tirés de la littérature	139
4.3.4.2	Simulations réalisées avec nos paramètres optiques	140
4.4	Conclusions et Perspectives	144

Chapitre 5 Étude sur tumeurs de vessie de rats *in vivo* 147

5.1	Recherche d'un modèle animal et tumoral adapté	147
5.1.1	Pré-étude pour un modèle de tumeur spontanée	147

5.1.2	Modèle actuellement en place au laboratoire	148
5.2	Matériels et Méthodes	149
5.2.1	Banc de test	149
5.2.2	Protocole expérimental	150
5.2.2.1	Préparation des cellules tumorales	150
5.2.2.2	Animaux	150
5.2.2.3	Induction tumorale des vessies de rat	151
5.2.2.4	Chirurgie et Mesures	152
5.2.2.5	Étude histologique	153
5.2.3	Traitements et analyses des données	154
5.2.3.1	Pré-traitements des spectres d'autofluorescence et de diffusion élastique	154
5.2.3.2	Modélisation et calcul des spectres de fluorescence intrinsèque . .	154
5.2.3.3	Analyse des données	155
5.2.3.4	Synthèse des traitements des données	157
5.3	Résultats et Discussion	157
5.3.1	Culture cellulaire et induction tumorale	157
5.3.2	Étude histologique	158
5.3.3	Résultats spectrométriques	158
5.3.3.1	Autofluorescence	158
5.3.3.2	Réflectance Diffuse	161
5.3.3.3	Fluorescence intrinsèque	164
5.3.4	Choix des variables explicatives pour la classification des données	165
5.4	Conclusion et Perspectives	169
Conclusion générale et Perspectives		171
Bibliographie		175
Annexe A Distance entre les centres des cœurs des fibres optiques de notre cap- teur		195
Annexe B Tableau récapitulatif de quelques valeurs de propriétés optiques		197
Annexe C Solution de la diffusion de Mie		201
Annexe D Approximations analytiques de l'équation de transfert radiatif		203
D.1	Théorie de la diffusion	203
D.2	Théorie de Kubelka-Munk (KMT)	205

Annexe E Passage d'une équation de transfert radiatif à une équation de diffusion	207
E.1 Notations utilisées	207
E.2 Rappels de mathématiques	208
E.3 Approximation de la diffusion	209
E.3.1 Première étape	209
E.3.2 Deuxième étape	211
Index	215

Production scientifique

Revues Internationales avec comité de lecture

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*, pages 33(3) : 235-242, 2005.

E. Péry, W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, and F. Guillemain, Simultaneous Characterization of Optical and Rheological properties of Carotid Arteries via Bimodal Spectroscopy : Experimental and Simulation Results, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, soumis.

E. Péry, W.C.P.M. Blondel, C. Thomas, and F. Guillemain, Monte Carlo modeling of multi-layer model of tissues with multiple fluorophores : simulation algorithm and experimental validation on phantoms, *Journal of Biomedical Optics*, soumis.

Communications Internationales avec comité de lecture et actes

Affiche

E. Péry, L. Bauer, W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, and F. Guillemain, Monte Carlo simulation of steady-state diffuse reflectance spectroscopy in arterial tissues, In *IFBME Proceedings of the 3rd European Medical and Biological Engineering Conference, EMBEC'05*, 11(1), November 2005, Prague, République Tchèque.

E. Péry, W.C.P.M. Blondel, C. Thomas, J. Didelon, and F. Guillemain, Diffuse Reflectance Spectroscopy Monte-Carlo Modeling : elongated arterial tissues optical properties, In *IFAC Proceedings of the Modelling and Control in Biomedical Systems, MCBMS'06*, pages 41-46, September 2006, Reims, France.

Communication orale

E. Péry, J.C. Goebel, W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, and F. Guillemain, Spectral (optical) and mechanical responses of fresh and cryopreserved issued arteries, In *Proceedings of the Symposium on Biomedical Optics, SPIE BiOS*, 5695 : 66-74, January 2005, San José, CALifornie, USA.

E. Péry, 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 *Proceedings of the*

European Optical Society, EOS, October 2006, Paris, France.

M. Amouroux, G. Diaz, E. Péry, W.C.P.M. Blondel, and F. Guillemain, Diffuse reflectance spectroscopy's sensitivity to a melanic layer thickness variations : an *in vitro* study on skin phantoms, In *Proceedings of the European Conferences on Biomedical Optics*, 6628 : 6628OY-9, June 2007, Munich, Allemagne.

G. Diaz, M. Amouroux, E. Péry, W. Blondel, G. Bourg-Heckly, and F. Guillemain, Système d'excitation pour spectroscopie bi-modale (autofluorescence et réflectance diffuse) : application à la détection *in vivo* de cancers de peau, In *Proceedings of the Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation, C2i*, Édition Hermès, Lavoisier, 445-453, October 2007, Nancy, France.

G. Diaz-Ayil, M. Amouroux, W. Blondel, G. Bourg-Heckly, E. Péry, Y. Granjon, F. Guillemain, and O. A'Amar, Instrumentation for *in vivo* bimodal spectroscopy (autofluorescence and diffuse reflectance) : experimental validation and preliminary results, In *Proceedings of the 1st Jordanian International Biomedical Engineering Conference, JIBEC*, November 2007, Amman, Jordanie.

E. Péry, 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, In *Proceedings of JIBEC*, November 2007, Amman, Jordanie.

Communications Nationales

Avec comité de lecture et actes

E. Péry, J.C. Goebel, W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, V. Chalau, and F. Guillemain, Caractérisation expérimentale des propriétés optiques et rhéologiques de tissus artériels par Spectroscopie Bi-Modale, In *Proceedings of the Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine, Opt'Diag'04*, May 2004, Paris, France.

E. Péry, W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, and F. Guillemain, Are the spectral characteristics of arterial tissues modified with mechanical constraints ?, In *Proceedings of the Journées Sciences, Technologies et Imagerie en Médecine, JSTIM*, March 2005, Nancy, France.

W. Blondel, E. Péry, C. Thomas, M. Amouroux, and G. Diaz, Modélisation des interactions lumière-tissus : les composantes spectrales, Communication invitée, In *Proceedings of the Journée Thématique AFC (Association Française de Cytométrie), Imagerie et analyse spectrale en microscopie de fluorescence*, pages 18-19, June 2006, Paris, France.

G. Diaz, M. Amouroux, E. Péry, W.C.P.M. Blondel, G. Bourg-Heckly, and F. Guillemain, Système d'excitation pour spectroscopie bi-modale (autofluorescence et réflectance diffuse) : application à la détection *in vivo* de cancers de peau, In *Proceedings of the Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine, Opt'Diag'07*, May 2007, Paris, France.

M. Amouroux, G. Diaz, E. Péry, 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 *Proceedings of the Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine, Opt'Diag'07*,

May 2007, Paris, France.

Sans comité de lecture (résumé publié)

C. Choserot, D. Dumas, J.C. Goebel, E. Péry, W.C.P.M. Blondel, and J.F. Stoltz, Caractérisation expérimentale mécano-optique en fluorescence d'artères fraîches et cryoconservées, In *Journée de l'école Doctorale Biologie Santé Environnement, BIOSE*, April 2004, Nancy, France.

E. Péry, W. 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*, October 2006, Nancy, France.

E. Péry, M. Amouroux, G. Diaz, F. Guillemain, and W. Blondel, Spectroscopie bi-modale (autofluorescence et diffusion élastique) pour la caractérisation tissulaire *in vivo*, In *Journée de Rencontres du Club SFO Photonique et Sciences du Vivant*, November 2006, Paris, France.

Enveloppe Soleau

J. Didelon, E. Péry, and W.C.P.M. Blondel, Miroir de focalisation pour source LED, envoyé à l'INPI (Institut National de la Propriété Industrielle).

Autres Communications

E. Péry, W. Blondel, Spectroscopie tissulaire pour le diagnostic : modélisation des interactions lumière-tissus en autofluorescence et diffusion élastique pour identifier les propriétés optiques de tissus, *présentation à l'Institut Elie Cartan, IECN*, January 2006, Nancy, France.

W. Blondel, E. Péry, M. Amouroux, G. Diaz and C. Thomas, Photodiagnostic tissulaire *in vivo* : modélisation des interactions lumière-tissus en spectroscopie d'autofluorescence et de diffusion élastique pour identifier les propriétés optiques de tissus biologiques, *acte à l'IECN, actes du groupe Biostats*, January 2007, Nancy, France.

E. Péry, M. Amouroux, G. Diaz Ayil and W.C.P.M. Blondel, Classification de données spectrales pour le diagnostic *in vivo* de tissus sains, inflammatoires et cancéreux par spectroscopie optique en autofluorescence et diffusion élastique appliquée à la vessie, *présentation orale à l'IECN*, November 2007, Nancy, France.

Table des figures

1.1	Différentes étapes d'évolution d'un tissu épithélial cancéreux	7
1.2	Exemple de courbe ROC	12
1.3	Différentes couches de la paroi vésicale	14
1.4	Classification internationale des tumeurs de la vessie	15
1.5	Spectre électromagnétique	18
1.6	Schéma d'un système de spectroscopie	21
1.7	Concept de spectroscopie-imagerie	24
1.8	Schéma d'un système d'imagerie endoscopique de fluorescence	24
1.9	Différents modes d'interactions lumière-tissus	29
1.10	Diffusion Raman Stokes, Diffusion élastique, Diffusion Raman anti-Stokes	30
1.11	Spectres Raman typiques d'une région du col de l'utérus	31
1.12	Spectres normalisés de diffusion élastique représentatifs de données typiques de lésions bénignes pigmentées, de mélanomes et de peau saine	34
1.13	Spectres typiques de diffusion élastique obtenus sur le côlon d'un patient	36
1.14	Exemples de spectres ESS pour des tissus de sein et des ganglions	37
1.15	Diagramme de Jablonsky simplifié	38
1.16	Spectres d'absorption et d'émission de quelques fluorophores endogènes	42
1.17	Spectres typiques d'autofluorescence d'une muqueuse œsophagienne normale et d'un carcinome	44
2.1	Spectromètre Jobin Yvon CP200	50
2.2	Spectrofluorimètre portable	50
2.3	Système expérimental de spectroscopie de fluorescence	51
2.4	Maquette de spectroscopie de diffusion élastique	52
2.5	Schéma fonctionnel du système proposé	54
2.6	Vue en coupe des extrémités communes de trois sondes de fibres optiques utilisées	57
2.7	Exemples de sonde à fibres optiques pour des mesures en réflectance, en fluorescence et pour la combinaison des deux mesures	58
2.8	Disposition souhaitée des fibres	59
2.9	Disposition réelle des cœurs des fibres	59
2.10	Schéma fonctionnel du prototype souhaité	61
2.11	Photos du concentrateur	62
2.12	Schéma du module de réception	64
2.13	Schéma fonctionnel du système composite iXon-imSpector	65
2.14	Problèmes avec le système testé « imSpector + iXon »	65
2.15	Schéma de principe du système mis en œuvre pour l'expérimentation	67

3.1	Photons balistiques, serpentiles et multidiffusés	70
3.2	Optique Géométrique	76
3.3	Angle critique d'une fibre	77
3.4	Modèle physique de l'absorption	78
3.5	Exemples de spectres d'absorption	80
3.6	Intensité des diffusions de Rayleigh et de Mie	81
3.7	Schéma des différents régimes de diffusion en fonction de la dimension des éléments constitutifs des tissus biologiques	82
3.8	Modèle physique de la diffusion	84
3.9	Représentation des directions incidente et de rediffusion et de l'angle de déflexion	85
3.10	Exemples de fonction de phase de Rayleigh et de Mie	86
3.11	Exemple de fonction de phase d'Henyeey-Greenstein	87
3.12	Espace des grandeurs utilisées	89
3.13	Principe de migration aléatoire du photon	94
3.14	Schéma du modèle optique stratifié de tissu	97
3.15	Organigramme du programme de simulation de Monte Carlo	101
3.16	Détails de l'organigramme sur le déplacement des photons	102
3.17	Détails de l'organigramme sur la fluorescence	103
3.18	Exemple de réflectance simulée avec différents paramètres optiques	107
3.19	Autre exemple de réflectance simulée avec différents paramètres optiques	108
3.20	Coefficients d'absorption de l'encre de chine et de diffusion des intralipides	110
3.21	Spectres d'absorption de la fluorescéine, de l'éosine et de la cryptocyanine, Spectres de réflectance diffuse mesurée et simulée	111
3.22	Réflectances expérimentale et simulée en mode mono et multi-absorption pour un fantôme liquide composé de fluorescéine et d'éosine	111
3.23	Réflectances expérimentale et simulée pour un fantôme liquide composé de fluo- rescéine et de cryptocyanine	112
3.24	Représentation schématique de l'organisation des fantômes multi-couches	113
3.25	Réflectances mesurées et simulées pour des fantômes absorbant, diffusant et fluo- rescent	114
3.26	Réflectances mesurée et simulée pour le fantôme bi-couches (Éosine / Fluorescéine)	115
3.27	Réflectances mesurée et simulée pour le fantôme bi-couches (Fluorescéine / Cryp- tocyanine)	115
3.28	Réflectances mesurée et simulée pour le fantôme tri-couches (Encre de chine / Éosine / Fluorescéine)	116
4.1	Artère en coupe	119
4.2	Banc de test utilisé lors des expériences <i>ex vivo</i>	123
4.3	Réponse du capteur de force du banc de test et linéarité de la jauge de contrainte	124
4.4	Représentation d'un anneau artériel appelé « non chargé » et d'un anneau artériel pincé	124
4.5	Représentation d'un anneau artériel en traction	125
4.6	Réseau d'élastine/collagène en microscopie multiphotonique et noyaux cellulaires	127
4.7	Modèle tri-couches utilisé pour simuler le transport de la lumière dans le tissu artériel	131
4.8	Images de coupes histologiques	132
4.9	Rhéogrammes moyens pour tous les échantillons	133
4.10	Modules d'élasticité incrémentaux	134

4.11	Exemple de spectres moyens d'autofluorescence normalisés en pic et en surface entre 480 et 810 nm	135
4.12	Aires et rapports des aires sous les courbes d'intensité spectrale de fluorescence .	136
4.13	Exemple de spectres bruts de diffusion élastique et de réflectance diffuse	137
4.14	Aires sous les courbes d'intensité spectrale de diffusion élastique en fonction de la déformation appliquée	138
4.15	Spectres de diffusion élastique simulés	140
4.16	Valeurs des coefficients d'absorption, de diffusion et du facteur d'anisotropie pour 3 déformations différentes pour la média, l'adventice et l'intima pour un anneau artériel frais et cryoconservé, pour 3 longueurs d'onde différentes ($\lambda = 700, 740, 780$ nm	142
4.17	Spectres de diffusion élastique simulés avec nos propres paramètres optiques . . .	143
4.18	Spectres d'autofluorescence mesuré et simulé avec nos propres paramètres optiques	144
5.1	Dispositif utilisé lors des expériences <i>in vivo</i>	149
5.2	Schéma de base de la culture cellulaire	151
5.3	Sites des mesures spectroscopiques	153
5.4	Schéma représentant les traitements des données	157
5.5	Images de coupes histologiques	158
5.6	Exemples de spectres d'autofluorescence	159
5.7	Autofluorescence mesurée <i>in vivo</i> sur une muqueuse de vessie saine, inflammatoire et tumorale avec des longueurs d'onde d'excitation à 337 et 480 nm	160
5.8	Histogrammes représentant le rapport des pics d'intensité d'autofluorescence à 615 et 565 nm, exemples de spectres d'autofluorescence	161
5.9	Exemples de spectres filtrés de réflectance diffuse	162
5.10	Valeurs des pentes des spectres de réflectance diffuse entre 440 et 470 nm	163
5.11	Exemples de spectres de fluorescence intrinsèque	164
5.12	Exemple de dendogrammes pour la plus petite distance entre la fibre d'excitation et les fibres d'émission avec les valeurs explicatives considérées comme discriminantes	166
A.1	Distance entre les centres des cœurs des fibres optiques de notre capteur	196
D.1	Illustration de la théorie des deux flux dans le modèle de Kubelka-Munk	205
E.1	Coordonnées sphériques et cartésiennes	207

Liste des tableaux

1.1	Vrais et faux positifs	10
1.2	Classification TNM des tumeurs de la vessie	15
1.3	Principales bandes de longueurs d'onde du spectre électromagnétique	19
1.4	Comparaison de la sensibilité et de la spécificité entre différents types de spectroscopies	22
1.5	Pics de longueurs d'onde d'excitation et d'émission des principaux chromophores et fluorophores endogènes des tissus biologiques	41
2.1	Evolutions souhaitées entre la maquette existante et le nouveau prototype de diffusion élastique	53
3.1	Exemple de valeurs d'indice de réfraction	78
3.2	Comparaison des caractéristiques de différentes simulations	107
3.3	Vérification de la réflectance diffuse totale d'un milieu trouble	108
3.4	Vérification de la réflectance diffuse totale dans un milieu semi-infini avec une frontière « mal définie »	109
3.5	Caractéristiques des fantômes multi-couches	113
4.1	Valeurs des épaisseurs et des longueurs des échantillons artériels	132
4.2	Test Anova (rhéogrammes)	133
4.3	Test Student-Fisher (rhéogrammes)	133
4.4	Test statistique : Anova, Fluorescence	136
4.5	Test statistique : Student-Fisher, Fluorescence	137
4.6	Test statistique : Anova, Réflectance diffuse	138
4.7	Test statistique : Student-Fischer, Réflectance diffuse	138
4.8	Paramètres optiques du tissu artériel tirés de la littérature	139
4.9	Test T de Student sur les résultats simulés	143
5.1	Test T de Student-Fisher effectué sur les données d'aire totale sous la courbe des spectres d'autofluorescence	160
5.2	Test Student-Fisher, Réflectance Diffuse	163
5.3	Test T de Student-Fisher effectué sur les données d'aire totale sous la courbe des spectres de fluorescence intrinsèque	165
5.4	Valeurs de k optimisées	165
5.5	Sensibilité et Spécificité	167
5.6	Valeurs prédictives positive et négative	168
B.1	Exemples de valeurs d'indice de réfraction	197

B.2	Exemples de valeurs d'indice de réfraction pour des tissus biologiques	198
B.3	Valeurs de quelques paramètres optiques pour des tissus biologiques	199

Liste des acronymes

AFB « Autofluorescence Bronchoscopy » ou Bronchoscopie d'AutoFluorescence

ANOVA « ANalysis Of the Variance » ou Analyse de la Variance

AY27 Animal, Yang, 27 repiquages avant sa forme finale

ACP Analyse en Composantes Principales

AMM Autorisation de Mise sur le Marché

CCD « Charged Couple Device » ou Dispositif à Transfert de Charge

CIS Carcinome *In Situ* ou carcinome intra-épithélial

DMSO DiMéthyl SulfOxide

DRS « Diffuse Reflectance Spectroscopy » ou Spectroscopie de Réflectance Diffuse

EAF Endoscopie d'AutoFluorescence

ECBU Examen CytoBactériologique des Urines

ELB Endoscopie en Lumière Blanche

ESS « Elastic Scattering Spectroscopy » ou Spectroscopie de Diffusion Élastique

FAD « Flavin Adenine Dinucleotide »

FANFT N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]-formamide

FOCI « Fiber Optic Confocal Imaging »

FWMH « Full Width Half Maximum » ou largeur à mi-hauteur

Hb désoxyhémoglobine

HbO₂ oxy-hémoglobine

HCl Acide Chlorhydrique

HE Hematoxyline - Eosine

IV Intra-Veineuse

IR InfraRouge

KCl Chlorure de Potassium

LIFS « Light Induced Fluorescence Spectroscopy » ou spectroscopie de fluorescence induite par lumière laser

LSS « Light Scattering Spectroscopy » ou Spectroscopie de diffusion de la lumière

LIFS « Light Induced Fluorescence Spectroscopy » ou Spectroscopie de Fluorescence Induite

NADH reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen

NADPH reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen

NaOH Hydroxyde de Sodium

NIR « Near InfraRed » ou Proche InfraRouge

OCT « Optical Coherence Tomography »

ON Ouverture Numérique ou « Numerical Aperture » (NA)

PDT Thérapie PhotoDynamique

PTD « Probe-to-Target Distance » ou distance sonde-tissu (DST)

ROC « Receiver Operating Characteristic » ou courbe caractéristique d'efficacité

SDS « Source-to-Detector Separation » ou distance source-détecteur (DSD)

Se Sensibilité ou « Sensitivity »

SMA « Sub-Miniature, A connector »

SNR « Signal to Noise Ratio » ou rapport signal sur bruit

Sp Spécificité ou « Specificity »

SRESS « Space Resolved Diffuse Reflectance Spectroscopy » ou Spectroscopie de Diffusion Élastique Résolue dans l'Espace

TOD Tomographie Optique Diffuse

TMS « Tri-Modal Spectroscopy » ou Spectroscopie Tri-Modale

TRMC Taux de Réjection en Mode Commun

UV UltraViolet

VOP Vitesse de l'Onde de Pouls ou « Pulse Wave Velocity » (PWV)

WLB « White Light Bronchoscopy » ou Bronchoscopie en Lumière Blanche

Nomenclature

Grandeurs

A_a	Section géométrique ou physique de la particule, cm^2
<i>absorb</i>	Quantité d'énergie absorbée
<i>albedo</i>	Quantité d'énergie non absorbée
c_0	Célérité de la lumière dans le vide, 3.10^8 m.s^{-1}
$[C]$	Concentration molaire, mol.L^{-1}
d	Déplacement entre deux événements
D	Constante de diffusion
DO	Densité Optique ou Absorbance
e	Épaisseur, mm
E	Énergie, J
E	Module d'Young
E_{inc}	Module élastique incrémental
$f(\vec{s}, \vec{s}')$	Fonction de phase normalisée
f_{m-HG}	Fonction de phase d'Heney-Greenstein modifiée
F	Force axiale appliquée, N
g	Facteur d'anisotropie
h	Constante de Planck, $6,64.10^{-34} \text{ J.s}$
I_r	Intensité radiante, W.sr^{-1}
$I(\vec{r}, \vec{s}, t)$	Radiance, $\text{W.m}^{-2}.\text{sr}^{-1}$
$\vec{j}$	Flux surfacique radiatif
J	Nombre de diffuseurs par unité de volume
$\vec{k}$	Vecteur d'onde
k_{lin}	Coefficient d'extinction linéique
K	Fraction de flux absorbée (coefficient d'absorption) utilisée dans la théorie de Kubelka-Munk
l_a	Libre parcours moyen d'absorption, cm
l_s	Libre parcours moyen de diffusion, cm
l^*	Libre parcours moyen de transport, cm
L	Longueur de l'échantillon, mm
$L(\vec{r}, \vec{s}, t)$	Luminance, $\text{W.m}^{-2}.\text{sr}^{-1}$
n	Indice de réfraction
n_i	Indice de réfraction du milieu incident
n_t	Indice de réfraction du milieu transmis
p	Probabilité
$\vec{P}$	Vecteur de Poynting

$\vec{P}_E$	Polarisation électrique
P_N	Approximation polynomiale jusqu'à l'ordre N
Q	Source lumineuse
Q_a	Efficacité d'absorption
R	Coefficient de réflexion
$R_{I_{615}/I_{565}}$	Rapport d'intensité des pics des spectres à 615 nm et 565 nm
R_g	Coefficient de réflexion diffuse de Kubelka-Munk
R_∞	Réflectance limite de Kubelka-Munk
R_{KM}	Réflectance diffuse de Kubelka-Munk
S_{KM}	Fraction de flux diffusée (coefficient de diffusion) utilisée dans la théorie de Kubelka-Munk
S	Section de l'éprouvette artérielle, m^2
$S_1(\theta), S_2(\theta)$	Fonctions d'amplitudes pouvant s'écrire en fonction des polynômes de Legendre et de fonctions de Bessel sphériques
t	Durée, ms
T	Transmittance du milieu
$\vec{u}$	Vecteur unitaire normal à l'interface
V	Volume, m^3
W	Énergie du photon
x	Coordonnée spatiale suivant la direction $\vec{x}$
y	Coordonnée spatiale suivant la direction $\vec{y}$
z	Coordonnée spatiale suivant la direction $\vec{z}$

Symboles grecques

α_i	Angle formé entre la normale à l'interface et la trajectoire du photon
α_t	Angle de réfraction calculé
α_c	Angle critique
$d\Omega$	Angle solide élémentaire, sr
$\Delta\lambda$	Pas en longueur d'onde, nm
Δs	Pas d'un photon, cm
ϵ	Déformation, %
$\epsilon_{\theta\theta}$	Déformation circonférentielle
ε	Coefficient d'extinction molaire, $L.mol^{-1}.cm^{-1}$
λ	Longueur d'onde, nm
μ_a	Coefficient d'absorption, cm^{-1}
μ_{eff}	Coefficient d'extinction effective
μ_s	Coefficient de diffusion, cm^{-1}
$\mu_{s'}$	Coefficient de diffusion réduit, cm^{-1}
μ_t	Coefficient total d'extinction, cm^{-1}
μ_{tr}	Coefficient d'atténuation de transport
ω	Pulsation angulaire du rayonnement électromagnétique, $rad.s^{-1}$
ϕ	Rendement quantique de la fluorescence
ϕ	Angle azimuthal, $0 \leq \phi \leq 2\pi$ rad
ϕ_r	Flux radiant, W
ϕ_v	Flux lumineux, lm
Φ	Taux de fluence (ou densité de photons)
ρ	Densité volumique de particules, cm^{-3}

σ	Contrainte, N.m ⁻²
σ_a	Section efficace d'absorption exprimant l'efficacité de la rencontre photon-matière ou l'efficacité d'absorption par une particule unique, cm ²
σ_s	Coefficient de diffusion, cm ²
$\sigma_{\theta\theta}$	Contrainte circonférentielle, N.m ⁻²
θ	Angle de déflexion ou colatitude, $0 \leq \theta \leq \pi$ rad
ξ, ξ_1, ξ_2	Nombres aléatoires distribués uniformément

Indices

calc	Calculé
------	---------

Notations mathématiques

$\vec{A}^*$	Conjugué de $\vec{A}$
$\vec{A} \cdot \vec{B}$	Produit scalaire
$\vec{A} \wedge \vec{B}$	Produit vectoriel
$\Delta = \nabla^2$	Laplacien
$\overrightarrow{div}(\vec{E})$	Divergence d'un champ vectoriel $\vec{E}$
$\overrightarrow{grad}(V)$	Gradient d'une fonction ou d'un champ scalaire $V(x, y, z)$
$\overrightarrow{rot} \vec{E}$	Rotationnel d'un champ vectoriel $\vec{E}$

Introduction

LE travail de thèse présenté dans ce mémoire a été réalisé au CRAN (Centre de Recherche en Automatique de Nancy) dans le groupe thématique IPS (Ingénierie Pour la Santé) et s'inscrit au sein de l'action SpID (Spectro-Imagerie de Diagnostic), en étroite collaboration avec le CAV (Centre Alexis Vautrin). Il s'insère dans l'un des axes de recherche de l'équipe SpID visant à concevoir, développer, caractériser et évaluer de nouvelles modalités de diagnostic par méthodes spectroscopiques atraumatiques pour détecter, localiser et identifier des cellules ou tissus pathologiques. Le champ applicatif concerne le diagnostic *in vivo* de lésions pré-cancéreuses et de cancers superficiels, plus particulièrement les cancers infra-cliniques des épithéliums comme ceux de la vessie ou de la peau notamment.

Plus de 10 millions de cas de cancer dans le monde (environ 280 000 en France) sont diagnostiqués chaque année et on estime que ce chiffre atteindra 15 millions en 2020. En France, selon une étude économique publiée par l'Institut National du Cancer (INCa), la maladie représenterait, avec les soins, la prévention, la recherche et le dépistage, une dépense de l'ordre de 30 milliards par an : c'est pourquoi le gouvernement français a mis en place un plan de mobilisation nationale contre le cancer [MILC, 2003]. Une lutte efficace implique d'agir à la fois sur la *prévention*, le *diagnostic* et la *thérapie*.

La détection des cancers à un stade précoce est un enjeu majeur car elle augmente de façon significative les chances de guérison et simplifie considérablement la thérapie, en utilisant des traitements moins agressifs et de coûts réduits. L'utilisation des interactions de la lumière avec les tissus à des fins diagnostiques *in vivo* constitue en recherche fondamentale, appliquée et clinique un axe de développement prometteur et en plein essor. Actuellement, dans le cas des organes creux (poumons, intestin, estomac, vessie...), la détection des lésions cancéreuses est effectuée le plus souvent lors d'un examen endoscopique en lumière blanche : le clinicien prélève plusieurs échantillons de tissu (biopsies) sur les sites suspects visibles et l'analyse histo-pathologique de ces prélèvements permet de poser le diagnostic de référence. Cependant, certaines lésions pré-cancéreuses ou cancéreuses précoces restent difficiles à repérer lors de cet examen. Par ailleurs, le nombre de biopsies sur l'organe reste limité, en raison du caractère invasif de l'intervention. Il serait donc intéressant de disposer d'une méthode sensible, non invasive et utilisable *in situ* par le clinicien, pour l'aider à guider les biopsies (amélioration de la spécificité clinique de la procédure) voire à caractériser la nature du tissu sondé *in vivo*.

La **spectroscopie tissulaire**, également appelée *spectroscopie optique de diagnostic* ou « *biopsie optique* », est une méthode répondant à ces exigences : elle consiste à faire l'analyse spectrale du rayonnement émis par un tissu, en réponse à une excitation lumineuse adéquate [A'Amar and Bigio, 2006]. Cette technique de diagnostic en cours de développement est particulièrement bien adaptée à la détection des lésions épithéliales et sub-épithéliales (épaisseurs limitées). Elle est compatible avec les méthodes endoscopiques d'exploration (fibres optiques). L'interaction entre

la lumière et un tissu biologique peut faire intervenir de nombreux phénomènes tels que l'absorption, la fluorescence, la diffusion élastique et/ou inélastique. Aujourd'hui très développée, la spectroscopie de fluorescence fut la première méthode de spectroscopie tissulaire utilisée à des fins diagnostiques *in vivo* [Bourg-Heckly *et al.*, 2000]. Les principaux travaux en spectroscopie d'autofluorescence pour le diagnostic clinique *in vivo* concernent le col de l'utérus, l'œsophage, les bronches et le colon. La spectroscopie de diffusion élastique, malgré un nombre plus limité de travaux, suscite un intérêt croissant [Gurjar *et al.*, 2001]. Ses principales applications pour le diagnostic clinique *in vivo* se concentrent sur l'œsophage, le colon, les seins et la peau.

Porteuses d'informations liées à la nature biochimique, à l'activité métabolique et à la structuration du tissu (tailles et formes des éléments constitutifs, orientation, coefficients optiques...), l'autofluorescence et la diffusion multiple des photons « déforment » de manière significative les caractéristiques d'émission spectrale des tissus biologiques. L'intensité lumineuse mesurée (spectre, image) est donc la résultante d'une combinaison d'absorption « pure », d'absorption par la fluorescence (excitation) et de diffusions multiples, résultante qui dépend de la longueur d'onde. Par exemple, pour le diagnostic, l'intérêt de rechercher un ou plusieurs fluorophores intrinsèques sera fonction entre autre de la localisation tissulaire ou cellulaire (profondeur, concentration), des spectres d'excitation-émission voire des matrices spectrales d'excitation-émission, ainsi que de l'organe étudié. 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 [Lin *et al.*, 2000] [Georgakoudi *et al.*, 2002].

Ainsi, le but de nos travaux est de développer et mettre en œuvre une méthode de spectroscopie de réflectance combinant autofluorescence et diffusion élastique en excitation continue pour la détection de tissus sains et cancéreux *in vitro* et *in vivo*. Cette approche nécessite en parallèle l'investigation des problèmes liés à l'instrumentation, aux traitements des données et à la modélisation des phénomènes d'interaction lumière-tissus. La problématique concerne l'amélioration de la sensibilité et surtout de la spécificité du diagnostic (sain-inflammatoire-cancéreux) pré-biopsique.

Plus précisément, nos travaux portent sur :

- l'**instrumentation** : développement, réalisation et caractérisation expérimentale d'un système de spectrométrie bimodale de réflectance (autofluorescence et diffusion élastique) fibrée, multi-points et utilisable *in vivo*,
- la **modélisation des propriétés optiques du tissu** : développement et validation d'un algorithme de simulation des interactions lumière-tissus, adapté à nos besoins et à notre configuration de mesure,
- la **validation expérimentale** avec différentes étapes complémentaires : fantômes pour la simulation, tissu *ex vivo* et modèle tumoral *in vivo* sur l'animal pour l'identification d'états sains, dysplasiques et cancéreux dans la vessie.

Le premier chapitre présente le contexte applicatif de l'étude : nous abordons d'abord les principales définitions et données bibliographiques liées aux tissus cancéreux, à leur classification histologique, à leur détection et au diagnostic clinique utile pour situer notre problématique. Sont ensuite énoncés les objectifs spécifiques de nos travaux. Enfin, un état de l'art détaillé sur des études réalisées en spectroscopie tissulaire est donné.

Le deuxième chapitre est consacré aux travaux en instrumentation. Nous présentons tout d'abord les principales caractéristiques des dispositifs existant au laboratoire et nous définis-

sons nos besoins. Nous développons ensuite les études réalisées et les difficultés rencontrées pour le développement d'un nouveau dispositif couplant la spectroscopie de diffusion élastique à la spectrométrie de fluorescence et passant par l'étude de solutions technologiques optimisées notamment pour les sources de lumière et le capteur à fibres optiques. Enfin, nous précisons les caractéristiques techniques du système finalement mis en place.

Le troisième chapitre porte sur la modélisation des interactions lumière-tissus. Nous exposons d'abord les bases théoriques nécessaires à la compréhension de la modélisation de la propagation des photons dans les tissus : propriétés optiques des tissus, équation de transfert radiatif, différentes modélisations existantes... Ensuite, nous nous appuyons sur les algorithmes existant dans la littérature pour développer un algorithme de modélisation statistique de la propagation des photons dans les tissus (absorption et diffusion) et nous développons la partie originale de nos travaux sur la fluorescence multiple que nous avons implémentée. Nous présentons les caractéristiques particulières de notre simulateur liées à notre application. Enfin, nous terminons par la validation expérimentale de l'algorithme à l'aide de fantômes synthétiques absorbants, diffusants et fluorescents.

Le quatrième chapitre présente l'étude *ex vivo* réalisée en début de thèse sur des vaisseaux artériels (intérêt lié notamment au collagène et à l'élastine). Nous recherchons des corrélations éventuelles entre les comportements rhéologiques de ces tissus sous contraintes et les modifications d'intensité et/ou d'allure spectrales en réponse à une excitation. Cette étude originale, réalisée à partir des deux systèmes instrumentaux disponibles au laboratoire, nous a permis de définir les caractéristiques d'un système unique de spectroscopie bimodale (spectromètre, capteur, sonde à fibres optiques...) adapté à l'étude finale *in vivo* prévue. Elle nous a également permis de disposer rapidement de données expérimentales sur tissus biologiques utiles à la modélisation.

Le cinquième chapitre est consacré à l'étude *in vivo* réalisée en fin de thèse. Après justification du choix du modèle utilisé (modèle de tumeur orthotopique instillée dans la vessie de rat), nous montrons que les résultats obtenus, en analysant les spectres de réflectance diffuse, d'autofluorescence et de fluorescence intrinsèque, permettent d'augmenter la qualité du diagnostic (sain/inflammatoire/tumoral). Cette étude a également permis de tester le système de spectroscopie bimodale mis en place au laboratoire.

1

Contexte de l'étude et problématique scientifique

Ce chapitre présente, en première partie, une étude bibliographique des méthodes optiques pour le diagnostic : principes, applications actuelles en cancérologie, avantages et limites. La seconde partie est consacrée à la présentation de notre problématique scientifique et des objectifs de recherche spécifiques aux principaux axes de travaux (instrumentation, traitement des données, modélisation des interactions lumière-tissus et validations expérimentales). La dernière partie propose un état de l'art des spectroscopies tissulaires appliquées au diagnostic *in vivo*.

1.1 Cadre Applicatif de l'étude

Nous décrivons ici les principales caractéristiques biochimiques, anatomiques et physiologiques des cancers épithéliaux et plus particulièrement des cancers de la vessie. Certaines de ces caractéristiques entraînent des modifications physico-optiques qui peuvent être mesurées *in vivo*. Nous présentons également les méthodes de biopsie optique en cours de développement pour le diagnostic.

1.1.1 Le cancer

Dans les pays industrialisés, les cancers¹ arrivent au deuxième rang des causes de mortalité (27%) après les maladies cardio-vasculaires [DREES, 2006]. Sur un total de 58 millions de décès enregistrés au niveau mondial en 2005, 7,6 millions (soit 13%) étaient dus au cancer [OMS, 2006]. Selon les projections, le nombre des cas de cancer devrait continuer à augmenter dans le monde, phénomène en partie dû à l'allongement de la durée de vie (exemple : en France, de 1975 à 1995 : hausse de 21% chez l'homme et de 17% chez la femme). [OMS, 2006] estime que 9 millions de personnes mourront d'un cancer en 2015 et 11,4 millions en 2030.

¹Terme général appliqué à un groupe de plus d'une centaine de maladies qui peuvent atteindre n'importe quelle partie de l'organisme.

1.1.1.1 Définitions

Chez l'homme sain, — l'être humain est constitué de 10^{14} cellules, organisées en tissus, organes et systèmes, qui sont constamment renouvelées [Alberts *et al.*, 2005] —, l'organisme assure une régulation de la prolifération, de la différenciation et de la mort cellulaire.

Un cancer se définit par [Wayt Gibbs, 2003] [Hakumäki and Liimatainen, 2005] [Conroy, 2006b] :

- une perte de contrôle de la multiplication cellulaire,
- une perte de l'apoptose (mort cellulaire programmée indispensable à l'équilibre du corps pour tenir compte du renouvellement des tissus),
- une perte de la différenciation cellulaire,
- un caractère invasif,
- une capacité métastatique.

Le cancer peut rester longtemps « muet » : une lésion infra-clinique est une lésion asymptomatique.

La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse est liée à différents facteurs environnementaux et/ou endogènes intervenant dans l'altération du patrimoine génétique. Au fur et à mesure du développement du cancer, les cellules tumorales acquièrent une instabilité génétique de plus en plus marquée, aboutissant à des mutations de plus en plus nombreuses [Heron, 1997]. Les cellules malignes portent un nombre anormal et instable de chromosomes ainsi que de nombreuses anomalies chromosomiques.

Les mécanismes biologiques de la cancérogénèse sont principalement [Conroy, 2006a] :

- les oncogènes,
- les gènes suppresseurs de tumeurs (gènes dont la perte de fonction participe à la carcinogénèse),
- les mutations,
- les défauts de réparation de l'ADN.

Nous distinguons deux sortes de tumeurs :

- la *tumeur bénigne* : elle ne menace pas l'homme parce qu'elle est limitée par une « capsule » et ne récidive pas après ablation. Les cellules d'une telle tumeur ressemblent à des cellules normales et peuvent fonctionner comme telles. Ces tumeurs posent des problèmes lorsque leur volume interfère avec le fonctionnement normal d'un organe ou lorsqu'elles sécrètent des substances actives comme des hormones. Par exemple, les *naevus* ou grains de beauté sont des tumeurs bénignes constituées de mélanocytes, cellules normalement présentes dans la peau.
- la *tumeur maligne* (synonyme de cancer) : elle menace la vie de l'homme parce qu'elle détruit, infiltre les tissus voisins et peut se disperser dans l'organisme (métastases). La multiplication des cellules génère une masse de tissu appelée « tumeur » ou « néoplasme », laquelle détruit l'organe dans lequel elle se développe et les organes voisins. Les cellules cancéreuses se propagent par les vaisseaux sanguins (artères et veines) et le système lymphatique ; elles s'implantent à distance dans d'autres organes (pouvoir métastatique). La précocité et le nombre de métastases représentent un des indicateurs essentiels de gravité des cancers. Le siège de celles-ci se déduit des voies de propagation et de l'organisation vasculaire des organes tels que le foie, les poumons, les os et la moelle osseuse.

85% des cancers prennent naissance dans les couches superficielles des organes (épithélium), dont 50% au sein des muqueuses des organes creux (voies aériennes : trachées, bronches ; voies

digestives : œsophage, estomac, intestin, côlon et voies urinaires : urètre, vessie, col de l'utérus) [Backman *et al.*, 2000] [Skala *et al.*, 2004].

1.1.1.2 Tissus épithéliaux

Dans le cas des tissus épithéliaux, on distingue différents stades d'évolution : la figure 1.1 les représente schématiquement [Alberts *et al.*, 2005].

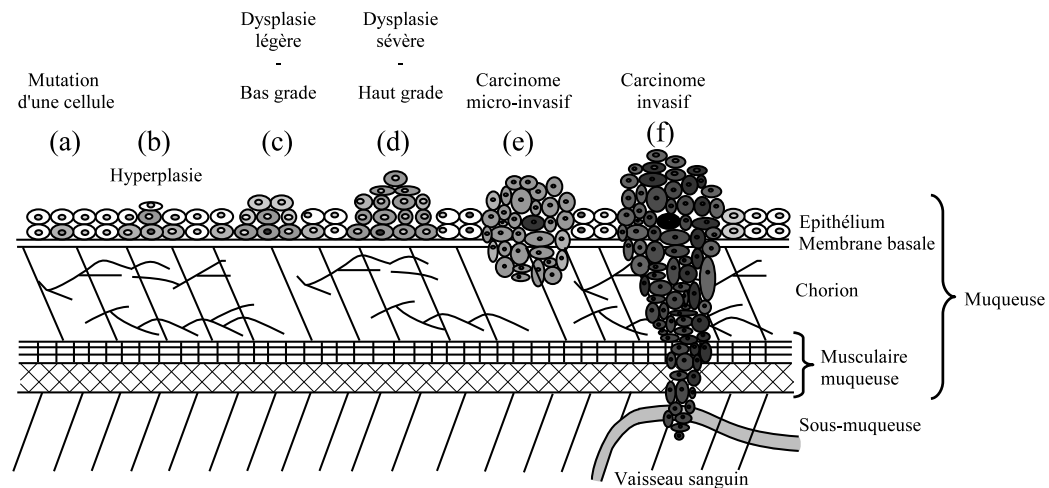


FIG. 1.1 – Schéma simplifié des différentes étapes d'évolution d'un tissu épithélial cancéreux (modifié de [Valette and Bourg-Heckly, 2002]). (a) mutation d'une cellule, (b) augmentation anormale du nombre de cellules et de la masse du tissu (hyperplasie), (c) et (d) développement anormal du tissu (dysplasies de bas grade et de haut grade), (e) des tumeurs malignes infiltrant le chorion et rompent la membrane basale (carcinome micro-invasif) et (f) les cellules malignes se propagent et peuvent envahir d'autres tissus (carcinome invasif).

Très schématiquement, un cancer se développe à partir d'une cellule mutante (Fig. 1.1 a), dont les modifications internes, en particulier l'incapacité de mourir par *apoptose*, facilitent la prolifération et la survie.

L'**hyperplasie** correspond à une augmentation du nombre de cellules du tissu (Fig. 1.1 b). Ces cellules sont soit normales, soit porteuses d'anomalies initiant une dégénérescence maligne.

La **dysplasie** correspond à une nouvelle étape de mutation : le nombre de cellules augmente de façon significativement anormale (potentiellement dangereuse mais réversible à ce stade et sans danger de métastase). On peut classer les dysplasies en dysplasies de bas grade et en dysplasies de haut grade (Fig. 1.1 c et d).

Le **carcinome *in situ*** (CIS ou carcinome intra-épithélial ou dysplasie de haut grade) est une prolifération des cellules épithéliales cancéreuses ne franchissant pas la membrane basale de l'épithélium sur laquelle elles reposent et qui les sépare du reste des tissus (Fig. 1.1 e). Les caractéristiques de ces lésions sont la désorganisation de l'architecture de l'épithélium, des anomalies de la différenciation cellulaire, l'irrégularité de taille des cellules et des noyaux, et l'augmentation du nombre de mitoses (reproductions conformes des cellules) [Vignaud, 2004] [Berger, 2006]. Les dysplasies sont des lésions *pré-cancéreuses* : le processus de cancérisation est à un stade précoce et peut soit régesser, soit rester stable de façon très prolongée (de nombreuses années), soit s'aggraver (apparition d'un cancer invasif). Le carcinome *in situ* correspond à une petite masse de cellules qui ont les apparences de cellules malignes mais qui ne franchissent pas la membrane

basale.

Dès que la membrane basale est franchie, on parle de **cancer invasif**. La tumeur se développe : elle envahit les structures sous-jacentes et arrive au contact des vaisseaux sanguins ou lymphatiques (Fig. 1.1 f). Les cellules peuvent se propager dans l'organisme et former des *métastases*. Dès que le diagnostic de cancer est posé, le médecin doit mettre en œuvre un traitement approprié : le traitement est plus efficace lorsque la maladie est décelée tôt. Il s'agit donc de repérer le cancer lorsqu'il est encore localisé [OMS, 2006]. D'où un besoin de développer des méthodes de diagnostic de plus en plus précises adaptées à la détection des lésions épithéliales.

Caractéristiques des tissus épithéliaux néoplasiques et conséquences physico-optiques

Au fur et à mesure du processus de cancérisation, le tissu pathologique se différencie du tissu sain par des modifications anatomiques, biochimiques, physiologiques... Selon [Stevens *et al.*, 2004] [Alberts *et al.*, 2005] [Berger, 2006], les signes architecturaux et cytologiques de malignité sont :

- une désorganisation de l'architecture tissulaire, variable selon la différenciation cellulaire,
- une infiltration des tissus voisins,
- une stroma-réaction. Le stroma est un tissu conjonctif néoformé, non tumoral mais constituant un micro-environnement favorable au développement de la tumeur,
- autres modifications :
 - néo-vascularisation qui se développe au sein des tumeurs de taille supérieure à 2 mm de diamètre, ce qui leur assure un approvisionnement suffisant en oxygène et en nutriments [Métais, 1997],
 - hyper-chromatisme (épaississement et densification de la chromatine, association complexe d'ADN et de protéines en fibre) et hyper-métabolisme des cellules tumorales (production augmentée de Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogène, ou NADH, épaississement de l'épithélium),
 - changement des états d'oxydo-réduction de certaines molécules [Haringsma and Tytgat, 1999] et perte de polarité cellulaire (changement d'orientation),
 - activité de multiplication cellulaire anormalement élevée,
 - augmentation de la taille des noyaux (normalement de 4 à 7 μm , elle peut atteindre 20 μm et occuper presque tout le volume de la cellule cancéreuse), muqueuse plus épaisse résultant d'une production cellulaire accrue. L'augmentation du rapport volumique noyau sur cytoplasme est un indice du cancer et de la dysplasie [Mourant *et al.*, 1998] [Wallace *et al.*, 2000],
 - synthèse anormale des molécules et modifications des interactions cellulaires (perturbation du transport transmembranaire et de la perméabilité cellulaire, activité métabolique modifiée) [Métais, 1997],
 - infidélité de transcription de l'ADN [Genclis, 2007].

Ces modifications anatomiques, physiologiques et biochimiques entraînent des modifications globales d'absorption et de diffusion de la lumière dans les tissus cancéreux [Valette and Bourge-Heckly, 2002]. Ainsi, lors d'une excitation dans l'ultraviolet (vers 330 nm), la présence d'une dysplasie sévère provoque une forte diminution de l'expression de la fluorescence du collagène (pic d'émission du collagène autour de 390 nm). Ce phénomène, observé notamment dans l'œsophage, le côlon et la vessie, est attribué à une modification de la morphologie tissulaire.

Par ailleurs, ces modifications locales des propriétés optiques des tissus se répercutent sur les

caractéristiques de la lumière rétrodiffusée par ceux-ci et sur les spectres de diffusion élastique. En évaluant la méthode sur des modèles théoriques et expérimentaux, des différences entre tissus sains et cancéreux ont été établies à partir des spectres d'intensité sur la vessie, le col de l'utérus, le côlon et ce, avec une sensibilité et une spécificité de plus de 90% [Mourant *et al.*, 1995] [Mourant *et al.*, 1996]. Ainsi, à partir du spectre de diffusion des noyaux, il est possible de déterminer la distribution de leur taille et de leur indice de réfraction, ce qui permet notamment d'évaluer quantitativement l'augmentation de taille des noyaux [Mourant *et al.*, 1998] [Wallace *et al.*, 2000]. Les conséquences physico-optiques des modifications anatomiques, physiologiques et biochimiques seront développées dans la partie 1.3.

1.1.2 Du dépistage au diagnostic du cancer

1.1.2.1 Le dépistage

Le dépistage vise à repérer une maladie à un stade précoce, avant que la personne ne présente les symptômes de cette maladie.

Le dépistage du cancer consiste en l'application systématique, dans une population asymptomatique à « risque », d'un examen capable de détecter soit une lésion pré-cancéreuse, soit un cancer infra-clinique à un stade précoce de son développement. Cela implique dans le premier cas, une absence de cancer et dans le deuxième cas, une amélioration du pronostic et des chances de guérison [Bobin *et al.*, 1998].

Le principal objectif du dépistage est d'abaisser la mortalité grâce à un traitement plus précoce (meilleure efficacité, augmentation de la survie) ou à un traitement des états pré-cancéreux (d'où une diminution de l'incidence des cancers). Il s'agit ensuite de réduire la morbidité (traitements moins agressifs) et enfin, de réduire les séquelles.

Il s'agit donc d'**abaisser la morbidité et la mortalité par cancer** et de **diminuer les séquelles thérapeutiques** en diagnostiquant et en traitant les lésions pré-cancéreuses avant la phase d'expression clinique de la maladie [FNCLCC, 1998]. La prévention secondaire vise à abaisser l'incidence du cancer par traitement des états pré-cancéreux. Les techniques de dépistage – actuellement frottis (col), mammographie (sein), cytopathologie des urines et endoscopie (vessie, côlon ...) – seront détaillées dans la section 1.1.3.4.

1.1.2.2 Le diagnostic

Le diagnostic est la démarche qui permet d'identifier la maladie à partir de ses symptômes. Il repose sur la recherche des causes (étiologie) et des effets (symptômes) de l'affection [Heron, 1997].

Typiquement, le diagnostic se déroule en plusieurs temps : l'anamnèse (ou histoire de la maladie), l'examen clinique et des examens complémentaires (analyse biologique, radiographie, endoscopie, biopsie, intervention chirurgicale...).

La détection des cancers à un stade précoce constitue un enjeu sociétal, économique et humain majeur puisqu'elle permet une **augmentation importante des chances de guérison** (traitement précoce, dépistage précoce d'une récurrence après traitement) et **simplifie la thérapie, en utilisant des traitements moins agressifs et aux coûts réduits**.

Actuellement, dans le cas des organes creux, cette détection est effectuée le plus souvent lors d'un examen endoscopique en lumière blanche (endoscopie souple ou rigide, vidéo-endoscopie). Celui-ci permet de visualiser l'aspect macroscopique de la surface des muqueuses et de repérer

les sites considérés comme suspects, lesquels font alors l'objet de biopsies pour déterminer la nature histo-pathologique exacte du tissu [Wilczynski, 2001]. L'endoscopie conventionnelle permet d'identifier les cancers suffisamment avancés pour avoir provoqué une modification de l'aspect macroscopique de la muqueuse. La visualisation des états pré-cancéreux (dysplasies et carcinomes *in situ*) et cancéreux précoces (cancers micro-invasifs) est plus difficile : les modifications histologiques ne sont décelables qu'à l'examen microscopique d'un fragment tissulaire prélevé par biopsie. Le moyen de déceler la présence de ce type de lésion est d'effectuer systématiquement de nombreuses biopsies sur l'ensemble de la muqueuse, en s'attendant à ce que cette technique présente une faible sensibilité.

C'est pourquoi, **de nombreux travaux de recherche s'intéressent au développement de méthodes optiques sensibles et non invasives : elles permettraient de détecter les lésions pré-cancéreuses et les tumeurs précoces** [Bigio and Mourant, 1997] et d'éviter de nombreuses biopsies : études sur la vessie [Mourant *et al.*, 1995] [D'Hallewin *et al.*, 2002], le sein [Bigio *et al.*, 2000], l'œsophage [Bourg-Heckly *et al.*, 2000], le col de l'utérus [Uttinger *et al.*, 2001b]. . .

Parmi ces techniques figure la *spectroscopie tissulaire*, également appelée *spectroscopie optique de diagnostic* ou *biopsie optique*. Elle consiste à faire l'analyse spectrale du rayonnement émis par le tissu, en réponse à une excitation lumineuse appropriée [Palmer *et al.*, 2003a] [Palmer *et al.*, 2003b] [Tsai *et al.*, 2003], [Stone *et al.*, 2004] [Chang *et al.*, 2005]. . . Elle fait appel aux principes d'interaction entre la lumière et la matière et plus précisément à plusieurs phénomènes tels que la fluorescence, la diffusion élastique et inélastique (voir description détaillée dans le paragraphe 1.3).

1.1.2.3 Critères d'évaluation d'une technique de dépistage et/ou de diagnostic

La fiabilité et la performance d'une méthode de diagnostic sont définies à partir de leur sensibilité, leur spécificité et leurs valeurs prédictives.

L'évaluation d'une technique de dépistage et/ou de diagnostic repose sur la définition de plusieurs paramètres et doit pouvoir indiquer de façon fiable la présence ou l'absence de maladie chez un individu [Delahaye and Durand de Gevigney, 1999]. Les quatre situations d'un test diagnostique (le test peut être positif ou négatif et la maladie présente ou non) peuvent être représentées sous la forme du tableau 1.1. Appliqué à une population donnée, un test est caractérisé par les résultats qu'il permet d'obtenir en terme de nombre ou de pourcentage de :

- *vrai positif* : résultat positif d'un test sur un sujet malade,
- *faux positif* : résultat positif d'un test sur un sujet sain,
- *vrai négatif* : résultat négatif d'un test sur un sujet sain,
- *faux négatif* : résultat négatif d'un test sur un sujet malade.

TAB. 1.1 – Vrais et faux positifs.

	Sujets malades	Sujets sains
Test Positif	Vrais Positifs (VP)	Faux Positifs (FP)
Test Négatif	Faux Négatifs (FN)	Vrais Négatifs (VN)

A partir de ces quatre valeurs, quatre autres paramètres caractérisant la valeur diagnostique de l'examen sont définis ci-après :

- la sensibilité (Se) : probabilité pour un sujet malade de présenter un test positif (équation 1.1). Un test diagnostique est d'autant plus sensible que les sujets atteints de la maladie présentent plus souvent le signe « sujet malade ».

$$Se = \frac{\text{Nombre de sujets malades avec test positif}}{\text{Nombre total de sujets malades}} = \frac{VP}{VP + FN} \quad (1.1)$$

- la spécificité (Sp) : probabilité pour un sujet sain de présenter un test négatif (équation 1.2). Un test diagnostique est d'autant plus spécifique que les sujets sains présentent moins souvent le signe « sujet malade ».

$$Sp = \frac{\text{Nombre de sujets sains avec test négatif}}{\text{Nombre total de sujets sains}} = \frac{VN}{VN + FP} \quad (1.2)$$

La sensibilité et la spécificité dépendent uniquement des qualités du test (et éventuellement de l'opérateur). Pour un examen « parfait », c'est-à-dire sans erreur, les valeurs de la sensibilité et de la spécificité sont égales à 1. Si la présence du signe est définie par un « seuil de positivité », nous observons que ces deux paramètres varient en sens inverse lorsque nous faisons varier ce seuil. Généralement, plus un test est sensible, moins il est spécifique. A l'inverse, souvent, plus il est spécifique, moins il sera sensible. C'est pourquoi un seul de ces deux paramètres ne suffit pas à évaluer un examen : sensibilité et spécificité sont donc indissociables : un test ayant par exemple une sensibilité de 80% et une spécificité de 10% n'est pas valable.

Un test diagnostique de bonne sensibilité conduit à un résultat positif chez presque tous les malades. Il est donc utilisable pour un dépistage. Si le test possède une bonne spécificité, il conduit à un résultat négatif chez presque tous les non-malades. Il pourrait donc être utilisé comme examen diagnostique.

Nous utiliserons ces deux paramètres, sensibilité et spécificité, dans la suite de notre étude pour caractériser les performances de notre méthode de spectroscopie bimodale.

- la valeur prédictive positive (Vpp) du test : probabilité d'être malade chez les sujets dont le résultat au test est positif (équation 1.3).

$$Vpp = \frac{\text{Nombre de sujets malades avec test positif}}{\text{Nombre de tests positifs}} = \frac{VP}{VP + FP} \quad (1.3)$$

- la valeur prédictive négative (Vpn) du test : probabilité de ne pas être malade chez les sujets dont le résultat au test est négatif (équation 1.4).

$$Vpn = \frac{\text{Nombre de sujets sains avec test négatif}}{\text{Nombre de tests négatifs}} = \frac{VN}{VN + FN} \quad (1.4)$$

Les valeurs prédictives positive ou négative informent de la probabilité qu'un sujet ayant un test positif soit malade (valeur prédictive positive) ou qu'un sujet ayant un test négatif soit sain (valeur prédictive négative). Elles dépendent du contexte clinique (probabilité

pré-test) et des caractéristiques - sensibilité et spécificité - de l'examen. La valeur diagnostique d'une technique sera d'autant plus intéressante que la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative sont élevées [Heron, 2003].

Une valeur prédictive positive faible exige, pour confirmer le diagnostic, des examens supplémentaires « inutiles » à des sujets en bonne santé. Une valeur prédictive négative faible rassurerait à tort des personnes porteuses de maladie.

Un compromis doit donc être trouvé entre la sensibilité Se et la spécificité Sp . La courbe ROC (« Receiver Operating Characteristic » ou courbe caractéristique d'efficacité) permet d'étudier les variations de la spécificité et de la sensibilité d'un test pour différentes valeurs du seuil de discrimination. Plus la courbe ROC s'éloigne de la diagonale D pour rejoindre l'angle supérieur gauche (pas de discrimination entre sujet sain et sujet malade), plus le test diagnostique est globalement « puissant » (Fig. 1.2). Ainsi, la courbe A (en gras) permet de discriminer sans ambiguïté la maladie de son absence : le seuil est idéal ($Se = 1 - Sp = 1$) puisqu'il permet de séparer totalement tous les positifs des négatifs, sans faux positif, ni faux négatif. B et C sont les courbes schématiques mais plus réalistes de deux examens. Quel que soit le seuil, B a une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité que C [Delahaye and Durand de Gevigney, 1999] [Landais and Jais, 2002].

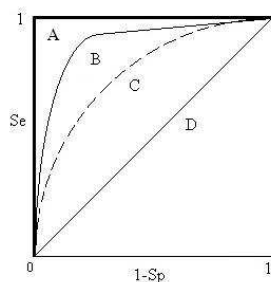


FIG. 1.2 – Exemple de courbe ROC, avec Se la sensibilité et $1-Sp$ le taux de faux positif.

1.1.3 Classification des tumeurs : cancer de la vessie

La tumeur la plus fréquente du système urinaire est le cancer de la vessie. Parmi les cancers des organes creux, il représente le 7^{ème} cancer le plus répandu dans le monde, soit 3,2% de l'ensemble des cancers [Tyczynski and Parkin, 2003]. En 2000, en France, selon le Centre International de Recherche sur le Cancer, les tumeurs de vessie représentaient la 5^{ème} cause de cancer et la 3^{ème} cause de décès par cancer [Gattegno and Chopin, 2001] [Irani, 2003] [Nicollet, 2006]. Il touche trois fois plus les hommes que les femmes et dans 80% des cas, il survient entre 50 et 80 ans [Jemal *et al.*, 2004].

La grande majorité des tumeurs de la vessie sont urothéliales : elles concernent le revêtement interne de la vessie. Avant d'expliquer les différents types de tumeurs de vessie et pour mieux approcher et comprendre l'étude *in vivo* présentée chapitre 5, rappelons la physiologie du système urinaire.

1.1.3.1 Physiologie du système urinaire

Le système urinaire se compose de différents organes : deux reins (« *ren* » ; « *nephros* ») assurant les fonctions de filtration, sécrétion et réabsorption, deux uretères (« *ureter* ») trans-

portant l'urine des reins vers la vessie, la vessie (« *vesica urinaria* ») utilisée comme réservoir, enfin l'urètre (« *urethra* ») conduisant l'urine en-dehors de l'organisme [Adé-Damilano, 2006a].

L'étude *in vivo*, présentée chapitre 5, porte sur la vessie ; la suite du paragraphe développe brièvement son histologie.

La vessie est un organe musculaire creux, très extensible et élastique, dont la fonction est de recueillir l'urine produite par les reins et de la stocker entre les mictions. Sa forme dépend de son état de réplétion. Quand elle est vide ou quand elle contient peu d'urine, elle a une forme pyramidale et l'épaisseur de sa paroi est d'environ 5 mm. Quand l'urine commence à s'accumuler, la vessie se dilate progressivement et prend alors la forme d'une poire, d'épaisseur de paroi plus mince [Adé-Damilano, 2006b].

Chez les mammifères, la paroi vésicale est composée de quatre couches (Fig. 1.3) : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et l'adventice. Notre étude *in vivo* s'intéressera principalement à la muqueuse et à la sous-muqueuse.

La **muqueuse** est composée d'un épithélium connu sous le nom d'urothélium, formé de trois types de cellules épithéliales : les cellules basales (10-20 μm), les cellules intermédiaires (15-50 μm) et les cellules superficielles (20-100 μm) [Melicow, 1945] [Hicks, 1975] [Jost *et al.*, 1989] [Adé-Damilano, 2006b]. Chez l'homme, l'urothélium est formé de trois à six couches cellulaires [Jost *et al.*, 1989]. Chez le rat, modèle pré-clinique faisant l'objet de notre étude *in vivo* (cf. chapitre 5), le nombre de couches est limité à trois [Hicks, 1975].

La muqueuse est séparée de la sous-muqueuse par une fine membrane basale, elle-même séparée de la couche musculaire périphérique par la *lamina propria* ou chorion (tissu conjonctif riche en fibres élastiques). La membrane basale présente des replis lorsque la vessie est vide ; ces replis s'estompent lorsque la vessie se remplit.

La **sous-muqueuse** est une mince lamelle de tissu conjonctif qui unit la musculeuse à la muqueuse.

La **musculeuse lisse** est composée de trois couches de fibres musculaires lisses séparées par un tissu conjonctif : la couche longitudinale interne (« *stratum longitudinale internum* »), la couche circulaire moyenne – la plus épaisse des trois – (« *stratum circulare* ») et la couche longitudinale externe (« *stratum longitudinale externum* ») [Adé-Damilano, 2006b].

L'**adventice** ou la **séreuse** est un tissu fibro-adipeux périvésical qui entoure la musculeuse [Hicks, 1975] [Adé-Damilano, 2006b]. Elle ne recouvre que les parties supérieure et postérieure de la vessie, d'où elle se réfléchit en formant une gouttière circulaire autour de cet organe. C'est un tissu conjonctif lâche contenant de nombreux vaisseaux, quelques ganglions nerveux et de nombreuses fibres de collagène.

1.1.3.2 Epidémiologie et symptômes

Le principal facteur de risque est l'intoxication tabagique puisque les substances toxiques du tabac sont éliminées par les reins et la vessie.

Au second plan, d'autres facteurs de risque interviennent :

- exposition à certains dérivés de produits industriels (chimiques, textiles, métallurgie, caoutchouc...) [de la Taille, 2001],
- infections et irritations chroniques [West *et al.*, 1999],
- anomalies génétiques,

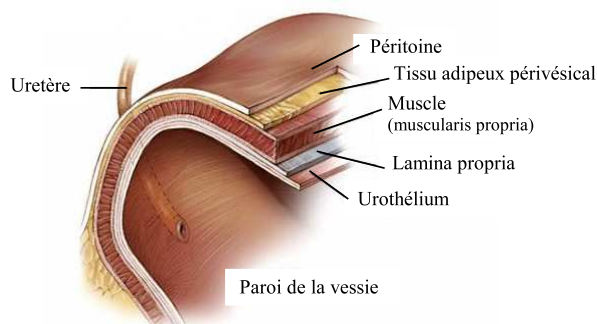


FIG. 1.3 – Différentes couches de la paroi vésicale [©2003 American Society of Clinical Oncology].

- bilharziose urinaire², maladie parasitaire due à des vers contractée essentiellement en Afrique occidentale et en Egypte [Tricker *et al.*, 1989] [Badawi, 2000].

En revanche, aucune prédisposition familiale n'a pour le moment été observée. La consommation de café a souvent été évoquée mais jamais formellement prouvée.

Au début, le cancer de la vessie ne provoque presque jamais de symptômes [de la Taille, 2001]. L'hématurie (présence de globules rouges dans les urines) est présente dans 85% des cas. Indolore, elle peut disparaître pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines ou plusieurs mois tandis que la tumeur continue à se développer. A un stade plus avancé, d'autres symptômes peuvent apparaître tels des troubles mictionnels, infections urinaires, calculs, douleurs dans la région de la vessie ou obstruction des reins, dus à l'invasion de la tumeur sur le méat (abouchement) de l'un ou des deux uretères dans la vessie.

1.1.3.3 Types et classification TNM

Les tumeurs de la vessie sont classées en tumeurs d'origine épithéliale (carcinomes transitionnels, spinocellulaires) et tumeurs d'origine non épithéliale (sarcomes, métastases).

Une fois le diagnostic évoqué, le médecin confirme la présence d'une tumeur par cystoscopie incluant plusieurs biopsies pour spécifier le type de cancer. La classification des tumeurs de vessie prend en compte l'analyse de deux facteurs histo-pronostiques : le **grade tumoral** [Molinié, 2006] et le **degré de pénétration de la tumeur** [UICC, 2002].

Le grade tumoral, décrit par l'OMS 1973 - dont la dernière mise à jour date de 2003 - classe les tumeurs selon leur évolution : l'OMS divise les carcinomes transitionnels en trois principaux grades (I, II et III) selon leur degré de différenciation cellulaire ; le grade I est le plus différencié et de meilleur pronostic ; le grade II est moyennement différencié et de pronostic intermédiaire ; le grade III le moins différencié est de mauvais pronostic [Heney *et al.*, 1983] [Mostofi *et al.*, 1999]. Dans les 24 mois qui suivent le diagnostic, le taux de progression vers une tumeur infiltrante est respectivement de 2%, 11%, et 45% pour les tumeurs de grade I, II et III [Heney *et al.*, 1983]. Le grade dépend de l'importance des anomalies des cellules tumorales (plus ces anomalies sont importantes, plus le grade de la tumeur est élevé), du degré de différenciation (nombre de couches

²L'homme contracte les bilharzies au contact de l'eau qui permet le passage à travers la peau des larves du parasite.

atteintes) et des mitoses (division des cellules cancéreuses).

Dans la paroi de la vessie, le degré de pénétration des tumeurs est décrit par la classification TNM 1997 (« Tumor Node Metastasis »), actualisée en 2002 [Davin, 2004] [Trébucq, 2005], **classification partiellement utilisée lors des expériences sur les rats décrites dans le chapitre 5** (TAB. 1.2 et Fig. 1.4). Le système TNM est utilisé dans tous les pays pour la classification des tumeurs malignes.

TAB. 1.2 – Classification TNM des tumeurs de la vessie.

T	désigne la tumeur et en décrit l'extension
T_x :	tumeur ne pouvant être classée
T_0 :	absence de tumeur décelable
T_a :	tumeur papillaire non invasive (confinée à l'urothélium)
T_{is} :	carcinome <i>in situ</i> (tumeur plane résistante confinée à l'urothélium)
T_1 :	tumeur envahissant la <i>lamina propria</i> de la vessie
T_2 :	tumeur envahissant la musculature
	T_{2a} : muscle superficiel ; T_{2b} : muscle profond
T_3 :	tumeur envahissant le tissu adipeux périvésical
	T_{3a} : invasion microscopique ; T_{3b} : invasion macroscopique
T_4 :	tumeur envahissant un organe voisin
	T_{4a} : prostate, utérus, vagin ; T_{4b} : paroi pelvienne, abdomen
N	caractérise les ganglions, précise leur atteinte ou non et l'importance de cette atteinte
M	indique la présence ou l'absence de métastases à distance

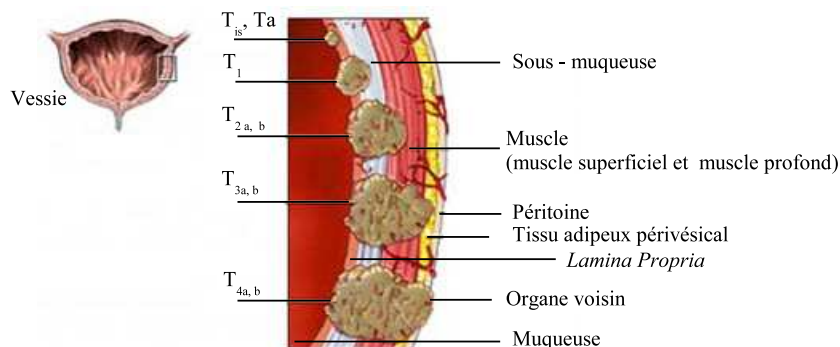


FIG. 1.4 – Représentation schématique de la classification internationale des tumeurs de la vessie (image modifiée de ©2005 Nucleus Communications).

La tumeur doit être confirmée histologiquement. Deux classifications doivent être données : en effet, la classification globale associe le T et le grade.

S'il existe plusieurs tumeurs dans le même organe, la tumeur est classée suivant le T le plus élevé. Dans la classification TNM, le suffixe « m » indique l'existence de plusieurs tumeurs et le suffixe « is » décrit le carcinome *in situ* ; TNM ou cTNM correspond à la classification clinique

et pTNM à la classification histo-pathologique post-opératoire.

La détermination du grade histologique fait partie des critères utiles à la classification. Les définitions sont : tumeurs bien différenciées (GI ; exemple : dysplasie légère), moyennement différenciées (GII ; exemple : dysplasie modérée), mal différenciées (GIII ; exemple : dysplasie sévère ou CIS) ou indifférenciées (GIV) [Davin, 2004] [Berger, 2006].

La majorité des tumeurs de la vessie est d'origine épithéliale et les carcinomes transitionnels représentent environ 90% des tumeurs de la vessie (Fig. 1.4) : environ 70% d'entre eux sont des carcinomes superficiels (T_a , T_1 , CIS), 20% des tumeurs infiltrantes (T_2 , T_3) et 5% des tumeurs métastatiques (T_4) [Zerbib, 1998] [El Kathib, 2005]. Les tumeurs superficielles restent cantonnées à la muqueuse ou au chorion ; les tumeurs infiltrantes envahissent le muscle vésical.

Les classifications, à visée pronostique, tiennent compte des aspects macroscopiques (lésions planes ou papillaires) et microscopiques (anomalies cytonucléaires, infiltration en profondeur). On distingue :

- les lésions tumorales planes (dysplasie, CIS). La présence d'un CIS est associée à un risque élevé de récurrence et de progression vers une tumeur infiltrante qui envahit la couche musculaire de la paroi vésicale ou les organes adjacents,
- les tumeurs papillaires (infiltrantes ou non infiltrantes).

Lors du diagnostic, 75 à 85% des patients présentent une tumeur superficielle. Près de la moitié d'entre elles récidive dans les 12 mois, tout en restant superficielle ; certaines peuvent évoluer vers une tumeur infiltrante.

Les tumeurs superficielles de la vessie regroupent les tumeurs papillaires non infiltrantes (stade pT_a), les tumeurs infiltrant le chorion (stade pT_1) et les carcinomes *in situ*. Ces trois catégories tumorales sont pour la plupart traitées par voie endoscopique. Leur potentiel évolutif est très variable et certaines d'entre elles présentent un risque élevé de progression vers l'invasion musculaire.

Les **tumeurs de stade T_a** représentent près de 40% des tumeurs superficielles [Amling, 2001] [Stevens *et al.*, 2004]. Ces lésions papillaires sont exclusivement confinées à la muqueuse ; la membrane basale reste intacte. Les tumeurs de stade T_a sont associées à un taux de récurrence de 50 à 75% et à un faible taux de progression (inférieur à 5%). Les tumeurs de stade T_a GI progressent rarement (2%) ; les tumeurs de stade T_a GII présentent un taux de progression de 6%, alors que les tumeurs de stade T_a GIII progressent dans 48% des cas [Heney *et al.*, 1983] [Stevens *et al.*, 2004]. Les **tumeurs de stade T_1** sont des tumeurs papillaires ou nodulaires marquées par une invasion de la *lamina propria* : la musculature reste intacte [Amling, 2001]. Le T_1 GI progresse rarement, alors que les taux de progression des tumeurs T_1 GII et T_1 GIII sont respectivement de l'ordre de 21% et 48% [Heney *et al.*, 1983]. Le **CIS** est connu comme étant le précurseur de tumeurs invasives avec un risque de progression de l'ordre de 36 à 83% [Koss, 1979]. La période moyenne qui sépare le début du développement d'une tumeur invasive de son diagnostic est d'environ 5 ans [Cheng *et al.*, 1999].

Une détection précoce est donc essentielle pour débiter un traitement ou dépister une récurrence après traitement.

1.1.3.4 Méthodes optiques pour le diagnostic

Techniques actuelles d'exploration diagnostique du cancer de la vessie

Les données sur la sensibilité et la spécificité des techniques rapportées ici sont issues du *Rapport 2001 de l'Association Française d'Urologie* (AFU) sur les tumeurs superficielles de la vessie [Gattegno and Chopin, 2001].

L'**échographie vésicale** permet d'explorer la vessie par ultrasons : elle met en évidence l'existence de polypes dans la vessie, de calculs ou de tumeurs dans les reins [Trébucq, 2005]. . . Elle permet de suspecter une tumeur de la vessie si celle-ci a une taille suffisante ou si elle infiltre la paroi vésicale. Cet examen présente une sensibilité limitée (74%) mais une bonne spécificité (95%) [Gattegno and Chopin, 2001]. L'échographie est indiquée pour la surveillance de patients déjà traités pour des tumeurs superficielles de vessie ou pour ceux refusant la cystoscopie.

Le **scanner** permet de faire le bilan d'extension du cancer en cas de tumeur infiltrante de la vessie (recherche de métastases), d'étudier le retentissement sur le haut appareil et de rechercher des adénopathies (ganglions augmentés de volume).

La **cystoscopie** ou **endoscopie vésicale** est l'examen de référence. Utilisant un endoscope souple ou rigide, elle permet de visualiser la tumeur, déterminer sa localisation, préciser ses caractères morphologiques et explorer le reste de la vessie à la recherche de l'existence d'une ou plusieurs tumeurs [Gattegno and Chopin, 2001]. Si l'examen révèle l'existence d'une ou plusieurs tumeurs vésicales, celles-ci pourront être enlevées par les voies naturelles (*résection endoscopique*). Le diagnostic histologique sera établi par l'analyse anatomo-pathologique des fragments tissulaires de la résection [Trébucq, 2005].

L'**examen cyto bactériologique des urines** (ECBU) ou **cytologie urinaire** est l'examen des cellules présentes dans les urines. C'est un examen préliminaire qui permet de confirmer ou d'infirmer la présence de sang dans les urines et de rechercher une éventuelle infection urinaire. Ce test demeure le test non invasif le plus couramment utilisé et le plus performant avec une spécificité de 93%. En revanche, son point faible est la sensibilité qui dépend du grade tumoral : 25% pour les tumeurs de bas grade, 77% pour les tumeurs de haut grade [Gattegno and Chopin, 2001] [Lokeshwar and Soloway, 2001]. La cytologie urinaire est donc intéressante pour la surveillance des tumeurs traitées mais il existe jusqu'à 12% de faux positifs (inflammation vésicale, lithiase urinaire. . .).

Pour réduire ces faux positifs, la cytologie urinaire peut être associée à la **cytométrie de flux**, permettant un taux de diagnostic de 95%; cependant, ce n'est pas une pratique courante [Gattegno and Chopin, 2001].

L'utilisation de **marqueurs immunocytologiques** permet de détecter la présence de marqueurs cellulaires spécifiques du cancer de la vessie dans les cellules exfoliées isolées à partir d'un échantillon urinaire. L'un des tests proposé est appelé *ImmunoCyt^{MC} / uCyt⁺MC* : les cellules sont isolées et mises en contact avec des anticorps monoclonaux préalablement liés à des marqueurs fluorescents. Ces mêmes anticorps sont couplés aux antigènes présents à la surface des cellules cancéreuses, permettant ainsi leur identification par microscopie de fluorescence ou par cytométrie de flux. Lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec la cytologie urinaire, ces tests non invasifs offrent un diagnostic plus précis avec une sensibilité de 87% et une spécificité de 71%

contre 81% et 72% respectivement pour le seul test immunologique et 45% et 97% pour la seule cytologie urinaire [DiagnoCure inc., 2006] [Mian *et al.*, 2006]. Par ailleurs, le test *ImmunoCyt^{MC}* / *uCyt^{MC}* a une valeur prédictive négative fiable (plus de 94%). Cependant, les techniques, dites « alternatives », ne sont pas encore d'utilisation courante car l'utilisation de ces marqueurs est soumise à l'autorisation de mise sur le marché (AMM) [Greene *et al.*, 2006]. En pratique, le service médical rendu n'est pas spectaculaire et le bénéfice est discutable.

La **résection transurétrale** de la totalité des lésions permet donc dans un premier temps une identification diagnostique précise pTG ; l'intervention peut éventuellement avoir une valeur thérapeutique (lésions superficielles de faible grade) [Oosterlinck *et al.*, 2002].

Les tumeurs urothéliales sont des maladies d'appareil, ce qui signifie qu'une tumeur guérie à un endroit précis ne marque pas la fin de la maladie ; d'autres tumeurs peuvent apparaître ailleurs sur le même appareil. Ainsi, le patient présentant ce type de maladie doit être très longtemps suivi pour détecter d'éventuelles tumeurs qui apparaîtraient plus tard.

Ainsi, le dépistage des carcinomes *in situ* et des dysplasies permet de préserver la vessie, réduire la mortalité et améliorer la qualité de vie des malades. Les efforts de ces dernières années ont porté sur la recherche de nouvelles méthodes de diagnostic non invasives, fiables, reproductibles et rapidement interprétables par le clinicien. Ces méthodes doivent être capables de détecter les lésions pré-cancéreuses et cancéreuses précoces afin d'obtenir leur éradication et parvenir à des sensibilités et spécificités les plus élevées possibles.

Techniques *in vivo* en cours de développement pour le diagnostic

La lumière est l'ensemble des rayonnements électromagnétiques visibles, elle correspond donc aux longueurs d'onde auxquelles l'organe visuel humain est sensible (380 - 780 nm) [Perraudau, 2004]. Dans la théorie électromagnétique, la lumière apparaît comme un phénomène ondulatoire périodique décrite comme une onde transversale composée d'une onde de champ électrique et d'une onde de champ magnétique pouvant se propager dans le vide à une vitesse finie égale à $c_0 = 299\,792\,458\text{ m.s}^{-1}$.

La figure 1.5 et le tableau 1.3 présentent une classification des rayonnements électromagnétiques, selon leurs bandes de longueurs d'onde [OMS, 1992] [Martrenchard-Barra, 2006].

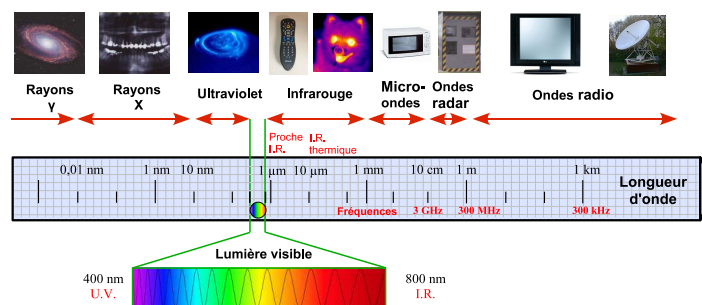


FIG. 1.5 – Illustration des principales bandes du spectre électromagnétique (image modifiée de [Martrenchard-Barra, 2006]).

TAB. 1.3 – Tableau récapitulatif des bandes de longueurs d'onde principales du spectre électromagnétique.

Bande de longueurs d'onde	Domaine	Énergie (J) $E = \frac{h \cdot c_0}{\lambda}$
10^{-14} à 10^{-11} m	Rayon γ	2.10^{-11} à 2.10^{-14}
10^{-11} à 10^{-8} m	Rayon X	2.10^{-14} à 2.10^{-17}
10 nm à 400 nm UV extrêmes : 10 - 200 nm UV proches : 200 - 400 nm UVC : 100 - 280 nm UVB : 280 - 315 nm UVA : 315 - 400 nm	Ultraviolet	2.10^{-16} à 5.10^{-19}
400 nm à 700 nm Violet : 400 - 446 nm Bleu : 446 - 500 nm Vert : 500 - 578 nm Jaune : 578 - 592 nm Orange : 592 - 620 nm Rouge : 620 - 700 nm	Lumière Visible	5.10^{-19} à $2,8.10^{-19}$
700 nm à 1 mm IR proches : 0,7 - 5 μm IR moyens : 5 - 30 μm IR lointains : 30 - 1 000 μm	Infrarouge	$2,8.10^{-19}$ à 2.10^{-22}
1 mm à 10 cm	Micro-ondes et Radar	2.10^{-22} à 2.10^{-24}
> 10 cm	Radio	> 2.10^{-24}

h : constante de Planck ($6,64.10^{-34}$ J.s)

c_0 : célérité de la lumière dans le vide (3.10^8 m.s $^{-1}$, $c = c_0/n$)

La photonique est la science qui étudie la lumière et développe les technologies capables de la contrôler. Elle s'articule autour de plusieurs axes de développement : sources lumineuses (lasers, diodes électro-luminescentes ou DELs, lampes...), guides d'onde (fibres optiques, cristaux...) et détecteurs (dispositifs à transfert de charge ou CCD, photodiodes, photomultiplicateurs...) et étude des interactions de la lumière avec la matière. La biophotonique est définie comme l'application directe de la photonique à la biologie et à la santé [Opticsvalley *et al.*, 2003]. Les nouveaux dispositifs utilisent les propriétés des photons pour générer des interactions avec les tissus vivants. Les applications scientifiques et technologiques de la lumière au domaine de la santé peuvent se décomposer en trois axes :

- l'analyse pour la biologie/biotechnologie,
- les méthodes de diagnostic,
- les applications thérapeutiques.

L'analyse pour la biologie concerne essentiellement la mise au point de nouvelles classes

de microscopes optiques, d'imageurs des mécanismes génétiques par bioluminescence et fluorescence, de création de techniques d'analyse rapide des cellules et des gènes (biopuces, biocapteurs, biomolécules...).

Les **applications thérapeutiques** concernent l'étude et la réalisation de techniques et instruments exploitant les effets de la lumière sur les cellules et les tissus biologiques afin de traiter une maladie. Les applications « classiques » sont notamment : la chirurgie laser (ablation, cauterisation...), la photothérapie, la thérapie photodynamique (PDT)...

Les **applications au diagnostic** visent l'exploitation des variations de certaines propriétés mesurables de la lumière, telles que l'absorption, la fluorescence et la diffusion élastique ou inélastique, pour sonder les tissus et en extraire des caractéristiques structurales et fonctionnelles. Ces procédés ont un intérêt dans la détection précoce de maladies, l'observation des fonctions tissulaires normales et anormales et l'orientation des traitements. Ces techniques sont pour la plupart atraumatiques et utilisables *in vivo*, d'où leur essor. C'est dans ce domaine que nos travaux de thèse prennent place.

La théorie se rapportant à l'interaction entre la lumière et les tissus sera développée dans le chapitre 3.

Les nouvelles techniques de diagnostic par imagerie (résolution spatiale) et par spectroscopie (résolution spectrale) ont pour objectif d'accroître l'efficacité de la détection endoscopique, notamment en guidant et ciblant les biopsies. Le lecteur pourra se reporter au livre de [Vo-Dinh, 2003a] pour de plus amples informations.

Les méthodes de diagnostic optique *in vivo* peuvent être classées en trois catégories :

1. la spectroscopie optique (définition/résolution spectrale),
2. l'imagerie optique, comme la tomographie optique (définition/résolution spatiale),
3. l'imagerie multi ou hyper-spectrale (définition/résolution spatiale et spectrale).

1. Spectroscopie point par point.

Les techniques spectroscopiques de diagnostic sont généralement utilisées pour obtenir un spectre d'intensité lumineuse sur une zone particulière d'un tissu. Ces techniques font souvent référence à des méthodes de mesures point par point. Elles sont fondées sur l'analyse de spectres acquis par une sonde à fibres optiques sur une zone très limitée (Fig. 1.6). Chaque spectre correspond à l'exploration d'un volume tissulaire dont la dimension est déterminée par la dimension du capteur à fibres optiques ou par la surface du spot du système optique.

Les méthodes de spectroscopie peuvent être divisées en trois groupes : spectroscopie résolue spatialement (« steady state » ou en excitation continue « continuous wave »), spectroscopie résolue dans le temps (« time resolved » ou en excitation impulsionnelle) ou spectroscopie résolue dans le domaine fréquentiel (« frequency resolved » ou excitation harmonique). Par exemple, **pour les mesures de réflectance en excitation continue résolue spatialement - objet de nos travaux** - le tissu est illuminé de façon perpendiculaire par une fibre d'excitation et la lumière réémise est mesurée par les fibres de réception, placées à différentes distances de la fibre d'excitation [Gélébart *et al.*, 1997]. Le principe est relativement simple et peu coûteux.

Contrairement aux mesures stationnaires, les expériences dans le domaine temporel ont l'avantage de ne nécessiter qu'une seule mesure et à une seule distance entre la fibre d'excitation et la fibre de réception [Gélébart *et al.*, 1997]. L'instrumentation nécessaire est un peu plus complexe et coûteuse (mesures de temps très courts, temps de propagation dans les tissus $\approx$ quelques 1 à 100 ps) [Poisson, 2007].

Enfin, les expériences dans le domaine fréquentiel délivrent, en principe, les mêmes informations que celles obtenues dans le domaine temporel [Gélébart *et al.*, 1997]. Mais au lieu d'une source lumineuse pulsée, il faut utiliser une diode laser modulée en intensité et dont le flux de photons au niveau du détecteur varie au cours du temps.

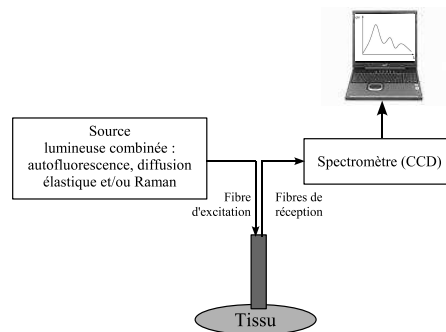


FIG. 1.6 – Schéma d'un système de spectroscopie.

Dans le cadre de la cancérologie, plusieurs travaux ont été publiés concernant la spectroscopie Raman, la spectroscopie de diffusion élastique (ESS : « Elastic Scattering Spectroscopy », LSS : « Light Scattering Spectroscopy », DRS : « Diffuse Reflectance Spectroscopy ») et la spectroscopie de fluorescence (LIFS ou « Light Induced Fluorescence Spectroscopy »). Ces techniques seront détaillées un peu plus loin (section 1.3).

Quelques exemples de résultats de sensibilité et de spécificité (paramètres que nous utiliserons par la suite) sont donnés dans le tableau 1.4.

2. Imagerie optique (micro- et macroscopique).

Les méthodes d'imagerie optique visent à représenter des images de tissus, en surface ou en profondeur, le plus souvent à une longueur d'onde spécifique ou dans une seule bande de longueurs d'onde.

L'**OCT** (« Optical Coherence Tomography ») produit des images de coupes de haute résolution *in vivo* avec une résolution spatiale de 10 à 20 μm [Tuchin, 2002]. A titre d'exemple, les travaux de recherche se concentrent sur : l'estomac [Poneros *et al.*, 2001], l'œsophage de Barrett [Poneros and Nishioka, 2003] [Evans *et al.*, 2006] et les tissus hépatiques [Poneros *et al.*, 2002]. Dans le cas de l'imagerie de l'estomac et de l'œsophage atteints de métaplasie intestinale, une étude rétrospective montre une sensibilité de 100% et une spécificité de 93% [Poneros *et al.*, 2001]. Une étude prospective, confirmée par étude anatomopathologique, donne une sensibilité de 97% et une spécificité de 92% [Poneros *et al.*, 2001]. Mais, la technique de réalisation est complexe et le prix des systèmes commercialisés important [LightLab, 2007] [Thorlab, 2007]. [Moneron *et al.*, 2007] présentent un système de tomographie par cohérence optique plein champ sensible à la polarisation qui peut produire des

TAB. 1.4 – Comparaison de la sensibilité et de la spécificité entre différents types de spectroscopies. La sensibilité et la spécificité des examens standards se trouvent en-dessous du tableau.

Caractéristiques de la technique utilisée [Référence]	Se (%)	Sp (%)
Lésions intra-épithéliales épidermoïdes (SILs) des épithéliums normaux et des inflammations du col de l'utérus ^a		
<i>Fluorescence</i> : excitation à 337, 380 et 460 nm	88 ± 1,4	70 ± 1
<i>Fluorescence</i> à deux longueurs d'onde d'excitation [Ramanujam <i>et al.</i> , 1996b]	88 ± 1,4	71 ± 1,4
Epiderme normal vs. néoplasies intra-épithéliales du col de l'utérus de haut grade (CIN II et III) [Nordstrom <i>et al.</i> , 2001]		
<i>Réflectance diffuse</i> (390 à 720 nm)	82	67
<i>Fluorescence UV</i> (excitation à 355 nm)	91	93
Algorithme : <i>fluorescence intrinsèque</i> (excitation à 337 nm), spectres lumineux à bande large et imagerie vidéoscopique : détection des néoplasies intra-épithéliales à haut grade (II, III et supérieur) du col de l'utérus [Huh <i>et al.</i> , 2004]	90	50
<i>Réflectance</i> (390 à 600 nm) : ovaires ^b normaux vs. néoplasmes bénins et cancers	86 ± 6	79 ± 5
<i>Réflectance</i> (390 à 600 nm) : cancers des ovaires vs. néoplasmes bénins et ovaires normaux [Utzinger <i>et al.</i> , 2001a]	86 ± 4	80 ± 8
Spectroscopie de <i>réflectance</i> [Mirabal <i>et al.</i> , 2002] :		
Epidermoïde normal vs. lésions épidermoïdes intra-épithéliales de haut grade du col de l'utérus	72	81
Epidermoïde cylindrique normal vs. lésions épidermoïdes intra-épithéliales de haut grade du col de l'utérus	72	83
Tissus normaux (cou, tête) vs. tissus dysplasiques ou cancéreux [Muller <i>et al.</i> , 2003]		
<i>Fluorescence intrinsèque (LIFS)</i> : excitation à 337 et 358 nm	90	96
<i>Réflectance diffuse (DRS)</i>	74	74
<i>Spectroscopie de diffusion de la lumière (LSS)</i>	92	97
<i>Spectroscopie tri-modale (TMS)</i>	96	96
Tissus sains et tumoraux de vessie humaine ^c		
<i>Fluorescence</i> : excitation à 337 nm, calcul du rapport d'intensité $R_{I_{385}/I_{455}}$ [Koenig <i>et al.</i> , 1998b]	97	98
<i>Fluorescence</i> : 29 excitations entre 220 et 500 nm, calcul des deux rapports $R_{I_{350}/I_{470}}$ (excitation à 280 nm) et $R_{I_{390}/I_{470}}$ (excitation à 330 nm) [Zheng <i>et al.</i> , 2003]	97	95
<i>Réflectance diffuse</i> [Koenig <i>et al.</i> , 1998a]	91	60

^a Coloscopie (col de l'utérus) : Se=(94 ± 6)%, Sp=(48 ± 23)% [Ramanujam *et al.*, 1996b].

^b Coelioscopie ou laparoscopie (ovaire) : Se=97%, Sp=95%; bien que cette technique permette la visualisation des ovaires et l'identification des changements néoplasiques excessivement évidents, elle ne permet pas à de distinguer les changements microscopiques sur ou sous la surface ovarienne [Audebert, 2005].

^c Examen cytologique dans le contexte du CIS : Se=90%, Sp=98% [Amling, 2001].

images de tissus de muscle *ex vivo* à haute résolution (résolution spatiale accrue $\approx 1 \mu\text{m}$ par rapport à l'OCT classique).

Le **FOCI** (« Fiber Optic Confocal Imaging ») est une technique d'imagerie récente associée à la microscopie [Tuchin, 2002]. Le microscope par fibres optiques *in vivo* est un instrument permettant d'analyser l'architecture tissulaire et la morphologie cellulaire avec une résolution comparable à l'histo-pathologie standard. Son utilisation dans le diagnostic du cancer est envisagée [Mauna Kea Technologies, 2007]. Cette technique a permis d'identifier *in vivo* des structures cutanées et sous-cutanées telles que des mélanomes [Anikijenko *et al.*, 2001] [Swindle *et al.*, 2003], des lésions épidermoïdes du col de l'utérus [Sung *et al.*, 2003]... [D'Hallewin *et al.*, 2005] montrent la faisabilité *in vivo* de la technique de microscopie confocale dans la vessie de rats et distinguent les tissus cancéreux des tissus normaux. Les premières études cliniques ont permis de visualiser *in vivo* des cellules de tissu gastro-intestinal par voie endoscopique [Seitz and Soehendra, 2003]. Le diamètre de la fibre optique peut être réduit jusqu'à 1 mm avec une résolution latérale de $5 \mu\text{m}$, une résolution axiale de $15 \mu\text{m}$ et une fréquence d'acquisition de 12 à 15 images par seconde [Seitz and Soehendra, 2003]. Mais peu de produits commerciaux existent et leur coût est élevé de part la complexité de réalisation et les caractéristiques spécifiques de l'appareil [Mauna Kea Technologies, 2007].

La **tomographie optique diffuse** (TOD) et la **tomographie de fluorescence** sont des modalités d'imagerie médicale fonctionnelle en développement sur le petit animal entier. Les principaux domaines d'application sont la mammographie et l'imagerie fonctionnelle cérébrale et musculaire [Taroni *et al.*, 2005] [Enfield *et al.*, 2007]. L'avantage est sa bonne résolution temporelle. Les principales difficultés sont liées à la forte diffusion optique des tissus et à la reconstruction inverse.

3. Imagerie multi ou hyper-spectrale.

L'imagerie multi-spectrale ou hyper-spectrale combine spectroscopie et imagerie optique. Actuellement, compte tenu de la technologie disponible, il existe deux approches pour former une image multi ou hyper-spectrale possédant, soit une grande définition spectrale avec des capteurs linéaires et un système de balayage (difficilement compatible avec l'endoscopie), soit une plus faible définition spectrale avec des capteurs matriciels et un système de filtres ou de sélection de bande. L'approche d'imagerie hyper-spectrale fournit un « cube de données » d'informations spectrales de l'image entière (Fig. 1.7). L'approche multi-spectrale fournit, quant à elle, un nombre plus limité de bandes spectrales.

Ces considérations ont conduit au développement de **systèmes d'imagerie endoscopique de fluorescence**.

L'**endoscopie de fluorescence lumière-induite** permet de visualiser, dans le champ de vision de l'endoscope, une information spatiale de fluorescence (exogène ou endogène) obtenue à l'aide d'une source d'excitation de fluorescence spécifique. La figure 1.8 représente le schéma de principe d'un imageur. L'image dite de fluorescence est formée à partir de la combinaison de plusieurs images acquises dans des bandes spectrales différentes du spectre de fluorescence. Un traitement d'images approprié permet l'obtention d'une image en fausses couleurs reflétant la valeur des indicateurs spectraux caractéristiques de tissus sains ou tumoraux.

Ces systèmes exploitent les résultats des analyses spectrométriques pour fournir une information de nature spectrale sous la forme d'image de même taille et de même résolution spatiale

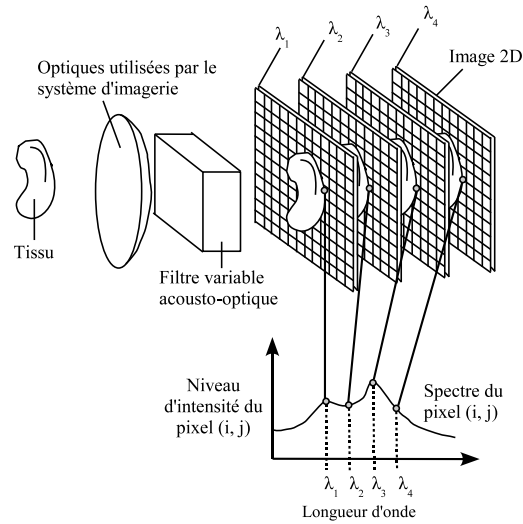


FIG. 1.7 – Concept de spectroscopie-imagerie : un spectre global est enregistré pour chaque pixel de l'image (basé sur le schéma de [Vo-Dinh, 2003a]).

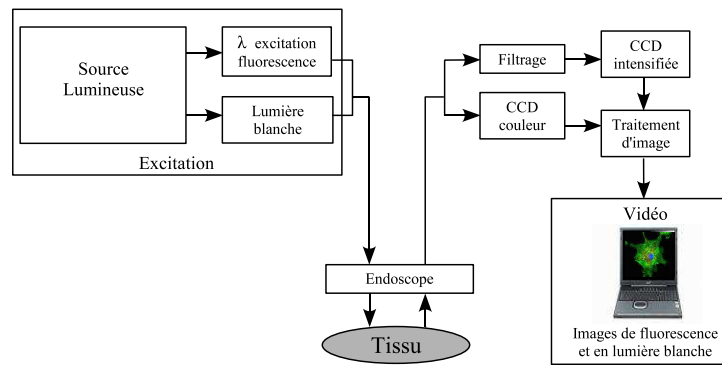


FIG. 1.8 – Schéma d'un système d'imagerie endoscopique de fluorescence.

qu'en lumière classique acquise dans différentes bandes spectrales (résolution de deux ou trois bandes) [Tuchin, 2002].

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 *in vitro* sur tissus frais excisés [Svistun *et al.*, 2004] et *in vivo in situ* [Kara *et al.*, 2004] [Zeng *et al.*, 2004]. D'ailleurs, de nombreuses études recensées par [Kara *et al.*, 2004] ont déjà été conduites sur l'utilisation conjointe de l'imagerie à base d'auto fluorescence (EAF ou endoscopie d'auto fluorescence) et de l'endoscopie conventionnelle (ELB ou endoscopie en lumière blanche) pour la détection de lésions néoplasiques intra-épithéliales bronchiques (plusieurs milliers de patients). [Prosst and Gahlen, 2002] ont notamment effectué un recensement sur la spectroscopie et l'imagerie de fluorescence appliquées au diagnostic de lésions colorectales (carcinomes et dysplasies).

[Haussinger *et al.*, 2005] présentent une étude randomisée sur 1 173 patients soumis à une bronchoscopie pour la détection de lésions néoplasiques à l'issue de laquelle ils montrent que la sensibilité de la combinaison de la bronchoscopie en lumière blanche (WLB ou « White Light Bronchoscopy ») et de la bronchoscopie d'auto fluorescence (AFB ou « Autofluorescence Bron-

choscopy ») est supérieure à celle obtenue à partir de WLB (82,3% contre 57,9%). Sa spécificité est toutefois plus faible : 58,4% pour WLB combinée à l'AFB contre 62,1% pour la seule WLB.

En conclusion, l'analyse histologique reste la méthode de diagnostic de référence pour le clinicien (« gold » standard). Le manque de résolution spectrale de l'imagerie endoscopique (acquisition d'un petit nombre de bandes spectrales, à défaut d'utiliser la totalité du spectre) peut être compensée par la spectroscopie point par point. Ainsi, une fois localisée une zone suspecte en imagerie endoscopique, **la spectroscopie point par point constitue un outil de choix complémentaire capable de fournir une information diagnostique plus précise, de façon non invasive, qui permet de sonder un grand nombre de sites localisés et de limiter le nombre de biopsies aux sites les plus suspects.**

1.2 Problématique scientifique

Cette partie rappelle les problématiques cliniques motivant notre étude et expose les objectifs de nos travaux, les verrous techniques et méthodologiques liés au développement et à la validation expérimentale d'un système complet de spectroscopie bimodale (instrumentation et modélisation des interactions lumière-tissus) et son application pour la détection de lésions cancéreuses *in vivo*.

1.2.1 Motivations cliniques

Les cancers superficiels de la vessie représentent entre 70 et 80% des tumeurs et peuvent poser deux problèmes évolutifs importants, à savoir un risque de récurrence sans progression et un risque de progression évalué à 15% (tous grades et stades confondus) [Gattegno and Chopin, 2001]. Le risque majeur de la progression est l'invasion du muscle vésical, exposant alors à des métastases et au décès. Plusieurs études (citées dans [Gattegno and Chopin, 2001] [Mazerolles, 2005]) montrent que le nombre et la taille des tumeurs influent sur le risque de récurrence des tumeurs de type T_a : ce risque varie entre 18 et 60% en cas de tumeur unifocale et entre 40 et 90% lorsque la tumeur est multifocale. Pour des tumeurs de type T_1 , le délai d'apparition, la fréquence des récurrences et l'invasion ou non de la muqueuse musculaire influent sur le risque de progression [Gattegno and Chopin, 2001]. Pour les carcinomes *in situ*, le risque de progression varie fortement suivant le nombre de foyers tumoraux. Il est évalué à 8% lorsque le CIS est unifocal et jusqu'à 78% lorsqu'il est multifocal. Les carcinomes *in situ* unifocaux et multifocaux sont donc deux tumeurs non comparables dont le potentiel évolutif est très différent [Gattegno and Chopin, 2001].

La cystoscopie, examen endoscopique en lumière blanche, est l'examen clinique de référence. Cet examen permet de visualiser l'aspect macroscopique de la surface de la muqueuse et de repérer les sites considérés comme suspects, lesquels font alors l'objet de biopsies pour déterminer la nature histo-pathologique exacte du tissu. Mais, les lésions pré-cancéreuses ou cancéreuses précoces sont, le plus souvent, invisibles à cette observation. Pour éviter des biopsies systématiques, les méthodes de spectroscopie optique fibrée permettent de coupler des informations fonctionnelles à des informations spectrales mesurables, ce qui pourrait discriminer le tissu sain du tissu pathologique.

Les techniques de spectroscopies optiques point par point (autofluorescence et diffusion élastique notamment) peuvent être utilisées, au cours d'un même examen clinique endoscopique, pour

discriminer les tissus pathologiques des tissus sains en guidant les biopsies et ainsi améliorer la sensibilité de la méthode.

1.2.2 But et organisation des travaux

Notre thèse se situe dans la continuité des travaux réalisés précédemment au laboratoire dans le domaine de la spectroscopie fibrée en autofluorescence par [Padilla Ybarra, 1999] et en diffusion élastique par [Chalau, 2004]. 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'œil nu.

Le but applicatif de nos travaux est la caractérisation de tissus biologiques *in vivo*, en particulier les tissus sains et tumoraux dans la vessie. En combinant des mesures spectroscopiques en autofluorescence et en diffusion élastique, nous cherchons à améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic (sain-inflammatoire-cancéreux) pré-biopsique.

Plus précisément, nous nous proposons de déterminer si la combinaison des mesures en réflectance diffuse et en autofluorescence permet d'améliorer la sensibilité et la spécificité de détection des lésions tumorales dans la vessie.

En parallèle à l'élaboration d'un nouveau système instrumental répondant à notre problématique, nous avons travaillé en condition *ex vivo* sur un tissu artériel. Ce modèle nous a permis d'évaluer les caractéristiques métrologiques de l'instrumentation existante (sensibilité des outils disponibles) et de déterminer les améliorations à apporter. Par ailleurs, nous avons pu valider l'algorithme de simulation de propagation de la lumière dans les tissus, algorithme développé pour notre application, sur un tissu biologique déformable.

Une fois le système instrumental et la modélisation théorique finalisés et validés, nous avons conduit une étude expérimentale sur un modèle de tumeurs de vessie de rats *in vivo*.

1.2.3 Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques de nos travaux concernent trois axes principaux :

- l'instrumentation,
- la modélisation des propriétés optiques des tissus,
- la validation expérimentale.

1.2.3.1 Instrumentation

Il s'agit de concevoir, développer et réaliser un nouveau dispositif intégrant, parallèlement à la spectroscopie de réflectance diffuse (DRS), la spectrométrie de fluorescence et passant par l'étude de solutions technologiques optimisées notamment pour les sources de lumière et la sonde à fibres optiques [Péry *et al.*, 2006a]. Cet instrument fibré doit permettre d'acquérir rapidement des spectres tissulaires *in vivo*. Plusieurs problèmes se posent : acquisition simultanée et rapide des spectres sur les mêmes sites géométriques, diamètre de la sonde à fibres optique, excitations de fluorescence et de diffusion élastique devant suivre un chemin identique... Par exemple, la sonde à fibres optiques doit avoir un diamètre compatible avec les endoscopes (diamètre inférieur à 3 mm) en vue d'une utilisation en clinique. Sa résolution spatiale et sa sensibilité doivent être optimisées.

Le système de spectrométrie de diffusion élastique et de fluorescence doit pouvoir :

- fournir une excitation en lumière blanche unique en un point, afin d’éviter toute variation de la source de lumière,
- générer une excitation de la fluorescence endogène et une excitation en diffusion permettant une colocalisation des spectres d’autofluorescence et de diffusion élastique,
- acquérir simultanément plusieurs spectres de fluorescence endogène et de diffusion élastique correspondant aux différentes distances entre la fibre d’excitation et les fibres de réception.

Parce que nous voulons étudier et développer un système intégré transportable en clinique de spectrométrie bimodale combinant la fluorescence et la diffusion élastique [Péry *et al.*, 2006a], nos principaux axes de travaux portent sur le choix d’une géométrie de capteur, sur l’étude et la mise en œuvre d’une solution technologique pour l’acquisition simultanée de plusieurs spectres (entre 10 et 30) et sur l’étude fonctionnelle et structurelle d’un prototype d’excitation combinant la DRS à la spectroscopie de fluorescence.

La première phase de ce travail a consisté à évaluer l’instrumentation pré-existante, la seconde à réfléchir sur la conception d’un système instrumental et la dernière à concevoir un système de spectroscopie bimodale. Le chapitre 2 présente l’étude instrumentale menée et précise les raisons du choix final pour un dispositif de « table », compte tenu de différentes contraintes techniques et technologiques rencontrées.

1.2.3.2 Modélisation des propriétés optiques des tissus biologiques

Les tissus biologiques constituent des milieux de physiologie et de composition biochimique et anatomiques complexes, ces différentes caractéristiques évoluant notamment avec le temps et les pathologies. Compte tenu de la taille et de l’organisation des éléments cellulaires et structuraux des tissus ainsi que de leur nature chimique, les interactions de la lumière avec ces milieux turbides font intervenir de nombreux processus (absorption, réflexion, diffusion...). Dans le cas d’échantillons « minces », l’intensité de fluorescence est notamment proportionnelle à la concentration et au rendement quantique de fluorescence. Dans un milieu plus épais, très diffusant et optiquement inhomogène comme un tissu biologique, les processus de diffusion jouent un rôle primordial dans la propagation de la lumière : c’est pourquoi les parcours de diffusion des photons dans l’échantillon doivent être pris en compte. La diffusion multiple des photons combinée à l’autofluorescence modifie les caractéristiques d’émission spectrale des tissus biologiques. Pour extraire ces informations, il faut développer un modèle optique mathématique approprié aux tissus biologiques et résoudre le problème de propagation du rayonnement dans ce milieu.

Compte tenu de la complexité du milieu (multi-couches) et des contraintes géométriques (faibles distances entre fibres d’excitation et d’émission), les simulations statistiques (Monte Carlo) de propagation de photons donnent des résultats plus précis que les simulations fondées sur la résolution de l’équation de diffusion, notamment en milieux turbides et très absorbants [Liu *et al.*, 2003]. Une des difficultés réside dans la simulation pour décrire le problème direct en absorption, diffusion et fluorescence multiples dans un milieu multi-couches, sur une large bande spectrale.

Il s’agit donc d’implémenter un modèle particulier, adapté à nos besoins et à la configuration de notre système et de simuler les propriétés physico-optiques de ces tissus (milieux diffusants, systèmes multi-couches). Les travaux réalisés sont présentés dans le chapitre 3.

1.2.3.3 Validation expérimentale

L'objectif de cette validation est double. Il s'agit, dans un premier temps, de tester les dispositifs existant au laboratoire et de valider l'algorithme de simulation que nous avons développé pour notre application. Nous travaillerons sur des fantômes pour les tests préliminaires sur la simulation puis en condition *ex vivo* sur un tissu artériel (chapitre 4).

Dans un second temps, après avoir déterminé les critères de choix d'un modèle animal adapté aux besoins des essais envisagés, nous avons conduit une étude expérimentale sur modèle de tumeur de vessie de rats *in vivo* (identification d'états sains, dysplasiques et cancéreux). Cette étude est détaillée au chapitre 5.

1.3 Spectroscopies tissulaires appliquées au diagnostic *in vivo* : étude bibliographique

1.3.1 Quelques définitions

La spectroscopie, ou spectrométrie optique³, permet l'étude des rayonnements électromagnétiques émis, absorbés ou diffusés par la matière. Elle est utilisée dans de nombreuses disciplines : astronomie, biophysique, chimie, physique, mécanique. . .

Dans le domaine proche ultraviolet (UV)-Visible-proche infrarouge (NIR), les spectroscopies optiques fibrées actuellement en cours d'évaluation sont principalement la fluorescence, la diffusion élastique et la diffusion Raman (Fig. 1.6).

La première utilisée à des fins diagnostiques fut la **fluorescence**. Aujourd'hui encore, elle reste la plus employée : elle donne lieu à la majorité des travaux de recherche en photodiagnostic, tant fondamentaux que cliniques.

La **spectroscopie de diffusion élastique**, malgré un nombre limité de travaux, suscite un intérêt croissant. Ne présentant pas de difficulté technique majeure, son exploitation nécessite en revanche le développement de modèles mathématiques de diffusion de la lumière dans les tissus biologiques tenant compte de leur complexité [A'Amar and Bigio, 2006].

La **spectroscopie Raman**, phénomène de diffusion non élastique, présente le grand intérêt de fournir directement une information sur la composition chimique du tissu.

Tous ces phénomènes (Raman, diffusion élastique, fluorescence) sont étudiés dans le but de les appliquer aux tissus épithéliaux lors du dépistage précoce du cancer, lequel est une voie majeure de recherche pour améliorer les chances de guérison.

Une expérience de spectroscopie permet d'étudier l'interaction entre le rayonnement et la matière (Fig. 1.9). Cette interaction peut, par exemple, être décrite par l'affaiblissement du flux lumineux au cours de sa traversée d'un échantillon d'épaisseur l [Génie des Procédés, 1998].

La suite de cette section présente succinctement, pour information, la spectroscopie Raman et plus longuement les spectroscopies de diffusion élastique et d'autofluorescence, spectroscopies choisies pour notre étude. Pour de plus amples informations, le lecteur pourra se reporter aux ouvrages [Valette and Bourg-Heckly, 2002] [Vo-Dinh, 2003a].

³Le suffixe « -scopie » fait référence à l'observation visuelle, par exemple l'impression sur un film photographique, la projection sur un écran ou bien l'utilisation d'une lunette d'observation. Le suffixe « -métrie » fait référence à l'enregistrement d'un signal par un appareil.

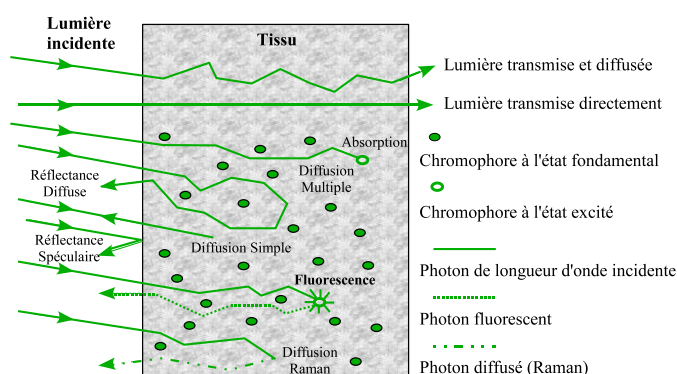


FIG. 1.9 – Représentation schématique des différents modes d'interactions lumière-tissus en réflexion et en transmission (absorption, diffusion élastique et inélastique, fluorescence).

1.3.2 Spectroscopie Raman

En 1928, en Inde, Sir C.V. Raman fut le premier à s'intéresser au phénomène d'émission lumineuse inélastique : il fut d'ailleurs récompensé par le prix Nobel en 1930 [Barabillat *et al.*, 1999] [Génie des Procédés, 1998]. L'effet Raman fut découvert simultanément en 1928 par Krishnan lors de l'étude de la diffusion de la lumière par les liquides et par Landsberg et Mandelstam dans des travaux sur les solides.

1.3.2.1 Principe

Porté à un niveau énergétique supérieur par une source lumineuse (monochromatique : laser), le matériau excité émet une radiation collectée puis analysée par un détecteur adéquat. Cette radiation comporte deux types de signaux. Le premier très majoritaire correspond à la diffusion élastique (Rayleigh ou Mie selon la taille des diffuseurs par rapport à la longueur d'onde) sans changement d'énergie donc sans changement de longueur d'onde. Toutefois, une faible fraction de la lumière incidente va mettre en vibration des noyaux moléculaires, donnant lieu à l'émission d'un rayonnement à des fréquences discrètes différentes du faisceau incident. C'est la *diffusion Raman* : diffusion non élastique (raies Stokes ou anti-Stokes, Fig. 1.10). La lumière diffusée n'a pas la même longueur d'onde que la lumière incidente. La variation d'énergie observée sur le photon renseigne alors sur les niveaux énergétiques de rotation et de vibration de la molécule concernée [DaCosta *et al.*, 2002].

Les sections efficaces de diffusion Raman sont nettement inférieures à celles observées en fluorescence, elles-mêmes très inférieures aux sections efficaces de diffusion élastique. Il en résulte que les signaux Raman ont des intensités très faibles comparativement à la diffusion élastique (facteur 10^{-9} à 10^{-6}) et à la fluorescence intrinsèque des tissus biologiques. La diffusion et la fluorescence sont ici des phénomènes parasites qui compliquent la mise en œuvre instrumentale et clinique de la méthode [Tuchin, 2002]. Mais, les progrès accomplis dans la technologie des lasers à semi-conducteurs et des détecteurs CCD ont permis le développement de **spectrofluorimètres Raman** : la source d'excitation est un laser à semi-conducteur émettant quelques centaines de mW en continu à une longueur d'onde choisie entre 750 et 850 nm ; le détecteur est une barrette CCD refroidie à l'azote liquide.

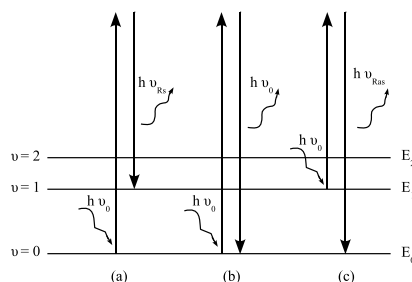


FIG. 1.10 – (a) Diffusion Raman Stokes ($\nu_{Rs} = \nu_0 - \nu_a$), (b) Diffusion élastique, (c) Diffusion Raman anti-Stokes ($\nu_{Ras} = \nu_0 + \nu_a$), avec ν_0 la fréquence de la source monochromatique excitatrice du spectre. Si le photon incident a une énergie très supérieure au niveau d'énergie de vibration, alors on observe un phénomène de diffusion :

- Rayleigh (diffusion élastique) si les photons incident et diffusé ont même énergie,
- Raman Stokes si le photon diffusé est à plus faible énergie. Le photon incident a cédé à la molécule au repos une quantité d'énergie correspondant à l'énergie de vibration nécessaire à la transition de l'état fondamental E_0 ($\nu = 0$) à l'état excité E_1 ($\nu = 1$),
- Raman anti-Stokes si le photon diffusé est à plus grande énergie. La molécule à un état excité a cédé au photon incident une quantité d'énergie correspondant à l'énergie de vibration lors de la transition de l'état excité E_1 ($\nu = 1$) à l'état fondamental E_0 ($\nu = 0$).

L'élimination du signal de diffusion est obtenue par filtrage et un choix judicieux de la longueur d'onde excitatrice permet de minimiser l'autofluorescence. La longueur d'onde d'excitation peut être choisie dans l'ultraviolet, le visible ou l'infrarouge.

L'excitation dans l'UV à des longueurs d'onde inférieures à 270 nm comporte *a priori* un double avantage : d'une part, elle augmente le signal Raman en bénéficiant de l'effet Raman résonnant et d'autre part, elle s'affranchit de la fluorescence [Barbosa *et al.*, 2002].

L'excitation dans le visible permet aux longueurs d'onde du spectre Raman de se trouver dans le même domaine spectral que la fluorescence. L'excitation dans le visible est alors le plus souvent utilisée *in vitro*, notamment en microscopie confocale, surtout sur des cultures cellulaires.

L'excitation dans l'infrarouge proche (autour de 800 nm) permet de réduire considérablement la fluorescence tissulaire, tout en assurant une bonne pénétration de la lumière dans le tissu et en bénéficiant de détecteurs CCD ayant une sensibilité suffisante. C'est pourquoi les études pratiquées *in vivo* utilisent exclusivement le Raman dans l'infrarouge proche (NIR ou « Near Infrared Raman »).

1.3.2.2 Avantages et limites de cette méthode

A la fin des années 1930, la spectroscopie Raman est devenue la principale méthode spectroscopique non-destructive d'analyse chimique (étude des molécules pures en solution), qui permet de caractériser la composition moléculaire et la structure d'un matériau, par l'interaction entre la lumière et les vibrations des atomes entre eux (agitation thermique) [Tuchin, 2002]. Elle fournit l'information la plus riche aux niveaux moléculaire et structural. Son utilisation est fréquente en chimie, en biologie, en œnologie... C'est une des rares méthodes qui, à température ambiante, rend possible l'obtention d'une caractérisation vibrationnelle ou chimique d'un objet. Elle fut ensuite étendue aux domaines cellulaire et sub-cellulaire [Barabillat *et al.*, 1999]. Sa capacité à détecter de faibles modifications biochimiques induites par la transformation néoplasique permet *a priori* de différencier les tumeurs bénignes des tumeurs malignes et de repérer les différents grades de dysplasie.

Mais elle pose de nombreux problèmes techniques lors de sa mise en œuvre clinique, problèmes liés à la sensibilité des instruments de mesure. En effet, la spectroscopie Raman mesure des signaux d'amplitude extrêmement faibles et les outils actuels de mesure (spectromètres et détecteurs) ont encore une sensibilité trop limitée pour permettre son application en endoscopie. Par ailleurs, l'acquisition du signal est actuellement longue et l'application sur des tissus vivants mobiles délicate. Enfin, un des problèmes les plus difficiles à résoudre est l'élimination du signal Raman généré par le matériau constitutif des fibres optiques. En effet, non seulement les fibres produisent une fluorescence parasite mais elles génèrent leur propre spectre de diffusion Raman qui va interférer avec le spectre Raman tissulaire. Ce signal Raman parasite, produit par la lumière excitatrice dans la fibre d'émission et par la lumière diffusée par le tissu dans les fibres de réception, nécessite le développement et l'emploi de filtres spécifiques de réjection.

1.3.2.3 Applications

Un spectre Raman est la courbe donnant l'intensité lumineuse diffusée en fonction de la différence d'énergie ou déplacement en longueur d'onde (exprimée en $1/\lambda$, en cm^{-1}) entre les photons incidents et diffusés. La région entre 200 cm^{-1} et 2000 cm^{-1} est la plus utilisée. Un spectre Raman comprend un grand nombre de bandes étroites, d'une largeur de 10 à 20 cm^{-1} , chaque bande représentant une vibration moléculaire spécifique. La figure 1.11 illustre un exemple de cet effet pour une région du col de l'utérus avec métaplasies⁴ et avec dysplasies épidermoïdes de haut grade.

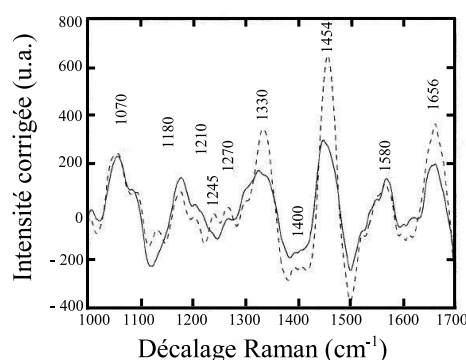


FIG. 1.11 – Spectres Raman typiques d'une région, supposée normale à la colposcopie, du col de l'utérus avec métaplasies (trait fin) et d'une région, non normale à la colposcopie, avec dysplasies épidermoïdes de haut grade (trait en pointillé), spectres corrigés de l'autofluorescence (excitation par diode laser à 789 nm) [Utzinger *et al.*, 2001b].

Les fréquences Raman, décalées par rapport à la fréquence de l'excitation sont directement liées [Barabillat *et al.*, 1999] :

- à la nature de la liaison chimique (simple, double, ionique, ...),
- au type de mouvement de la liaison (rotation, étirement, ...),
- à l'anisotropie éventuelle du matériau,
- à l'environnement direct (matériaux sous contrainte, ...).

⁴La métaplasie désigne le phénomène par lequel un tissu donné se transforme en un tissu d'un autre type [FNCLCC, 2003].

Les changements biochimiques et structuraux associés à la transformation néoplasique se traduisent par une modification des caractéristiques vibrationnelles de certaines molécules comme les protéines, les acides nucléiques et les lipides, provoquant ainsi une modification du spectre Raman tissulaire, ce qui permet de différencier les tumeurs du tissu sain. Dans le cas du cancer du sein, des travaux sur des échantillons tissulaires excisés ont montré que les spectres du tissu sain sont dominés par les bandes caractéristiques des acides gras ($1\,657$, $1\,442$ et $1\,300\text{ cm}^{-1}$) alors que dans le tissu tumoral, les modes caractéristiques des protéines structurelles ($1\,667$, $1\,452$, $1\,260$, 890 et 820 cm^{-1}) sont prépondérants [Valette and Bourg-Heckly, 2002].

D'autres travaux ont été réalisés notamment pour le dépistage du cancer ou des lésions précancéreuses du sein *in vivo* [Utzinger *et al.*, 2001b] et *in vitro* [Manoharan *et al.*, 1998], du cancer de la peau *ex vivo* [Gniadecka *et al.*, 1997] ou *in vivo* et *in vitro* [Caspers *et al.*, 1998], du cancer du col de l'utérus *in vitro* [Mahadevan-Jansen *et al.*, 1998], des adénocarcinomes [Crow *et al.*, 2003], du cancer du poumon [Yamazaki *et al.*, 2003]...

Les derniers travaux réalisés semblent indiquer à moyen terme l'application de cette technique *in vivo* à l'endoscopie clinique, en fonction des évolutions technologiques [Shim *et al.*, 2000] [Lau *et al.*, 2003].

1.3.3 Spectroscopie de diffusion élastique

Lors de l'irradiation d'un tissu biologique par une source lumineuse de relative basse puissance, un phénomène physique complémentaire à l'absorption pure peut être étudié : il s'agit de la *diffusion élastique* [Groenhuis *et al.*, 1983a] [Groenhuis *et al.*, 1983b]. Si un milieu inhomogène constitué de particules aléatoirement réparties est éclairé par un rayon lumineux, les photons peuvent, soit se propager dans le milieu suivant leur direction initiale, soit être déviés. Si les photons ne sont déviés qu'une seule fois, nous parlons de *diffusion simple* ; si les changements de direction sont plus nombreux, nous utilisons alors le terme de *diffusion multiple* (Fig. 1.9). Ces changements de direction des photons s'opèrent sans perte d'énergie : les photons gardent leur même longueur d'onde tout au long de leur trajet au sein du tissu biologique [Farrel *et al.*, 1992]. Macroscopiquement, la diffusion entraîne une modification de la trajectoire initiale du rayon lumineux qui peut être renvoyé dans toutes les directions de l'espace. La diffusion dans un milieu donné est caractérisée quantitativement par deux paramètres : le coefficient de diffusion μ_s et la fonction de phase $f(\theta)$. Selon la dimension des « centres diffuseurs » par rapport à la longueur d'onde, la diffusion s'effectuera de façon plus ou moins isotrope. Ces paramètres seront détaillés dans le chapitre 3.

La diffusion dans les tissus est due à la présence de nombreuses particules de taille et d'indice de réfraction variés : cellules, organites sub-cellulaires tels que noyaux et mitochondries, vaisseaux sanguins, fibres de collagène...

Dans le domaine allant du rouge au proche infrarouge (600 à $1\,200\text{ nm}$) où l'absorption globale des tissus est faible, la diffusion est très supérieure à l'absorption et joue donc un rôle prépondérant. L'action simultanée de l'absorption et de la diffusion détermine une région spectrale entre 700 et $1\,100\text{ nm}$ pour laquelle la transmission dans les tissus est maximale, la pénétration d'un faisceau lumineux pouvant atteindre plusieurs millimètres à quelques centimètres.

1.3.3.1 Principe

La spectroscopie de diffusion élastique (ESS ou « Elastic Scattering Spectroscopy », LSS ou « Light Scattering Spectroscopy ») est un domaine de la spectroscopie qui étudie l'interaction de la lumière avec le tissu grâce à l'analyse de la lumière diffusée. Il existe plusieurs techniques per-

mettant l'étude de la lumière diffusée (transmission, réflectance) mais l'utilisation en endoscopie ne permet que l'étude de la lumière rétrodiffusée (lumière qui, après avoir été propagée dans le tissu, ressort du même côté ou sur la même surface que l'excitation), c'est-à-dire en *spectroscopie en réflectance diffuse* (DRS ou « Diffuse Reflectance Spectroscopy »).

La façon dont la lumière est absorbée et diffusée par un tissu est un reflet de sa morphologie (dimension, nombre de noyaux, ...). Or, comme nous l'avons vu précédemment (chapitre 1 section 1.1), la cellule cancéreuse possède de nombreuses caractéristiques morphologiques la différenciant d'une cellule normale. Ces anomalies modifient les propriétés optiques du tissu et donc les caractéristiques de la lumière diffusée par celui-ci. Les spectres de diffusion élastique apparaissent ainsi comme des indicateurs de la structure morphologique du tissu.

La plupart des photons recueillis ont subi de multiples diffusions et parcouru une distance plusieurs fois supérieure à celle séparant les fibres. Si la distance entre les fibres d'excitation et de détection est faible (généralement inférieure à 1 mm), la distribution spectrale de la lumière diffusée dépend de la taille et de la forme des particules diffusantes et sera donc affectée par un changement morphologique du tissu. Le spectre de diffusion élastique obtenu est complexe : il reflète la diffusion mais aussi l'absorption du tissu dans le domaine spectral choisi, les effets des deux phénomènes se superposant.

L'instrumentation DRS en excitation continue – appareillage simple – est constituée en général de trois éléments : une source d'excitation, un système de distribution et de collection de la lumière et un système d'acquisition et de traitement du signal [Chalau, 2004].

La source d'excitation est une source de lumière blanche, le plus souvent une lampe xénon ; cependant, ce peut être une lampe halogène, des DELs ou encore des lasers. Les lampes halogènes sont limitées en bande spectrale violette et UV. Dans le domaine UV, nous pouvons alors utiliser une lampe deutérium. Les lampes xénon ont des spectres inhomogènes au-dessus de 700 nm. Les lasers, quant à eux, ont des bandes spectrales très étroites mais le nombre accessible de longueurs d'onde est limité ; par ailleurs, ils ont un coût élevé.

Le système de distribution et de collection de la lumière est constitué de fibres optiques multi-modes ou de systèmes à base de miroirs et de lentilles. Dans le cadre de l'endoscopie et de l'application clinique, seule l'utilisation des fibres optiques est possible. Le signal de diffusion est donc collecté par une ou plusieurs fibres et analysé sur un large domaine spectral s'étendant de 300 à 800 nm. Le contact tissulaire évite la réflexion spéculaire ou diffusée une fois.

Enfin, le système d'acquisition et de traitement du signal a pour but d'acquérir et d'analyser le signal. Il est constitué d'un spectrographe à base de CCD ou de photodiodes, d'un ordinateur et d'un logiciel spécifique. La résolution du spectromètre varie entre 1 et 5 nm. La sensibilité peut être assez faible car contrairement aux signaux de diffusion Raman ou d'autofluorescence, le signal de diffusion élastique est relativement intense.

La réponse spectrale du système de spectroscopie est habituellement calibrée en enregistrant un spectre de référence $I(\lambda)_{ref}$ d'un étalon en réflectance diffuse tel que le Spectralon® ou le Téflon [A'Amar and Bigio, 2006]. Le spectre de réflectance $R(\lambda)$ (Fig. 1.12) est alors calculé en fonction des spectres d'intensité, comme suit (équation 1.5) :

$$R(\lambda) = \frac{I(\lambda)_{tissue} - I(\lambda)_{tissue \ background}}{I(\lambda)_{ref} - I(\lambda)_{ref \ background}} \quad (1.5)$$

$I(\lambda)_{tissue}$ correspond au spectre mesuré sur le tissu et le mot *background* fait référence aux mesures du bruit de fond (mesures réalisées sans déclenchement de la source lumineuse et incluant les lumières du milieu ambiant et l'acquisition du noir du détecteur).

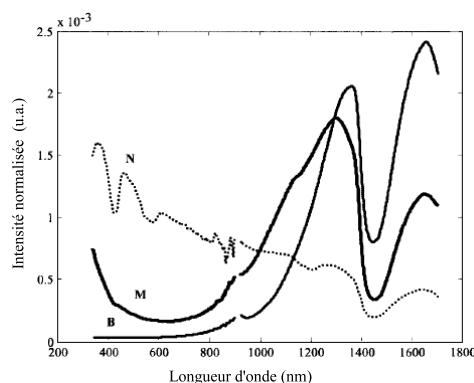


FIG. 1.12 – Spectres normalisés de diffusion élastique représentatifs de données typiques de lésions bénignes pigmentées, de mélanomes et de peau saine d’opossums en utilisant un système ESS UV-visible. Spectre B : lésion bénigne pigmentée, spectre M : mélanome, spectre N : peau saine [A’Amar and Bigio, 2006].

1.3.3.2 Avantages et limites de cette méthode

Les atouts de ce procédé sont l’absence d’utilisation de fluorophore exogène et l’intensité des signaux recueillis, ce qui permet une mesure rapide sur les tissus et un bon rapport signal sur bruit avec une instrumentation d’un coût modéré. Par ailleurs, la technique est rapide et facile à mettre en œuvre [Chalau, 2004].

Toutefois, les différences entre les spectres de diffusion des tissus sains et tumoraux sont faibles, nécessitant la mise en œuvre de méthodes d’analyse et de traitements des signaux particuliers. Une des principales difficultés réside, notamment, dans le développement de modèles mathématiques de diffusion de la lumière dans les tissus biologiques : en effet, les tissus biologiques sont des milieux complexes, très hétérogènes et fortement diffusants. Leurs propriétés optiques varient non seulement d’un tissu à un autre mais peuvent également varier à l’intérieur d’un même tissu en raison des inhomogénéités locales, ce qui rend plus difficile le développement de modèles mathématiques.

Les limites de cette approche résident également dans le grand nombre de mesures nécessaires pour obtenir un critère de diagnostic. Par ailleurs, [Utzing *et al.*, 2001a] mentionnent qu’il n’existe pas d’algorithme idéal d’analyse des spectres, la solution étant spécifique à chaque application.

1.3.3.3 Applications

Des travaux ont montré un accroissement de la dimension des noyaux des cellules des tissus cancéreux [Sommoggy *et al.*, 1975] [Fossa and Kaalhus, 1976].

La spectroscopie de diffusion élastique, bien que moins connue à l’heure actuelle que la spectroscopie de fluorescence, tend à gagner en importance et intérêt dans les domaines de la biologie et de la santé. En effet, des travaux utilisent cette technique pour différencier les tissus sains de tissus dysplasiques [Wallace *et al.*, 2000] et pré-cancéreux [Gurjar *et al.*, 2001], ou encore pour évaluer l’impact de la cryoconservation sur les propriétés optiques des tissus vasculaires [Cilesiz and Welch, 1994]. Dans le cas de l’œsophage de Barrett, en choisissant comme critère de diagnostic d’une dysplasie une proportion minimale de 30% des noyaux dont le diamètre excède 10

micromètres, la sensibilité et la spécificité atteignent toutes deux 90% [Wallace *et al.*, 2000]. Cette méthode connaît un essor depuis ces dernières années et quelques applications ont été développées à des fins de dépistage précoce du cancer [Mourant *et al.*, 1995] [Bigio *et al.*, 2000]. Les premiers résultats sont « optimistes » [Bigio and Mourant, 1997] [Mourant *et al.*, 1998], comme nous le montrerons ci-après dans l'approche « diagnostique ».

Selon [Perelman and Backman, 2002], deux approches dans le traitement du signal ESS peuvent être envisagées pour le dépistage du cancer : l'approche « analytique » et l'approche « diagnostique ».

Le but du traitement des données en **approche « analytique »** est d'identifier les caractéristiques du tissu à partir de la forme du spectre. La dimension moyenne des particules diffusantes et/ou les coefficients optiques du tissu [Dam *et al.*, 2001] peuvent être utilisés comme critère de diagnostic [Backman *et al.*, 2000] .

En ce qui concerne le tissu épithélial [Valette and Bourg-Heckly, 2002], une très faible fraction de la lumière sera rétrodiffusée par les noyaux ; la majeure partie de la lumière traverse la première couche de cellules épithéliales et atteint les couches les plus profondes où elle est l'objet de diffusions multiples qui vont éventuellement la renvoyer vers la surface. Elle franchira à nouveau l'épithélium où elle pourra subir une nouvelle diffusion par les noyaux. La lumière émergente collectée par la fibre de détection est donc constituée d'un fond important de lumière diffusée par les couches sous-jacentes à l'épithélium auxquelles se superpose une faible composante (inférieure à 5% du total) provenant d'une diffusion simple par les noyaux épithéliaux. A partir du spectre de diffusion des noyaux, il est possible de déterminer la distribution de leur taille et leur indice de réfraction. Cela permet alors d'évaluer quantitativement l'augmentation de taille des noyaux, la densité nucléaire (nombre de noyaux par unité de surface) et le contenu en chromatine : trois paramètres utilisés pour l'identification de cellules cancéreuses lors des examens cytologiques effectués sur les biopsies. La méthode suppose donc que l'on soit capable d'extraire le signal de rétrodiffusion nucléaire du fond diffusant.

A ce propos, deux techniques ont été mises en œuvre : la première est fondée sur un modèle mathématique de diffusion de Mie [Perelman *et al.*, 1998]. La seconde, expérimentale, consiste à polariser la lumière excitatrice. En effet, un faisceau lumineux initialement polarisé perdra sa polarisation au bout de plusieurs diffusions alors qu'une seule diffusion conservera l'état de polarisation. Le fond diffusant est éliminé à la détection en soustrayant expérimentalement la composante non polarisée de la lumière rétrodiffusée.

[Zonios *et al.*, 1999] utilisent un modèle analytique de diffusion de la lumière pour distinguer un tissu de côlon normal et des polypes adénomateux. Ce modèle a été testé et validé sur un fantôme de tissu composé de billes de polystyrènes et d'hémoglobine. Il permet de définir la saturation en oxygène, la concentration en hémoglobine, le nombre moyen de particules diffusantes dans une unité de volume et le diamètre moyen de ces particules.

[Gurjar *et al.*, 2001] calculent la dimension des noyaux des cellules grâce à un système de mesures de lumière diffusée pour le diagnostic de polypes du côlon.

[Chalau *et al.*, 2002] montrent qu'il est possible d'obtenir des différences significatives entre les spectres de diffusion recueillis *in vivo* sur des tissus sains de rats et des tumeurs transplantées, visibles à l'œil nu.

[Georgakoudi and Van Dam, 2005] utilisent un modèle qui permet de calculer les coefficients

optiques $\mu_{s'}$ et μ_a dans la région 500 - 700 nm, à partir des spectres de diffusion élastique. Les valeurs de $\mu_{s'}$ sont alors reconnues comme critère de diagnostic dans le cas de dysplasie dans l'œsophage de Barrett.

[Zhu *et al.*, 2006] explorent l'utilisation de la spectroscopie de réflectance diffuse dans la bande ultraviolet - visible pour le diagnostic du cancer du sein. Pour extraire les caractéristiques des spectres, ils comparent un modèle physique (modèle inverse de Monte Carlo) et une approche fondée sur un modèle empirique (analyse partielle des moindres carrés). Alors que les deux méthodes présentent des résultats de classification similaires, l'approche fondée sur un modèle empirique fournit en outre des caractéristiques physiologiques et structurelles susceptibles de différencier des tissus du sein normaux et malins.

L'**approche « diagnostique »** a pour but d'analyser les spectres globaux de diffusion élastique sans interprétation physique ou histo-pathologique. La forme du spectre et l'intensité des pics sont alors étudiées. Cette méthode demande la mesure d'un nombre important d'échantillons pour obtenir un résultat statistique significatif.

[Mourant *et al.*, 1995] utilisent un algorithme de diagnostic basé sur les valeurs des pentes, entre 330 et 370 nm, des spectres de diffusion élastique pour estimer la différence entre des épithéliums sains et malins de vessies sur 10 patients : sensibilité de 100%, spécificité de 97%, valeurs très élevées dues au faible nombre de patients.

[Mourant *et al.*, 1996] constatent l'existence d'une différence d'aire sous la courbe des spectres de diffusion élastique sur le côlon, dans la bande spectrale 540 - 580 nm : muqueuse normale, colite, dysplasie, adénome, adénocarcinome. La figure 1.13 montre des spectres typiques de diffusion élastique obtenus sur le côlon d'un patient. Les critères de discrimination sont établis empiriquement par analyse comparative des spectres des tissus sains et cancéreux, comme les valeurs des pentes des spectres à différentes longueurs d'onde ou l'aire sous la courbe sur une bande de longueurs d'onde donnée.

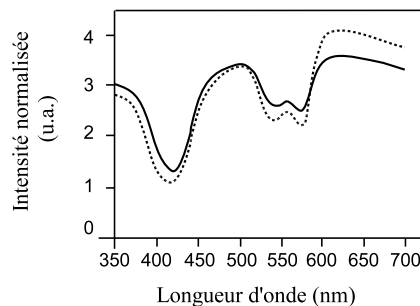


FIG. 1.13 – Spectres typiques de diffusion élastique obtenus sur le côlon d'un patient, normalisés par rapport au signal total intégré entre 350 et 700 nm. Le trait plein représente une muqueuse normale et le trait en pointillé un adénome partiel [Mourant *et al.*, 1996].

[Ge *et al.*, 1998] emploient la spectroscopie de réflectance diffuse sur le côlon pour déterminer si les spectres, dans la région 350 - 800 nm, peuvent être utilisés pour distinguer des tissus néoplasiques de tissus non néoplasiques. Des algorithmes de reconnaissance de forme incluant une régression linéaire multiple, une analyse linéaire discriminante et une classification par réseaux de neurones sont utilisés pour distinguer ces deux types de tissus. Les principales différences spectrales sont attribuées aux changements dus au volume de sang, à la saturation en oxygène

de l'hémoglobine, à la profondeur moyenne des vaisseaux sous le tissu et à la diffusion du tissu.

[Bigio *et al.*, 2000] présentent, quant à eux, une étude préliminaire sur les résultats obtenus lors d'expériences *in vivo* réalisées sur 31 seins de femmes. 72 sites et 54 sites histologiques ont été respectivement mesurés sur ces tissus (cancéreux ou non) et sur des ganglions sentinelles (avec ou sans tumeur). L'utilisation de réseaux neuronaux artificiels pour analyser les différences entre les spectres permet d'obtenir des sensibilités de 69% et 58% et des spécificités de 85% et 93% respectivement pour les tissus mammaires et pour les ganglions sentinelles. Selon les auteurs, en augmentant la base de données et avec des algorithmes de pré-traitements plus complexes, les valeurs de sensibilité et de spécificité devraient augmenter.

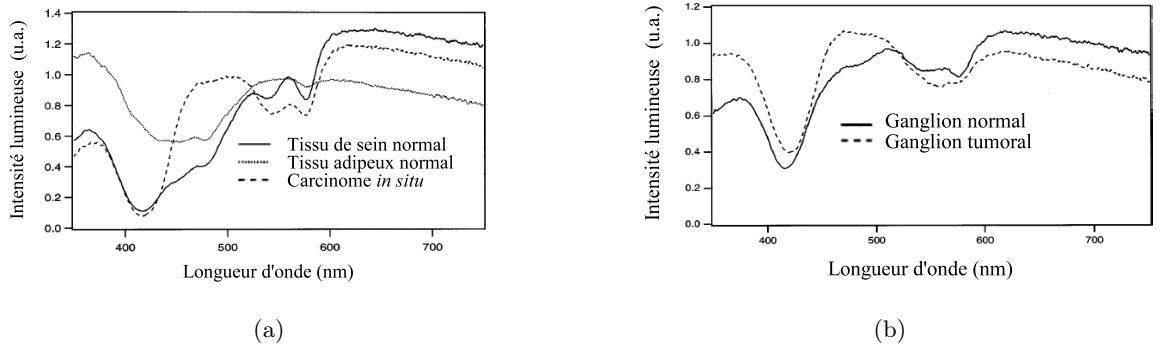


FIG. 1.14 – Exemples de spectres ESS (a) pour des tissus de sein, (b) pour des ganglions normaux ou tumoraux [Bigio *et al.*, 2000].

[Utzinger *et al.*, 2001a] analysent l'intensité des spectres d'ovaires sains et de tumeurs ovariennes bénignes ou malignes dans la bande spectrale 530 - 580 nm et l'allure des spectres dans les régions 490 - 520 nm, 510 - 530 nm à des distances différentes entre les fibres d'excitation et les fibres de réception (1,1 mm pour la région 490 à 520 nm ; 2,1 et 3 mm pour la région 510 à 530 nm). Ces critères leur permettent de différencier des cancers ovariens de néoplasmes bénins ou d'ovaires normaux avec une sensibilité de 86% et une spécificité de 80%.

Ainsi, l'application de ces deux approches, analytique et diagnostique, nécessite des solutions différentes, tant au niveau de l'instrument (surtout les fibres optiques) qu'au niveau du traitement des données. En effet, pour calculer les coefficients optiques à partir de spectres enregistrés, le nombre de fibres et la distance entre les fibres doivent être conformes à la théorie physique appliquée. Par exemple, dans l'approche diagnostique, le nombre de fibres et leurs distances ne sont pas définis et peuvent même être aléatoires [Ge *et al.*, 1998].

Dans le cas de l'application de la théorie de diffusion, pour déterminer μ_a et $\mu_{s'}$, une distance suffisante entre les fibres est nécessaire pour appliquer une modélisation Monte Carlo. Le coefficient d'absorption obtenu est systématiquement inférieur à la valeur réelle utilisée dans la simulation de Monte Carlo et le coefficient de diffusion réduit systématiquement supérieur. Il est probable que la théorie de diffusion ne puisse pas expliquer la composante non diffusante de la réflectance, produite pour les faibles distances entre la source et le détecteur. En effet, pour obtenir les mêmes propriétés optiques avec la théorie de la diffusion et la simulation Monte Carlo, la première fibre de détection devrait, de façon optimale, être située à une distance radiale entre 0,75 et 1 mm de la source et les fibres les plus éloignées entre 10 et 20 mm [Nichols *et al.*, 1997].

1.3.4 Spectroscopie d'autofluorescence

L'utilisation de la LIFS (« Light Induced Fluorescence Spectroscopy » ou spectroscopie de fluorescence induite par lumière laser) comme méthode de biopsie optique est mentionnée dans la majorité des travaux de recherche en photodiagnostic, qu'ils soient fondamentaux ou cliniques. Dans le cadre de la biopsie optique, les méthodes de la LIFS en excitation continue sont le plus souvent utilisées, mais certains travaux sont consacrés à l'utilisation de la LIFS résolue dans le temps [Pfefer *et al.*, 2003b]. La LIFS informe de la nature biochimique et structurale du tissu, laquelle est fonction de son état pathologique [Bohorfoush, 2000] [A'Amar and Bigio, 2006]. Le diagnostic optique par fluorescence est fondé sur l'interaction d'une lumière de longueur d'onde appropriée, avec les fluorophores intrinsèques présents dans un tissu. Lorsque la lumière pénètre dans les tissus, elle subit des réflexions et des absorptions, certaines de ces absorptions pouvant entraîner une émission de fluorescence. Or, la profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus dépend de la longueur d'onde utilisée : celle-ci peut aller de quelques micromètres dans l'UV à plusieurs centimètres dans le proche IR [Ramanujam, 2000]. Compte tenu notamment des faibles profondeurs de pénétration des longueurs d'onde d'excitation intéressantes et utilisables en clinique (UV - Visible : 350 - 450 nm), 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 urinaires).

1.3.4.1 Principe

L'autofluorescence est un phénomène d'émission lumineuse consécutif à l'absorption d'un rayonnement par une molécule fluorescente naturellement présente dans les tissus biologiques. Ces deux phénomènes d'absorption et d'autofluorescence sont associés à des modifications de l'état d'énergie électronique de la molécule.

Le principe du phénomène de fluorescence est illustré par le diagramme de Jablonsky (Fig. 1.15).

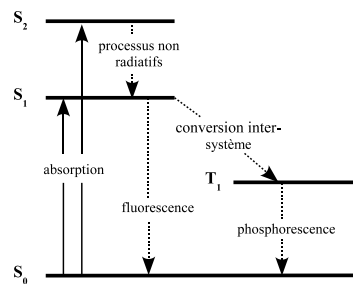


FIG. 1.15 – Diagramme de Jablonsky simplifié représentant les différentes transitions énergétiques possibles entre les états singulets S₀ (état stable), S₁ et S₂ (états excités) et l'état triplet T₁.

Par définition, une molécule ne peut exister que dans un certain nombre d'états d'énergie discrets correspondant à des configurations électroniques données. La molécule est dite à son état fondamental ou stable (S₀) lorsque l'énergie du cortège électronique est la plus faible.

- Un photon d'énergie $E_{p\ exc} = h \frac{c_0}{\lambda_{exc}}$ ($E_{p\ exc}$ énergie du photon, h constante de Planck, c_0 célérité de la lumière dans le vide et λ_{exc} longueur d'onde d'excitation) est émis par une source d'excitation lumineuse (lampe, laser...) et absorbé par une molécule, ce qui a

pour conséquence de faire passer cette molécule de son état fondamental S_0 à un niveau d'énergie électronique supérieur S_1 ou S_2 par exemple. Ces niveaux d'énergie sont par nature instables.

- L'état excité de la molécule dure un laps de temps très court ($\approx 10^{-9}$ s). Pendant cette période, le fluorophore subit des changements : il est sujet à de nombreuses interactions avec son environnement et aux variations des conditions physico-chimiques du milieu étudié [Ramanujam, 2000] [Valeur, 2001]. L'énergie correspondant à l'état S_2 est partiellement dissipée sous forme de chaleur ou de transfert entre fluorophores, ce qui produit l'état de relaxation singulet S_1 (*processus non radiatifs*).
- La molécule, dite excitée, est le siège d'une série de réactions jusqu'à son retour à l'état stable. Ces réactions permettent à cette molécule de se débarrasser de son surplus énergétique par émission d'un photon de fluorescence. Le retour de l'état S_1 à l'état S_0 peut donc se faire de deux façons :
 1. Il peut s'effectuer par une transition radiative, c'est-à-dire par l'émission d'un photon d'énergie $h \frac{c}{\lambda_{em}} < h \frac{c}{\lambda_{exc}}$. La longueur d'onde du photon de *fluorescence* émis λ_{em} sera plus grande que la longueur d'onde λ_{exc} du photon incident qui aura excité la molécule : ce phénomène est appelé *déplacement de Stokes*. Une quantification de l'énergie dissipée sous une forme différente de la fluorescence est effectuée en mesurant le *rendement quantique*, qui est le rapport entre les photons émis et les photons absorbés. Cette notion sera abordée en détail dans le chapitre 3,
 2. Il peut également s'effectuer en passant par l'état triplet T_1 . La transition radiative, faisant passer la molécule de T_1 à S_0 , est appelée *phosphorescence*. Il s'agit d'une transition interdite car elle met en jeu deux niveaux de multiplicité différente et sa probabilité est inférieure d'un facteur 10^5 à 10^9 à celle de la fluorescence [Valette and Bourg-Heckly, 2002].

Un **système d'enregistrement de la LIFS en excitation continue *in vivo*** est constitué principalement de trois parties : une source d'illumination, un système de distribution et de collection de la lumière et un système d'acquisition et de traitement du signal. Le spectromètre permet de faire l'acquisition des intensités en fonction de la longueur d'onde. Pour exciter la fluorescence, on utilise une source de lumière avec une bande étroite (en principe, la largeur à mi-hauteur est de l'ordre de 10 à 15 nm) et conforme à la bande d'excitation du fluorophore étudié : ce peuvent être des sources de lumière incohérentes filtrées (lampes à arcs) ou des sources monochromatiques (lasers : sources les plus fréquentes d'utilisation). Les systèmes de spectrofluorimétrie utilisant des lampes restent à un prix raisonnable. Les systèmes de spectroscopie de fluorescence utilisent généralement des sondes à fibres optiques pour exciter le tissu (injection de la lumière UV 300 - 480 nm) et recueillir la lumière émise par celui-ci (à travers la même fibre ou des capteurs séparés) [Zaak *et al.*, 2005].

Rappelons qu'il existe **deux approches possibles de diagnostic par fluorescence**, fondées respectivement sur l'exploitation de fluorophores exogènes (ou extrinsèques : fluorescence induite) administrés au patient (molécules injectées dans l'organisme qui ont la particularité de fluorescer, comme les colorants, les photosensibilisants...) ou de fluorophores endogènes (ou intrinsèques : autofluorescence), naturellement présents dans les tissus biologiques (flavines, nicotinamide adénine dinucléotide ou NADPH, élastine, collagène) et ne nécessitant donc pas l'adjonction d'un marqueur.

Dans le premier cas – l'utilisation de fluorophores exogènes –, la méthode consiste à ad-

ministre au patient, par voie systémique ou topique, un fluorophore qui présente une affinité préférentielle pour les tissus tumoraux et à provoquer sa fluorescence. Le tissu tumoral, ayant une concentration en fluorophore plus élevée que le tissu sain environnant, émet une fluorescence d'intensité supérieure, créant ainsi un contraste entre zones saines et tumorales, ce qui permet de les différencier.

Les molécules actuellement utilisées en recherche sont des photosensibilisants employés en thérapie photodynamique (PDT) tels que mTHPC (exemple : Foscan[®]), Photophrin[®], 5-ALA (« Amino-Levulinic Acid ») pour la vessie. Ces photosensibilisants sont des substances qui vont s'accumuler de façon accrue et plus ou moins sélective au niveau des cellules cancéreuses. Le diagnostic des lésions cancéreuses peut être amélioré par l'administration de substances exogènes mais la sensibilité et la spécificité de cette méthode dépendent du vecteur. L'hexylester d'ALA (hALA), marqueur commercialisé sous le nom de Hexvix[®], est utilisé en clinique pour le diagnostic de tumeurs de la vessie, détectées avec une sensibilité supérieure à 90% [Jichlinski *et al.*, 2003].

Dans le second cas – l'utilisation de fluorophores endogènes –, la méthode exploite le fait que les tissus biologiques contiennent des fluorophores endogènes susceptibles d'émettre, en réponse à une excitation lumineuse de longueur d'onde appropriée, une fluorescence dans un domaine spectral allant du proche UV au visible : c'est l'*autofluorescence*. Cette fluorescence naturelle d'un tissu informe sur sa nature histologique. Le principe du diagnostic repose sur le fait que l'autofluorescence des tissus sains et celle des tissus tumoraux présentent de fortes différences, à la fois sur le plan de l'intensité émise et de la forme des spectres.

Les éléments fluorescents ayant une localisation tissulaire et des fonctions biologiques différentes, les spectres d'intensité d'autofluorescence sont plus particulièrement sensibles aux variations [Ramanujam, 2000] [Valette and Bourg-Heckly, 2002] :

- du métabolisme cellulaire entre cellules saines et cancéreuses à travers l'émission des coenzymes flavines et NADPH,
- 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),
- 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 nous désirons exciter et des caractéristiques optiques du tissu.

Parmi les fluorophores endogènes présentant *in vivo* des rendements quantiques suffisants pour être détectés avec un instrument compatible avec un usage clinique, figurent les flavines, le NADH, certaines protéines (collagène, élastine), le tryptophane...

Le tableau 1.5 recense les longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission des principaux fluorophores endogènes et chromophores (absorption uniquement) des tissus biologiques, sachant que les bandes totales d'absorption et d'émission sont relativement larges (de l'ordre d'une centaine de nm).

La figure 1.16 représente les spectres d'excitation et d'émission mesurés pour différents fluorophores montrant notamment la largeur de leurs bandes spectrales.

TAB. 1.5 – Pics de longueurs d’onde d’excitation λ_{exc} et d’émission λ_{em} des principaux chromophores et fluorophores endogènes des tissus biologiques mesurés par [Andersson-Engels and Wilson, 1992] et [Ramanujam, 2000].

Fluorophores endogènes	Maximum d’excitation (nm)	Maximum d’émission (nm)
Acides Aminés		
- Tryptophane		
[Andersson-Engels and Wilson, 1992]	275	350
[Ramanujam, 2000]	220, 280	350
Protéines fibreuses et élastiques		
- Collagène		
[Andersson-Engels and Wilson, 1992]	340, 285, 270	395, 310, 395
[Ramanujam, 2000]	325	400, 405
- Élastine		
[Andersson-Engels and Wilson, 1992]	460, 425, 360, 260	520, 490, 410, 410
[Ramanujam, 2000]	290, 325	340, 400
Enzymes et coenzymes		
- FAD, flavines		
[Andersson-Engels and Wilson, 1992]	440	520
[Ramanujam, 2000]	375 à 450	535
- NADH		
[Andersson-Engels and Wilson, 1992]	350	460
[Ramanujam, 2000]	260, 351	440, 460
- NADPH		
[Ramanujam, 2000]	336	464
Vitamines [Ramanujam, 2000]		
Vitamine A	327	510
Vitamine K	335	480
Vitamine D	390	480
Lipides [Ramanujam, 2000]		
Phospholipides	436	540, 560
Lipofuscine	340 - 395	430 - 460, 540
Céroïde	340 - 395	430 - 460, 540
Porphyrines		
[Andersson-Engels and Wilson, 1992]	400	610, 675
[Ramanujam, 2000]	400 - 450	630 - 690

FAD : Flavin Adenine Dinucleotide, NADH : reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen, NADPH : reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen.

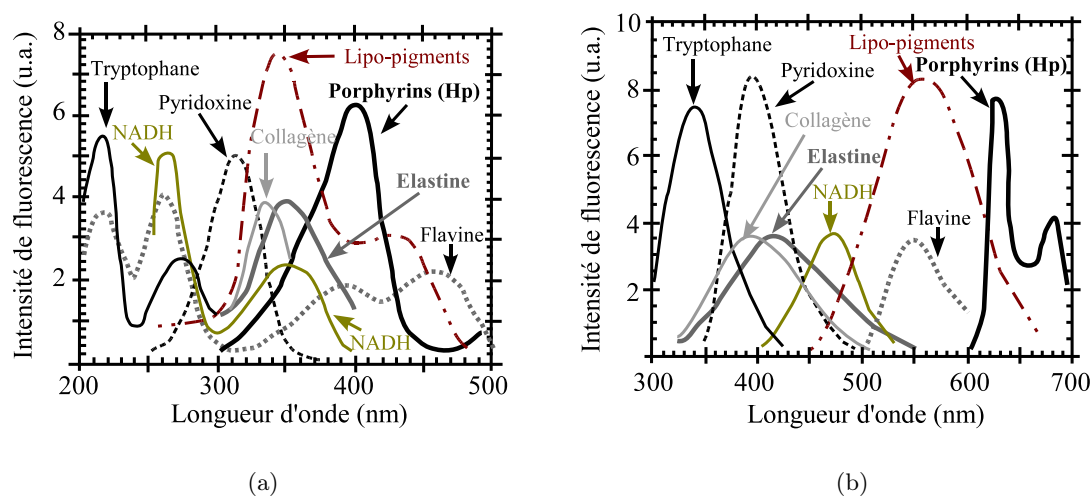


FIG. 1.16 – (a) Spectres d'absorption, (b) Spectres d'émission de quelques fluorophores endogènes (modifié de [Wagnieres *et al.*, 1998]).

1.3.4.2 Avantages et limites de cette méthode

La spectroscopie d'autofluorescence est plus souvent utilisée que les techniques exploitant les fluorophores exogènes, compte tenu des contraintes liées à l'utilisation de marqueurs en clinique (autorisation de mise sur le marché difficile 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.

Elle a l'avantage d'être une méthode non invasive et atraumatique. Par ailleurs, elle présente une grande sensibilité à la composition biochimique des tissus, en raison de sa résolution spectrale, ce qui permet de révéler *a priori* l'existence de tumeurs précoces et de fournir de nombreuses informations sur la constitution des échantillons étudiés. Pour traiter les spectres et décrypter leurs données informatives, il est nécessaire de mettre en œuvre des moyens mathématiques et statistiques efficaces [Eker *et al.*, 2001].

Les informations finales essentielles restent la sensibilité et la spécificité. Ainsi, les résultats des travaux les plus récents 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 [Bourg-Heckly *et al.*, 2000] [Heintzelman *et al.*, 2000] [Goujon *et al.*, 2003] [Palmer *et al.*, 2003b] [Svistun *et al.*, 2004]. Par ailleurs, 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 *et al.*, 2002], bien qu'il ne semble pas exister de différences significatives en termes de sensibilité et de spécificité pour les excitations à 337, 380 et 460 nm [Ramanujam *et al.*, 1996a]. En revanche, **les excitations aux environs de 300 nm ou 410 nm semblent être plus efficaces pour le diagnostic entre tissus sains et tissus dysplasiques *in vitro*** [Zheng *et al.*, 2003], **comme *in vivo* sur l'animal** [Skala *et al.*, 2004] **ou sur l'homme** [Kara *et al.*, 2004].

Paradoxalement, l'inconvénient de cette méthode provient de sa richesse d'information : le spectre d'autofluorescence fournit une information globale et il peut exister des pics dus à l'absorption, par certains chromophores, de la lumière émise par les fluorophores des tissus. L'interprétation quantitative des spectres, pour connaître les mécanismes à l'origine des modifications

lors de la cancérogénèse, est difficile et les critères de discrimination entre tissus sains et tumoraux sont déterminés de façon empirique.

1.3.4.3 Applications

De multiples applications de la spectroscopie de fluorescence existent, en particulier dans le domaine biomédical. De nombreux travaux traitent notamment de l'intérêt d'utiliser les spectres d'autofluorescence émis par les fluorophores endogènes des tissus biologiques, pour essayer d'extraire une information spécifique du type et de l'état du tissu analysé [Swartling *et al.*, 2005]. Ainsi, il existe des méthodes de spectrofluorimétrie destinées à discerner des tissus sains de tissus cancéreux [Panjehpour *et al.*, 2002], dans le but de diagnostiquer le plus tôt possible un site tumoral. 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 de tissus, des concentrations des fluorophores, de la structure et de la vascularisation des tissus qui varient suivant la nature saine ou tumorale desdits tissus [Ramanujam, 2000] [Kara *et al.*, 2004] [A'Amar and Bigio, 2006]. La littérature décrit l'application de la LIFS dans la détection du cancer de l'œsophage *in vivo* [Bourg-Heckly *et al.*, 2000], du cancer du col utérin *in vitro* [Drezek *et al.*, 2001], des cancers de la tête et du cou *in vivo* [Schantz *et al.*, 1998], du cancer gastrique (sensibilité 55%, spécificité 85%) [Mayinger *et al.*, 2004], de dysplasies de haut grade dans l'œsophage de Barrett [Niepsuj *et al.*, 2003], du cancer de l'ovaire [Brewer *et al.*, 2001] des lésions pré-cancéreuses gastro-intestinales [DaCosta *et al.*, 2002], du poumon [Hüttenberger *et al.*, 2005]... L'excitation de la fluorescence est effectuée dans le domaine proche UV ou bleu.

De même, dans le domaine cardio-vasculaire, la spectrométrie d'autofluorescence permet de différencier efficacement des artères saines d'artères athéromateuses [Filippidis *et al.*, 2000] car les constituants de la paroi artérielle, connus pour leurs propriétés mécaniques (collagène et élastine), sont aussi capables d'émettre un signal d'autofluorescence lors d'une excitation lumineuse appropriée [Richards-Kortum *et al.*, 1991].

[Canpolat and Mourant, 2000b] montrent la possibilité d'améliorer la précision des mesures de concentration de porphyrine par des mesures de fluorescence d'un fantôme (micro-sphères de polystyrène, diamètre 0,523 μm) et par la modélisation numérique. Pour obtenir la concentration du fluorophore dans le milieu, ils utilisent le rapport entre l'intensité de fluorescence à 663 nm (excitation à 442 nm) et l'intensité d'excitation rétrodiffusée, intensités acquises par la même fibre en fluorescence et en excitation rétrodiffusée. L'écart de ce rapport dans deux milieux différents, avec des coefficients de diffusion réduits (cf. définition dans le chapitre 3) de 11,7 et 17,5 cm^{-1} et avec la même concentration de porphyrine, ne dépasse pas 25%. Cet algorithme de correction permet de diminuer l'influence des propriétés diffusantes du tissu et augmente la précision des mesures de concentration. Mais cela n'est valable que si le rendement quantique de fluorescence ϕ est identique. Malheureusement, dans des conditions *in vivo*, ϕ dépend fortement de l'environnement dans lequel se trouve le fluorophore.

Par ailleurs, l'**analyse comparative** des spectres tissulaires permet de déterminer des indicateurs spectraux caractéristiques du type histologique du tissu. Plusieurs analyses sont possibles. Pour s'affranchir de la variation de la puissance de la source d'excitation, de la distance fibre d'excitation-tissus..., une première méthode consiste à normaliser les spectres par rapport à la mesure de fluorescence d'une solution de référence, mais l'interprétation des mesures d'intensité absolue est délicate. Une autre méthode consiste à discriminer les tissus sains des tissus

pathologiques en se fondant sur les variations des spectres. Classiquement, les spectres d'auto-fluorescence *in vivo* sont tout d'abord normalisés par rapport au pic de fluorescence et/ou à l'aire sous la courbe, puis des ratios d'intensité sont calculés (rapport d'intensité de fluorescence à deux longueurs d'ondes (ou plus) ou rapport d'intensité de fluorescence de deux bandes de longueurs d'onde différentes $\frac{I(\lambda_1)}{I(\lambda_2)}$ pour une longueur d'onde d'excitation donnée). Afin d'améliorer le rapport signal sur bruit, chaque spectre enregistré est la moyenne de 3 à 5 spectres acquis. La figure 1.17 montre que le rapport des intensités de fluorescence à 390 et 450nm, $\frac{I_{390nm}}{I_{450nm}}$, est un bon indicateur de la nature saine ou tumorale d'une muqueuse.

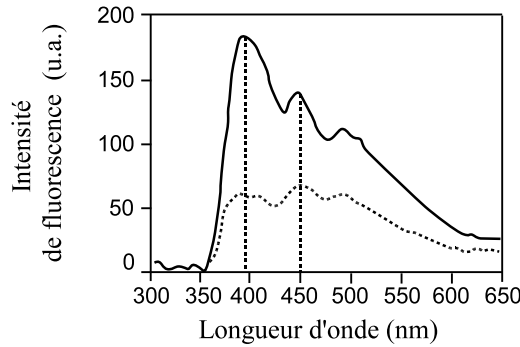


FIG. 1.17 – Spectres typiques d'autofluorescence chez un même patient d'une muqueuse œsophagienne normale (trait plein) et d'un carcinome épidermoïde intramuqueux (trait en pointillé) [Valette and Bourgh-Heckly, 2002]. Le rapport des intensités à 390 nm et 450 nm est un indicateur de la nature histologique du tissu.

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 conduisent à traiter un volume de données relativement important. Jusqu'à présent, les critères de différenciation étaient dans leur grande majorité fondés sur l'analyse statistique simple (tests de Student-Fischer par exemple) de ratios d'intensités à deux longueurs d'ondes choisies dans les spectres [Zheng *et al.*, 2003]. D'autres méthodes d'analyses statistiques et de classification permettent de définir des algorithmes de diagnostic différentiel (sain/pathologique). Il est ainsi possible d'utiliser des algorithmes de discrimination qui exploitent la totalité de l'information contenue dans le spectre et d'effectuer ensuite par exemple une analyse en composantes principales (ACP). Ainsi, dans [Ramanujam *et al.*, 1996b], après réduction dimensionnelle des données spectrales par ACP, un algorithme de classification fondé sur la discrimination logistique est mis en œuvre. Cet algorithme a été employé pour séparer les lésions intra-épithéliales épidermoïdes cervicales (SILs) des non-SILs avec une sensibilité de 82% et une spécificité de 68%, en utilisant des longueurs d'onde d'excitation à 337, 380 et 460 nm [Ramanujam *et al.*, 1996a]. Pour optimiser l'utilisation de méthodes optiques dans la détection de la maladie, il est important de comprendre et de quantifier l'information fournie par les signaux optiques détectés. Par exemple, de nouvelles méthodes et techniques existent afin de quantifier l'information recueillie. [Wu *et al.*, 1993] travaillent sur l'autofluorescence intrinsèque, c'est-à-dire l'autofluorescence corrigée de la dispersion et de l'absorption et ils présentent un modèle analytique fondé sur une image de migration de photon développée à partir des simulations de Monte Carlo.

Toutefois, comme nous l'avons souligné précédemment, 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). D'autre part, leur capacité de détection des différents stades d'évolution dysplasique n'est pas satisfaisante. En réponse à ces insuffisances, **deux approches complémentaires sont actuellement développées** [Drezek *et al.*, 2001] [Georgakoudi *et al.*, 2001] [Muller *et al.*, 2003] :

- la modélisation des interactions de la lumière avec les tissus (objet du chapitre 3) en vue d'identifier leurs propriétés optiques et remonter ainsi aux spectres intrinsèques des structures morphologiques [Zonios *et al.*, 1996] voire des constituants d'intérêt au sein des couches tissulaires considérées,
- l'exploitation et la combinaison de données spectrales issues d'autres modalités utilisables simultanément (spectroscopies de diffusion élastique, Raman) afin d'améliorer la spécificité de la mesure et ainsi l'efficacité du diagnostic (fusion de données).

1.3.5 Multi-modalités

Chacune des trois techniques spectroscopiques présentées précédemment a ses limites : elles sont différemment sensibles aux modifications de l'état du tissu biologique. Il apparaît donc logique de combiner différentes méthodes qui permettent de détecter ces différents changements dans le milieu. Par exemple, la combinaison de la LIFS (endogène) et de l'ESS permettrait théoriquement d'obtenir des informations à trois niveaux : sub-cellulaire/chimique (grâce à la LIFS), cellulaire et multi-cellulaire (grâce à l'ESS). Associer plusieurs modalités de spectroscopie améliore ainsi la fiabilité du diagnostic : meilleure spécificité, meilleure sensibilité.

Des études conjuguant différentes spectrométries – spectroscopies multi-modale – sont actuellement en cours [Georgakoudi *et al.*, 2002] [Muller *et al.*, 2003] (tableau 1.4). En effectuant des relevés spectraux simultanés et en corrélant les différents types de données, on arrive alors à augmenter le degré de différenciation entre des tissus biologiques de différentes natures [Bigio and Mourant, 1997] [Georgakoudi *et al.*, 2001].

Porteuses d'informations respectivement sur la nature biochimique et le métabolisme du tissu d'une part et sur la structure du tissu et les dimensions de ses constituants cellulaires d'autre part, la complémentarité des spectroscopies d'autofluorescence et de diffusion élastique a été démontrée par des études sur la modification des tissus due à la cryoconservation [Cilesiz and Welch, 1994] [Péry *et al.*, 2005], sur le cancer du sein [Palmer *et al.*, 2003a], sur le diagnostic des mélanomes [A'Amar and Bigio, 2006]...

[Lin *et al.*, 2000] rapportent la possibilité de distinguer des variations entre les tissus tumoraux et les tissus sains de cerveau *in vitro* en utilisant les différences entre l'intensité de l'autofluorescence à 460 nm (laser nitrogène, excitation 337 nm) et les différences de spectres de réflectance diffuse entre 650 et 800 nm avec une sensibilité de 96% et une spécificité de 93%. Ils proposent un algorithme empirique de traitement de données, fondé sur l'analyse du ratio entre l'intensité de fluorescence et la réflectance diffuse à la longueur d'onde d'excitation de 460 nm et l'intensité de réflectance diffuse à 625 nm. Ils utilisent cette même technique *in vivo* pour différencier les tumeurs infiltrantes du tissu normal, avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 76% [Lin *et al.*, 2001].

Dans le cas de l'utilisation de la LIFS *in vivo*, l'intensité du spectre de fluorescence dépend de

plusieurs facteurs : de la concentration en fluorophore, de la géométrie d'acquisition des mesures et des propriétés diffusantes et absorbantes du tissu à la longueur d'onde d'émission et d'excitation. Par ailleurs, la forme du spectre de fluorescence peut être perturbée par l'absorption du milieu. En général, le spectre d'absorption de ce milieu n'est pas connu *a priori* [Ramanujam, 2000]. Pour interpréter correctement les résultats obtenus par la LIFS, il faut donc prendre en compte les propriétés absorbantes et diffusantes du milieu sur le site étudié. Si les propriétés optiques du milieu sont connues, les spectres de fluorescence peuvent être corrigés et la concentration de fluorophore peut être estimée. Sans la connaissance de ces propriétés optiques, l'estimation de la concentration en fluorophore est compliquée [Canpolat and Mourant, 2000b]. Or, cette connaissance *a priori* des propriétés optiques du milieu est souvent difficile, voire impossible. Une solution à ce problème consiste à mesurer simultanément les spectres de fluorescence et de réflectance diffuse et à corriger les spectres de fluorescence en utilisant l'information apportée par les données de réflectance diffuse.

[Georgakoudi *et al.*, 2002] utilisent un système tri-modal (« TMS ») pour différencier des lésions intra-épithéliales épidermoïdes cervicales (SILs) des non-SILs. Ils couplent l'autofluorescence (LIFS), la diffusion simple (DRS) et multiple (LSS). Leur appareil permet d'enregistrer, dans un temps d'acquisition inférieur à la seconde, les spectres d'autofluorescence avec onze longueurs d'onde d'excitation entre 337 et 650 nm et les spectres de réflectance diffuse et d'ESS dans la bande spectrale 350 - 700 nm. Pour produire les différentes longueurs d'onde d'excitation, un laser azote (excitation à 337 nm) excite successivement 10 colorants différents à grande vitesse ; ce qui permet d'obtenir une émission monochromatique pour onze longueurs d'onde. La réflectance diffuse permet d'enregistrer et d'analyser séparément les photons rétrodiffusés, soit par diffusion multiple, soit par diffusion simple. Les auteurs utilisent le terme « *elastic scattering spectra* » pour définir la technique permettant d'analyser les photons qui sont réfléchis à la surface du tissu correspondant à un seul événement de diffusion. D'autres équipes appartenant au laboratoire national de Los Alamos considèrent les spectres de diffusion « *elastic scattering spectra* » comme la résultante de diffusions multiples. En LIFS, ils obtiennent une sensibilité de 62% et une spécificité de 92% ; en DRS, ils obtiennent une sensibilité de 62% et une spécificité de 82% ; en LSS, la sensibilité est de 77% et la spécificité de 83%. Enfin, en TMS, la sensibilité est de 92% et la spécificité de 90%. La combinaison des trois techniques permet donc d'obtenir de meilleurs résultats dans le cas des cancers du col de l'utérus.

[Palmer *et al.*, 2003b] et [Breslin *et al.*, 2004] utilisent la combinaison de la LIFS à plusieurs longueurs d'onde d'excitation et la méthode de réflectance diffuse pour distinguer des tissus bénins et malins de sein *in vitro*. Les mesures d'autofluorescence ont été effectuées entre 310 et 600 nm avec une excitation dans l'intervalle 300 - 460 nm (par pas de 20 nm). Les spectres de réflectance diffuse sont enregistrés entre 300 et 600 nm. Ces chercheurs ont utilisé l'approche diagnostique en analysant les formes des spectres à l'aide d'algorithmes de type SVM (« *support vector machine* » ou machine à support vectoriel) et d'ACP [Palmer *et al.*, 2003b] [Breslin *et al.*, 2004]. [Palmer *et al.*, 2003b] ont obtenu une sensibilité et une spécificité pour l'ESS plus faible que pour la LIFS avec excitation à plusieurs longueurs d'onde (70% et 92% versus 30% et 78%) : l'application combinée des deux méthodes n'améliore pas, dans cette étude, la qualité du diagnostic.

Enfin, [Chang *et al.*, 2005] combinent l'autofluorescence ($Se = 86\%$, $Sp = 89\%$) et la réflectance ($Se = 74\%$, $Sp = 89\%$) pour détecter les lésions pré-cancéreuses cervicales *in vivo* : ils constatent une amélioration de la spécificité mais surtout de la sensibilité de la méthode diag-

nostique : $Se = 87\%$, $Sp = 91\%$.

Ainsi, dans la littérature, le diagnostic est effectué à partir des données obtenues par la combinaison de différentes techniques spectroscopiques. A partir des résultats des multiples travaux que nous venons d'évoquer et dans un souci d'optimiser le diagnostic, notre recherche se propose de combiner la spectroscopie d'autofluorescence et de réflectance diffuse.

1.4 Conclusion du chapitre et organisation des chapitres suivants

La première partie de ce chapitre a présenté les aspects physiologiques et médicaux concernant le cancer et les tissus épithéliaux ainsi que les méthodes optiques de diagnostic existantes. La deuxième partie a précisé la problématique scientifique, associée à la fois aux phénomènes photo-physiques et au traitement des signaux générés. La troisième partie a rappelé le principe, les avantages et les inconvénients et les applications des trois principales méthodes de spectroscopie *in vivo*. Le caractère multidisciplinaire de ces travaux nécessitera donc d'investiguer en parallèle les problèmes liés à l'instrumentation, au traitement des données et à la modélisation des phénomènes bio-mécaniques et optiques.

Le chapitre 2 développe les différents points relatifs à l'instrumentation. A partir de l'analyse des caractéristiques des outils existant au laboratoire en début de thèse (fin 2003), nous définissons les caractéristiques d'une nouvelle instrumentation adaptée à notre problématique et à nos besoins. Nous présentons notamment l'étude de différentes solutions technologiques menant au développement d'un prototype et à la mise en œuvre d'un système couplant la spectroscopie de diffusion élastique à la spectrométrie de fluorescence.

Le chapitre 3 expose les travaux de modélisation statistique réalisés pour simuler la propagation des photons dans les tissus et identifier leurs propriétés optiques *in vivo*. Nous présentons notamment les caractéristiques de l'algorithme développé spécifiquement pour notre application (à partir du programme de base de [Prahl *et al.*, 1989] [Wang *et al.*, 1995] [Jacques and Prahl, 1998]) et la procédure mise en place pour implémenter la fluorescence dans la simulation : l'algorithme développé est validé sur la base des résultats obtenus sur différents fantômes de tests.

Les chapitres 4 et 5 concernent respectivement les travaux expérimentaux réalisés *ex vivo* puis *in vivo*.

Une première étude *ex vivo* est réalisée sur des échantillons de tissus artériels avant et après cryoconservation à différents allongements mécaniques (intérêt par rapport au collagène et à l'élastine). En parallèle, nous avons travaillé à la recherche de critères de choix d'un modèle animal adapté aux besoins des essais envisagés.

Une deuxième étude est réalisée sur un modèle de tumeurs de vessie de rats *in vivo*.

Pour chacun de ces chapitres, nous présentons le contexte et les objectifs spécifiques de l'étude, les matériels et méthodes utilisés, enfin, les résultats obtenus.

2

Instrumentation

Ce chapitre présente l'étude réalisée et les réflexions menées sur le développement d'un nouveau dispositif « portable », utilisable pour des essais en clinique. Les étapes à franchir avant le développement de ce nouvel appareil sont le test et la validation des outils existant en relation avec notre problématique scientifique énoncée dans le chapitre 1, section 1.2.3.1. C'est pourquoi ce chapitre commence par une présentation des appareils existant au laboratoire et utilisés lors de l'étude vasculaire *ex vivo* effectuée au cours de la première année de thèse : il s'agit d'un appareil de spectroscopie de fluorescence et d'une maquette de diffusion élastique. Ensuite, nous décrirons les améliorations à apporter et justifierons le développement d'un nouveau système adapté à notre problématique et capable de détecter les changements tissulaires de fluorescence et de diffusion élastique dans le processus de la transformation cancéreuse. Compte tenu du temps de conception de ce nouveau système, des difficultés techniques et technologiques rencontrées, nos choix ont évolué vers une autre solution technique, laquelle pourra permettre à terme de réaliser un appareil intégré portable. Néanmoins, l'étude réalisée nous a permis de préciser les critères de choix du nouveau système finalement mis en place et utilisé pour notre étude sur les tumeurs de vessie de rats *in vivo*. Les éléments de ce système sont décrits en fin de ce chapitre.

2.1 Instrumentation existante utilisée

2.1.1 Spectrofluorimètre portable

Historiquement, pour recueillir des spectres d'intensité de fluorescence, les chercheurs du laboratoire utilisaient le spectromètre Jobin Yvon CP200 (Fig. 2.1) [A'Amar, 1997]. Constitué d'un réseau holographique concave fixe (200 mm de largeur, 200 traits/mm), il est réglé à une longueur d'onde centrale de 495 nm et couvre une région spectrale de 190 nm à 820 nm, avec une résolution CCD de 0,54 nm. Ce spectromètre possède une matrice CCD standard en silicium de (1152×298) pixels (26×6,7 mm), laquelle est refroidie par un conteneur d'azote liquide de 2,8 L qui permet, en abaissant la température jusqu'à -140°C, d'augmenter le rapport signal sur bruit et par conséquent, d'obtenir un signal de meilleure qualité.

Cependant, dans un souci de miniaturisation, d'ergonomie et de modernisation, un spectrofluorimètre portable fibré a été développé, au sein du laboratoire IMAC (Instrumentation Médicale Automatisée en Cancérologie, CAV) sous la responsabilité du Docteur J. Didelon (Fig. 2.2). Nous avons utilisé cet appareil pour les expériences sur les artères car il permet d'exciter des

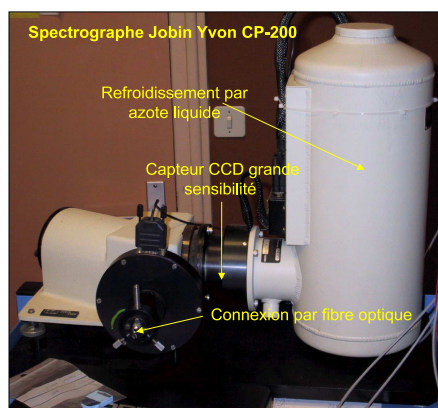
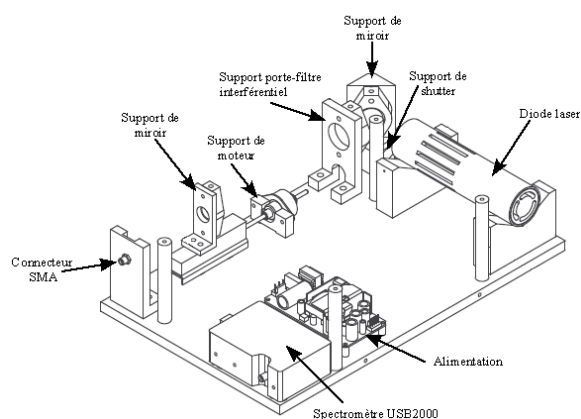


FIG. 2.1 – Spectromètre Jobin Yvon CP200.

fluorophores endogènes et de recueillir des spectres d'intensité de fluorescence *in vivo* [Padilla Ybarra, 1999] [Abbaci, 2003] [Conrard and Goebel, 2003].



(a)



(b)

FIG. 2.2 – Spectrofluorimètre portable (a) Photo, (b) Schéma de principe (modifié de [Conrard and Goebel, 2003]).

Ce spectrofluorimètre portable est constitué (Fig. 2.2) :

- d'un spectromètre USB2000 (Ocean Optics, France) de bande spectrale : 300 - 900 nm par pas de 2 nm et de résolution CCD $\approx 0,32$ nm,
- d'une source d'excitation de type diode laser de longueur d'onde centrale (410 ± 5) nm avec une puissance maximale de 25 mW (Laser 2000, France),
- d'un obturateur pour le faisceau laser,
- d'un moteur pas à pas linéaire permettant de modifier la puissance d'éclairement de la fibre optique en défocalisant l'injection du faisceau lumineux dans la fibre,
- d'un système de focalisation constitué d'une lentille de focalisation biconvexe en BK-7 de distance focale 75,6 mm montée sur un support en aluminium et sur une glissière à bille, système déplacé par le moteur pas à pas linéaire,
- d'un système miroir (miroir circulaire en Zerodur) afin de réaliser un renvoi d'angle du faisceau laser dans la lentille de focalisation,

- d'un système de filtrage interférentiel (filtre passe-bande interférentiel de largeur à mi-hauteur de 10 nm, centrée sur 410 nm) qui supprime les perturbations spectrales dues à la diode laser,
- d'un capteur à trois fibres optiques,
- d'une alimentation pour les différentes cartes électroniques et les ventilateurs,
- d'un ordinateur pour l'acquisition des spectres et le contrôle du système de déplacement.

Le faisceau laser est injecté à travers une sonde optique, composée de trois fibres silice/silice UV (SEDI®) de type saut d'indice (multimodal, ouverture numérique⁵ $ON=0,22 \pm 0,02$) montées en Y :

- une fibre « centrale » de 550 μm de diamètre de cœur pour l'excitation (HCG-550-08, SEDI),
- deux fibres de 200 μm (HCG-M0200T-08, SEDI) de diamètre de cœur situées à une distance d'axe en axe de 0,5 mm de la fibre d'excitation, une fibre allant de la fibre d'excitation vers le spectromètre et une autre, de la fibre d'excitation vers le puissancemètre.

Grâce à sa composition en silice/silice, la sonde optique est stérilisable : elle permet donc les expériences *in vivo*. Les trois fibres sont regroupées dans une gaine de protection flexible de diamètre 2,2 mm et disposées en triangle à l'extrémité distale. A l'extrémité proximale, chaque fibre et sa gaine sont libres. Chaque embout de fibre est doté d'un connecteur SMA-905.

La *source de lumière* excite le tissu à travers la fibre optique d'excitation (E) du capteur ; les deux autres fibres captent la lumière rétrodiffusée et la fluorescence tissulaire (Fig. 2.3). La fibre (R) transmet la lumière vers le puissancemètre, l'autre fibre (F) transmet la lumière vers le spectromètre muni d'un filtre d'émission et couplé à un logiciel d'acquisition et de traitement des spectres. Le puissancemètre est calibré à la longueur d'onde d'excitation pour mesurer la lumière de rétrodiffusion.

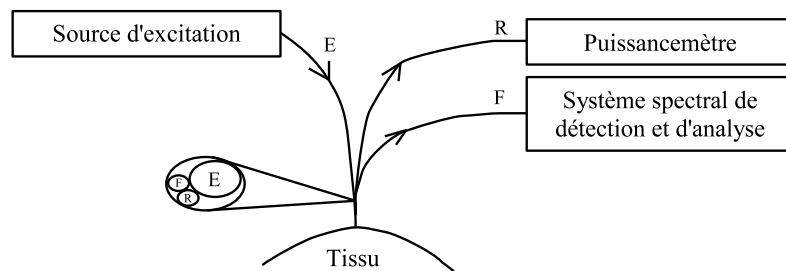


FIG. 2.3 – Système expérimental de spectroscopie de fluorescence. E : excitation, R : rétrodiffusion, F : fluorescence.

⁵Angle maximum que doit faire le faisceau pour assurer sa propagation dans la fibre optique :
Ouverture Numérique = $\sin \theta_0$

2.1.2 Maquette de diffusion élastique

La maquette de spectroscopie de diffusion élastique résolue dans l'espace ou DRS, réalisée par V. Chalau au cours de sa thèse, permet de mesurer l'intensité de lumière rétrodiffusée à deux distances [Chalau, 2004].

Cette maquette est constituée (Fig. 2.4) :

- d'un spectromètre USB2000 (Ocean Optics, France) de bande spectrale : 300 - 900 nm par pas de 2 nm et de résolution CCD $\approx 0,32$ nm,
- d'une source de lumière dans le rouge (600 - 800 nm) à base de diodes électroluminescentes (DELs),
- d'un capteur à fibres optiques disposant d'une fibre de réception et de 2×3 fibres d'excitation (diamètre de cœur : 200 μm , $\text{ON}=0,22$), disposées en arc de cercle autour de la fibre de réception : 3 fibres à une distance de 0,53 mm (canal 1) et 3 autres à 1,74 mm (canal 2) ; chaque canal ayant sa propre source de lumière,
- de l'électronique de régulation des sources et d'acquisition du signal,
- de l'interface utilisateur et des traitements informatiques associés.

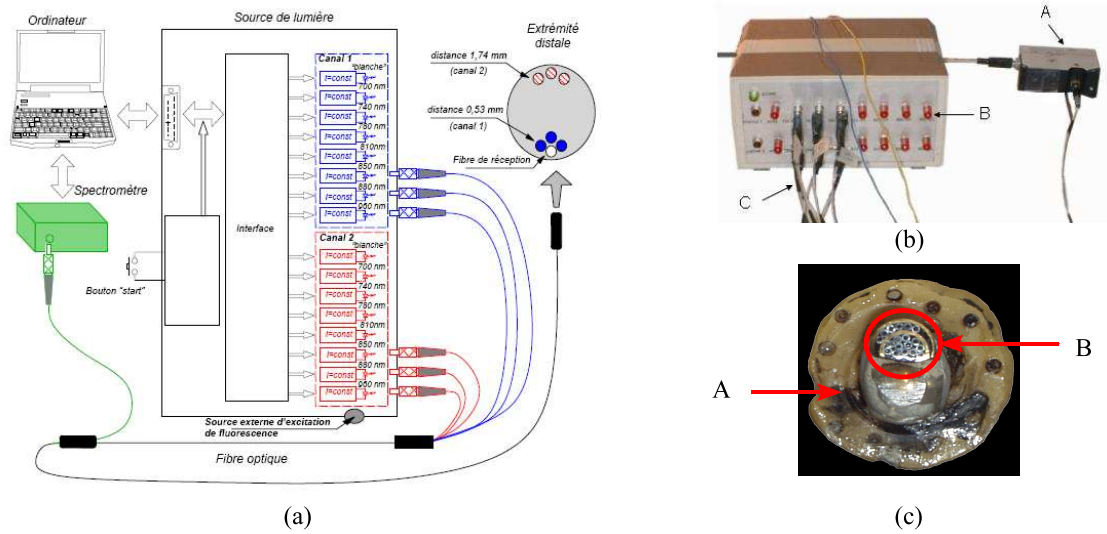


FIG. 2.4 – (a) Schéma de la maquette de spectroscopie de diffusion élastique réalisée par [Chalau, 2004], (b) Photo de la maquette : A spectromètre, B source lumineuse, C fibres du capteur, (c) Extrémité distale du capteur : A résine de type Araldite, B fibres d'excitation et de réception.

La *source de lumière* est donc composée de DELs, réparties sur deux canaux différents comportant chacun 8 DELs identiques. Pour chaque mesure, nous pouvons choisir une à trois DELs parmi les huit mais nous devons sélectionner les mêmes sur les deux canaux ; chacune est placée juste derrière les connecteurs SMA et leurs extrémités sont usinées pour permettre à la lumière d'entrer directement dans la fibre. La lumière est injectée dans les six fibres optiques d'excitation jusqu'à l'extrémité de la sonde, en contact direct avec le tissu à étudier ; elle pénètre dans le tissu, s'y propage, puis est recueillie par la fibre de réception, laquelle est reliée au spectromètre, ce qui permet de mesurer le spectre émis.

2.1.3 Justification du besoin d'un nouveau développement instrumental

Les résultats obtenus lors de la thèse de [Chalau, 2004] avec cette instrumentation ont montré plusieurs éléments intéressants mais ont aussi mis à jour la nécessité d'améliorer certains points. Globalement, les réponses spectrales obtenues dans le proche infrarouge ont permis de montrer *in vivo* sur des rats des différences significatives entre les spectres de diffusion recueillis sur la peau saine et ceux recueillis sur la peau avec des tumeurs transplantées sous-cutanées, visibles à l'œil nu.

La mise en œuvre de cette maquette, dans le cadre d'une première étude sur tissus artériels, nous a conduit à évoluer vers un prototype mieux adapté à nos besoins, prenant en compte les améliorations nécessaires pour résoudre les problèmes suivants :

- la source d'excitation en lumière blanche n'est pas unique et n'est pas composite en un point,
- les distances entre la source de lumière et la fibre de réception du capteur à fibres optiques sont au nombre de deux (0,53 mm et 1,74 mm),
- la sonde fibrée ne peut pas être utilisée en endoscopie puisqu'elle n'est pas stérilisable, son diamètre interne (6,5 mm) est trop élevé tout comme son diamètre externe (11,8 mm),
- la source d'excitation de la fluorescence est réalisée via une source externe à la sonde : il n'y a pas de colocalisation des spectres d'autofluorescence et de diffusion élastique.

Le tableau 2.1 présente les évolutions souhaitées entre la maquette existante de diffusion élastique et le prototype à réaliser.

TAB. 2.1 – Evolutions souhaitées entre la maquette existante et le nouveau prototype de diffusion élastique.

	Maquette	Prototype
Source d'excitation en « lumière blanche »	2×3 entrées distinctes	unique et composite en 1 point
Excitation fluorescence / diffusion élastique	chemin différent	chemin identique (travail sur les mêmes sites géométriques)
Distance possible entre la source de lumière et la fibre de réception	2	de 20 à plusieurs centaines (selon les combinaisons proposées)
Résolution spatiale et sensibilité de la sonde fibrée	2 points	une vingtaine de points
Gamme spectrale	600 - 800 nm	380 - 940 nm
Résolution spectrale (fente : 100 μm)	8 nm	0,5 à 3 nm

Cette évolution pose des contraintes techniques et technologiques aussi bien pour la source d'excitation et son mode d'injection dans une fibre que pour la sonde fibrée et ses caractéristiques physiques et géométriques et pour la partie spectrométrique et l'acquisition de plusieurs spectres simultanément.

2.2 Étude de différentes solutions technologiques et caractéristiques du système mis en place au laboratoire

2.2.1 Objectifs, originalités et verrous techniques

La figure 2.5 présente les trois points originaux du système sur lesquels nous allons travailler : le système multi-excitation, le capteur à fibres optiques et le système de réception. Ce système sera utilisé lors de nos expériences sur les tumeurs de vessie de rats.

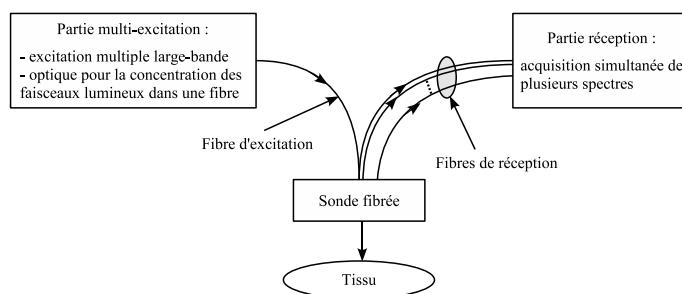


FIG. 2.5 – Schéma fonctionnel du système proposé.

La **sonde fibrée existante** ne recueille la lumière qu'en un seul point de l'espace. L'idéal serait de pouvoir la recueillir en plusieurs points, ce qui permettrait de sonder différentes profondeurs et d'effectuer une analyse comparative des spectres recueillis en ces différents endroits. Cela permettrait également de définir une distance optimale de détection selon le type de tumeur et sa profondeur de pénétration.

Il nous faut donc concevoir et sous-traiter la fabrication d'un nouveau capteur à fibres optiques adapté à nos travaux, possédant un maximum de fibres optiques dans un diamètre de 2 mm (pour un meilleur échantillonnage spatial et une application endoscopique) et permettant de sélectionner les distances entre excitation et réception du signal (spectroscopie résolue spatialement).

La **partie multi-excitation** doit permettre d'injecter, dans une ou plusieurs fibres optiques, différentes sources de lumière, voire de composer son propre spectre. Il faut donc rechercher :

- des solutions techniques et technologiques pour la focalisation du flux lumineux dans le cœur d'une seule fibre optique (diamètre de cœur : 200 μm),
- une solution optique avec un seul jeu de DELs : la maquette utilisée précédemment comprenait deux canaux de DELs (redondance et intensités différentes).

Pour obtenir un système expérimental modulable, la **source d'excitation** doit permettre de fournir différentes bandes de longueurs d'onde d'excitation.

La **partie réception** doit pouvoir acquérir n spectres (n fibres selon le capteur) dans un temps compatible avec la mesure *in vivo*. Deux voies ont été envisagées :

- un système mono-spectrométrie avec une commutation rapide en entrée,
- un système avec spectrométrie multi-voies.

La **partie multi-excitation/réception** doit recueillir deux types de spectre : l'autofluorescence et la réflectance diffuse. Pour la spectroscopie d'autofluorescence, il est nécessaire d'exciter le tissu à l'aide d'un faisceau lumineux à bande étroite (quelques nm). Pour la spectroscopie de

réflectance diffuse, nous avons besoin d'un faisceau lumineux à large bande spectrale (plusieurs centaines de nm) compris entre 380 et 940 nm, offrant la possibilité de régler la largeur de la bande spectrale et la position de la longueur d'onde centrale de ce faisceau.

2.2.2 Solutions technologiques envisagées, testées et retenues

2.2.2.1 Sonde à fibres optiques

Les sondes à fibres optiques sont des éléments clés pour la spectroscopie biomédicale. Elles peuvent affecter la propagation de la lumière dans le tissu, le rendement total de photons collectés par rapport au nombre total de photons injectés, le rapport signal sur bruit, ce qui influence la valeur diagnostique des techniques spectroscopiques. Plusieurs éléments doivent être pris en compte avant de construire la sonde : l'ouverture numérique de la fibre, le diamètre des fibres, les distances inter-fibres, le nombre de fibres par sonde, la géométrie de la sonde, la distance sonde-tissu (DST ou « PTD : probe to target distance »), la distance source-détecteur (DSD)...

Les paragraphes qui suivent présentent quelques études réalisées sur les caractéristiques des capteurs à fibres optiques selon la spectroscopie utilisée.

Spectroscopie de fluorescence :

En spectroscopie de fluorescence, [Pfefer *et al.*, 2001] montrent qu'en augmentant le diamètre de la fibre ou la distance fibre-tissu, le libre parcours moyen des photons augmente et le volume de tissu exploré est plus profond et plus homogène. Augmenter l'ouverture numérique entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence sans affecter significativement le libre parcours moyen des photons de fluorescence, sous réserve que l'ouverture numérique soit inférieure à 0,8 [Pfefer *et al.*, 2002] [Pfefer *et al.*, 2004].

L'article de [Liu and Ramanujam, 2002] souligne les relations entre la profondeur sondée de tissu dans un milieu turbide et la fluorescence mesurée grâce à un capteur à fibres optiques de diamètre variable. Lorsque les zones d'illumination et de réception se chevauchent, le diamètre variable de ces zones est relié à la profondeur qu'il est possible d'atteindre dans un milieu turbide. En s'appuyant sur des simulations de Monte Carlo, les auteurs démontrent que la fluorescence mesurée en utilisant les ouvertures de recouvrement d'excitation et de réception avec les diamètres variables peut être associée à l'épaisseur de la région fluorescente à observer (région dysplasique) dans un milieu turbide (tissu épithélial).

Par ailleurs, la géométrie de la sonde à fibres optiques utilisée influence, non seulement l'intensité de fluorescence détectée, mais aussi la profondeur de « sondage » du tissu [Papaioannou *et al.*, 2003]. Les études précédentes de modélisation ont souvent étudié la propagation de la lumière fluorescente en utilisant les géométries standard des sondes. Des résultats de simulation Monte Carlo montrent que la fluorescence détectée est sensiblement plus élevée pour des géométries de sondes à ouverture numérique variable. La profondeur sondée de tissu, quant à elle, est sensiblement plus grande pour les sondes avec plusieurs distances entre les fibres d'excitation et de réception. Enfin, lorsque l'ouverture numérique de la sonde à ouverture numérique variable ou de la sonde multi-distances augmente de 0,22 à 0,37, l'intensité de fluorescence augmente significativement [Zhu *et al.*, 2003].

Spectroscopie de réflectance :

[Myakov *et al.*, 2002] présentent la conception et la construction d'une sonde à fibres optiques pour la spectroscopie de réflectance polarisée *in vivo* (excitation polarisée, détection sensible à la polarisation). Deux éléments doivent être pris en compte avant de construire la sonde : l'ouverture numérique de la fibre et les distances inter-fibres. Ces éléments doivent être réglés de façon judicieuse, pour éviter de collecter les réflexions de Fresnel entre la couche protectrice en silice des fibres optiques et le tissu. Les distances faibles entre les fibres d'excitation et de réception minimisent la collecte de la lumière multi-diffusée et maximisent la collecte de la lumière diffusée une seule fois dans la couche épithéliale [Bigio and Mourant, 1997].

[Papaioannou *et al.*, 2004] étudient, expérimentalement à 337 nm et par simulation Monte Carlo, les effets de la géométrie des sondes et des distances entre la sonde et le tissu sur la réflectance diffuse collectée avec trois types de sondes différentes. Le but de cette étude est d'optimiser la spectroscopie de fluorescence et la décroissance du signal de fluorescence recueilli en fonction de la distance sonde-tissu et en fonction de trois géométries de sondes différentes (une fibre unique et deux multi-fibres, ON=0,22). Les sondes utilisées sont :

- P₁ : une fibre unique (diamètre de cœur 600 μm), permettant, grâce à un miroir semi-réfléchissant dichroïque, de passer de l'excitation à la réception,
- P₂ : une fibre centrale d'excitation (diamètre de cœur 600 μm), entourée de 18 fibres de réception (diamètre de cœur 200 μm). La distance source-détecteur (DSD) est de 0,64 mm,
- P₃ : une zone centrale d'excitation composée de 24 fibres compactes (200 μm de diamètre de cœur chacune, diamètre d'illumination : 1,4 mm) et 24 fibres périphériques (200 μm de diamètre de cœur chacune) formant le réseau de réception. DSD : 1 mm.

En faisant varier la distance sonde-tissu, le maximum d'intensité de la lumière réfléchie est mesuré à une distance plus courte pour P₂ (3,1 mm) que pour P₃ (4,7 mm). Comme les deux ouvertures numériques des fibres optiques sont les mêmes, ces observations sont une conséquence directe de leurs différentes DSD (0,64 vs 1 mm). Les photons collectés par une sonde avec une distance source-détecteur grande vont plus loin que les photons collectés par une sonde avec une faible distance source-détecteur. Ainsi, la lumière collectée est moindre et l'efficacité d'une telle sonde (avec une large DSD) plus faible. Lorsqu'une fibre unique (fibre P₁) est utilisée comme fibre d'excitation et de réception, on note une décroissance exponentielle de l'intensité récoltée à partir du contact avec le tissu.

Il en résulte que la distance sonde-tissu, le « design » de la sonde et les propriétés optiques des tissus modifient la propagation de la lumière dans le tissu, la capacité de la sonde à capter la lumière et la profondeur sondée de tissu. Il est donc nécessaire d'optimiser les caractéristiques des sondes à fibres optiques utilisées lors des spectroscopies.

Spectroscopie multi-modale :

L'étude de [Liu *et al.*, 2003] compare des résultats de simulation de Monte Carlo et des mesures faites sur des fantômes grâce à trois géométries différentes de sonde (Fig. 2.6). Les simulations et les expériences ont été effectuées pour évaluer l'effet des coefficients d'absorption et de diffusion sur les spectres de fluorescence et de réflectance diffuse dans un milieu turbide dans la bande spectrale UV-visible. Les résultats montrent que la fluorescence et la réflectance diffuse diminuent avec une augmentation du coefficient d'absorption et de la distance entre les fibres d'illumination et celles de réception (augmentation de l'atténuation de la lumière d'excitation et de réception dans le milieu). En revanche, la fluorescence et la réflectance diffuse augmentent graduellement

avec le coefficient de diffusion. L'augmentation du coefficient de diffusion élargit probablement la distribution de la lumière d'excitation et de fluorescence dans le volume du tissu. Ainsi, les photons d'excitation et les photons de fluorescence sont plus probablement détectés par les fibres de réception éloignées au fur et à mesure de l'accroissement du coefficient de diffusion.

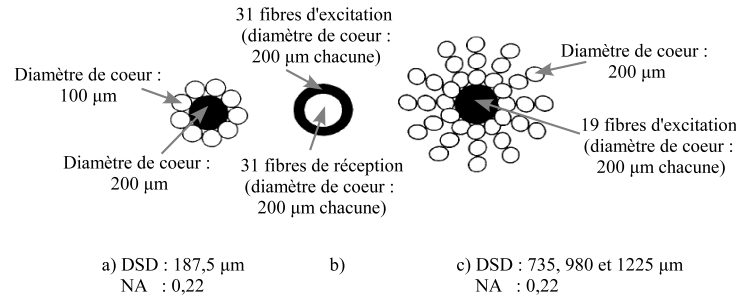


FIG. 2.6 – Vue en coupe des extrémités communes de trois sondes de fibres optiques utilisées (diamètre extérieur inférieur à 3 mm) pour mesurer la fluorescence des fantômes de tissu et la réflectance diffuse [Liu *et al.*, 2003]. Les disques noirs représentent l'excitation (lampe Xénon 450 W pour les sondes a) et c) et 150 W pour la sonde b)) et les disques blancs correspondent aux fibres de réception.

[Utzinger and Richards-Kortum, 2003] décrivent très précisément les caractéristiques des différentes sondes à fibres optiques existant dans la littérature pour les spectroscopies Raman, les spectroscopies de réflectance diffuse, de réflectance polarisée et de fluorescence ainsi que pour des spectroscopies combinées (réflectance diffuse et fluorescence).

La majorité des sondes à fibres optiques qui mesurent des profils de **réflectance** possèdent un diamètre approximatif de 2 cm et l'hypothèse est faite que, pour des diamètres inférieurs ou égaux à 2 cm, les propriétés optiques ne changent pas. Cependant, les propriétés optiques des surfaces des cibles actuellement étudiées (col de l'utérus, ovaires, cavité buccale) varient de quelques millimètres (taille de la lésion). Par conséquent, une mesure précise des propriétés optiques de petites lésions ou de lésions pré-cancéreuses requièrent d'autres approches pour surmonter les limitations de la théorie de la diffusion, notamment des approches hybrides associant la théorie de la diffusion et les simulations de Monte Carlo : cela permet d'anticiper les profils de réflectance sur plusieurs distances entre les fibres d'excitation et de réception. Nous présenterons la théorie de la diffusion et les simulations de Monte Carlo dans le chapitre 3.

La figure 2.7(a) présente une sonde permettant de collecter en un seul point les données correspondant aux mesures en réflectance. Une entretoise tubulaire a été placée devant le faisceau de fibres optiques pour réduire la réflectance spéculaire au cours du trajet de détection. La lumière réfléchi à l'interface verre-tissu est absorbée par les côtés de l'entretoise. Si l'angle de l'entretoise est plus grand que le cône d'acceptance de la fibre (c'est-à-dire supérieur à 9° pour une ouverture numérique de 0,22), la lumière réfléchi spéculairement à l'arrière du faisceau de fibres l'atteindra avec un angle qui ne sera pas envoyé au détecteur. Ces sondes peuvent être utilisées pour discriminer les tissus sains et pathologiques *in vivo* pour les vessies [Koenig *et al.*, 1998a], l'œsophage [Wallace *et al.*, 2000], les ovaires [Utzinger *et al.*, 2001a], les seins [Bigio *et al.*, 2000] ou la peau [Lynn *et al.*, 1993].

Une sonde de fluorescence à fibres optiques comprend au minimum une fibre d'excitation et une fibre de réception (Fig. 2.7(b)). Cette sonde a été utilisée pour la détection pré-cancéreuse du col de l'utérus [Ramanujam *et al.*, 1996a].

La sonde, présentée Fig. 2.7(c), est composée de 21 fibres optiques (diamètre : $200\ \mu\text{m}$, $\text{ON}=0,2$) organisées en bundles concentriques. Le bundle central contient sept fibres d'excitation de fluorescence et douze fibres de réception de fluorescence. Cette sonde permet de mesurer à la fois la fluorescence et la réflectance : autant d'informations complémentaires qui augmentent la valeur du diagnostic [Durkin, 1995].

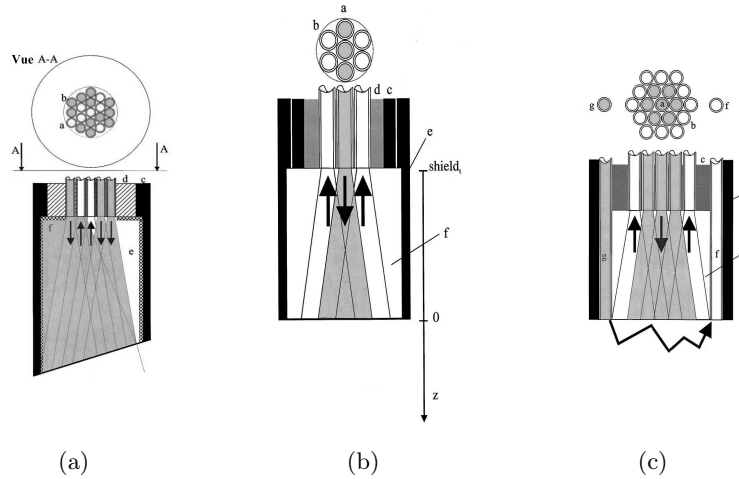


FIG. 2.7 – Sonde classique à fibres optiques (a) pour des **mesures en réflectance** en un seul point. Les fibres, agencées de façon hexagonale, sont aléatoirement assignées pour la réception (étiquette a) ou pour l'excitation (étiquette b). Une enveloppe externe (étiquette c) assemble le faisceau de fibres (étiquette d) avec une cale d'espacement (étiquette e). Un enduit absorbant (étiquette f) basé sur de la poudre de carbone ou sur une peinture noire absorbe la lumière réfléchiée spéculairement sur l'interface tissu-verre. (b) pour la **spectroscopie de fluorescence** basée sur deux fibres ou plus. L'emballage hexagonal est un arrangement dense qui permet le choix des fibres multiples pour différentes sources d'excitation et canaux de réception. Un bouclier de quartz permet le chevauchement des surfaces d'excitation et de réception. Les pièces incluent a) les fibres d'excitation, b) les fibres de réception, c) enveloppe, d) colle au carbone ou epoxy faiblement fluorescent, e) « douille » et f) « bouclier ». (c) pour la **combinaison des mesures en réflectance et en fluorescence** : la lumière blanche diffusée par le volume est évaluée pendant les mesures de fluorescence. La sonde à fibres optiques est composée de : a) fibres d'excitation, b) fibres de réception de la fluorescence, c) colle au carbone, d) enveloppe externe, e) bouclier en quartz, f) fibres de réception de la réflectance et g) fibres d'excitation en lumière blanche [Uttinger and Richards-Kortum, 2003].

L'étude de ces travaux sur la réalisation et les caractéristiques des sondes à fibres optiques a guidé notre réflexion lors de la conception de notre sonde. La sonde utilisée lors des expériences sur les artères ne permet de recueillir la lumière qu'en un seul point de l'espace. Pour augmenter la sensibilité des techniques de diffusion élastique et d'auto fluorescence, l'idéal est de pouvoir recueillir la lumière en plusieurs points, ce qui permet de sonder différentes profondeurs et d'effectuer ainsi une analyse comparative des spectres recueillis en ces différents endroits. Par ailleurs, l'application endoscopique souhaitée pose une contrainte supplémentaire au niveau de la taille du nouveau capteur : le diamètre extérieur du capteur ne doit pas excéder 2 à 3 mm, pour être compatible avec la plupart des endoscopes.

Sonde réalisée :

Notre choix s'est porté sur une sonde dont la disposition spatiale des fibres optiques de réception permettra de placer, dans une gaine de 2 mm de diamètre, un maximum de fibres optiques afin de disposer d'un maximum de combinaisons lors du recueil des signaux lumineux, pour aboutir à une organisation hexagonale des fibres (Fig. 2.8). La fibre d'excitation pourrait être choisie parmi l'une des six fibres situées à l'extrémité du capteur (fibres foncées). Ainsi, nous pourrions obtenir de plus grandes distances entre cette fibre d'excitation et toute autre fibre de réception. Avec la sonde à fibres optiques présentée, la distance minimale entre deux cœurs de fibre serait de 0,255 mm et la distance maximale de 1,53 mm.

La réalisation d'une sonde composée de 37 fibres optiques montées dans une seule gaine a été sous-traitée à la société SEDI (fibres silice/silice, ON=0,22). Cependant, la réalisation technologique (organisation hexagonale) diffère sensiblement du schéma souhaité, à cause de la difficulté technique (Fig. 2.8) : la distribution géométrique est plutôt circulaire alors que nous avons souhaité une organisation hexagonale (Fig. 2.9).

Il a donc été nécessaire de localiser précisément le centre de chaque fibre et leurs coordonnées relatives. Nous avons alors effectué une numérotation de chaque fibre pour mieux les identifier (Fig. 2.9) et développé un programme informatique qui donne automatiquement les distances entre les fibres d'excitation et les fibres de réception choisies (annexe A).

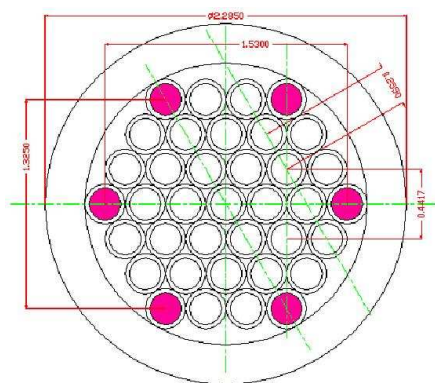


FIG. 2.8 – Schéma de la disposition souhaitée des fibres ; vue de l'extrémité distale du capteur (distance en mm).

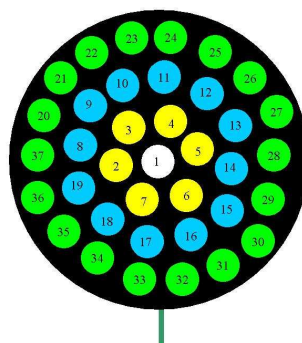


FIG. 2.9 – Image de la disposition réelle des cœurs des fibres numérotées du capteur réalisé (photos prises au microscope).

Contrairement à l'ancienne sonde à fibres optiques, la nouvelle sonde est stérilisable et peut suivre le même processus de décontamination que les endoscopes souples.

2.2.2.2 Partie multi-excitation

Les difficultés et les points forts du système multi-excitation résident dans la génération de la lumière et dans l'injection de celle-ci dans le cœur d'une seule fibre optique.

Excitation multiple large-bande :

Compte tenu des larges spectres d'excitation des fluorophores endogènes, un choix judicieux des longueurs d'onde d'excitation peut permettre d'améliorer la sensibilité et la spécificité d'une technique de spectroscopie [De Veld *et al.*, 2005] .

Notre premier choix s'est porté sur des DELs utilisées dans la maquette précédente et offrant :

- un large panel de longueur d'onde couvrant l'ensemble du domaine spectral proche UV - visible - proche IR,
- la possibilité d'intégrer des filtres passe-bandes spécifiques à chacune des sources DELs,
- l'association de plusieurs DELs de même longueur d'onde d'émission pour augmenter la puissance de lumière injectée dans une seule fibre optique,
- des associations de différentes longueurs d'onde de lumière injectées successivement ou simultanément,
- une durée de vie importante, une consommation électrique et un coût faibles par rapport aux lampes traditionnelles,
- une portabilité renforcée par le faible échauffement des sources et une fragilité diminuée par rapport aux sources de lumière de type Xénon, Halogène,...

Il s'agit ainsi de concevoir un module d'excitation permettant d'exciter les tissus humains à partir d'une source lumineuse provenant de 16 DELs classiques et de générer de la fluorescence par l'intégration de DELs de forte puissance. Cette partie comprend deux sous-ensembles que nous allons détailler par la suite : le support des DELs et l'injection de la lumière dans le cœur d'une seule fibre optique de 200 μm de diamètre. Il s'agit donc d'étudier la distribution spatiale de la lumière provenant de différentes sources lumineuses et sa focalisation dans une fibre optique.

Pour couvrir de façon optimale une bande spectrale allant du proche UV (380 nm) au proche infrarouge (940 nm), nous avons sélectionné les DELs en tenant compte de l'angle d'ouverture de la lumière sortant de chacune d'elles et de la puissance lumineuse émise (2 DELs blanches et 14 DELs ayant un pic d'émission à 380, 405, 450, 470, 525, 591, 625, 660, 700, 740, 780, 810, 880 et 940 nm) et au moins une diode laser (UV) de forte puissance pour la fluorescence.

Ainsi, à l'aide d'une carte USB I/O24 et d'un programme informatique adéquat, nous pouvons commander les sources lumineuses, choisir les longueurs d'onde souhaitées et composer dynamiquement notre propre spectre d'excitation lumineuse (Fig. 2.10).

Suite aux difficultés rencontrées pour réaliser l'injection de la lumière dans le cœur d'une fibre optique (voir ci-après), nous avons choisi d'utiliser des sources lumineuses disponibles dans le commerce pour générer l'excitation voulue (lampe Deutérium-Halogène – spectre large-bande – pour la diffusion élastique et diode laser – (410 ± 5) nm – pour l'auto fluorescence).

Injection de la lumière :

Plusieurs solutions technologiques ont été envisagées en ce qui concerne l'injection de la lumière de plusieurs DELs (faisceau non collimaté en sortie de DELs) dans une seule fibre de

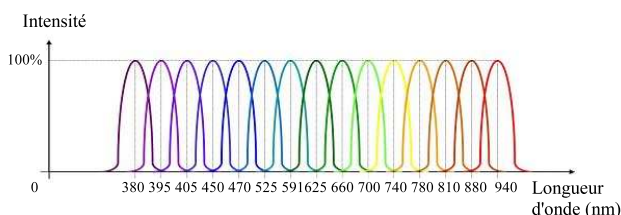
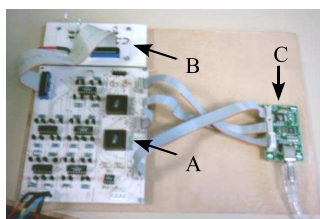
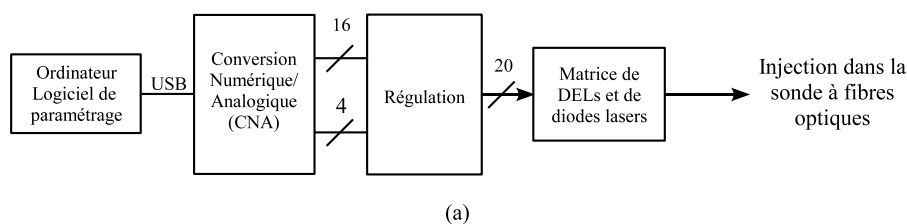


FIG. 2.10 – (a) Schéma fonctionnel, (b) Maquette de la solution à DELs : A carte électronique de régulation, B carte de positionnement des DELs et des diodes lasers, C carte USB I/O24, (c) Exemple de spectre composite théorique.

200 μm de diamètre de cœur, avec une puissance suffisante [Grandidier and Morhain, 2004]. Nous avons réalisé à ce titre deux pré-études permettant une grande dynamique d'utilisation et différentes combinaisons dans l'emploi des sources DELs.

La première solution envisagée consiste à concentrer des faisceaux grâce à un **couple de lentilles plan-convexes** réalisant la collimation du faisceau lumineux issu d'une DEL puis, la focalisation vers le cœur d'une fibre optique. Le choix des lentilles a été guidé par le calcul des distances focales, pour respecter l'ouverture numérique de la fibre optique. Le diamètre des lentilles a été choisi de façon à capter un maximum de lumière issue des DELs. La deuxième solution utilise un **miroir ellipsoïde de focalisation** pour chacun des 16 faisceaux de DELs (originalité technologique).

L'originalité du **premier système envisagé** de focalisation et de concentration des faisceaux est la distance entre le foyer optique de la lentille de focalisation et l'entrée de la fibre optique : en effet, il est important que le faisceau lumineux pénètre dans le cœur de la fibre avec un angle qui respecte son ouverture numérique de 0,22. Il est également nécessaire que le point de focalisation soit suffisamment petit, pour qu'un maximum de lumière puisse se propager dans le cœur de fibre de 200 μm .

En testant différentes combinaisons de lentilles et en respectant les distances focales (lentilles de diamètres et de distances focales identiques ou différentes), nous avons constaté que nous n'arrivions pas à obtenir un point de focalisation suffisamment précis et petit : nous obtenons une tache plus ou moins diffuse. Cette tache, correspondant en fait à l'image de la DEL à travers les lentilles et non à celle de la source émettrice, ne permet pas d'obtenir un point d'injection suffisamment petit par rapport à la contrainte dimensionnelle de 200 μm du cœur de fibre. En définitive, l'utilisation de lentilles ne nous permet pas d'avoir un point d'injection de 200 μm de diamètre ; par ailleurs, ce système génère des pertes lumineuses conséquentes (perte lumineuse allant de 63% à 82% selon les expériences réalisées : puissance lumineuse en sortie de la DEL de

610 μW et en sortie du jeu de lentilles : 222 à 108 μW).

Fort de ces observations et mesures, nous avons décidé d'enlever l'optique diffusante des DELs et d'associer à chaque DEL un **réflecteur ellipsoïde**. Il s'agissait alors de fabriquer un miroir de focalisation ellipsoïdale et de le placer autour de chaque DEL : la matière située devant la source émettrice de la DEL serait supprimée, dans un premier temps, pour préserver l'image de cette source ($\phi \approx 300 \mu\text{m}$). Chaque miroir ellipsoïde et sa DEL respective seraient placés sur un disque fixe. Chaque couple DEL-miroir ellipsoïde serait orienté de telle sorte que le point focal soit localisé à l'extrémité proximale de la fibre optique.

Différents tests ont été réalisés à l'aide d'un miroir de 50 mm de diamètre spécialement construit pour cette étude (Fig. 2.11) : il s'agit par exemple de la mesure de l'angle d'un faisceau laser réfléchi sur le miroir ellipsoïde, de la mesure de sa puissance lumineuse et de l'analyse de la distribution lumineuse des DELs.



FIG. 2.11 – Photos du concentrateur (échelle 5) : (a) Vue de profil, (b) Vue de face.

Le rendement optique d'injection de la lumière provenant de la source laser est de 0,8. C'est une valeur que nous pouvons considérer comme correcte, eu égard aux rendements généralement présentés dans la littérature technologique de faisceaux collimatés, puis focalisés à l'aide de lentilles de bonne qualité.

Pour que le projet soit mené à terme, la fabrication de ce couple miroir ellipsoïde-DEL nécessite une enveloppe budgétaire supérieure à 75 000 euros (MS Techniques - Pompey 54). Il demeure toutefois une incertitude : la fabrication ne peut se faire que par un procédé faisant appel à l'injection plastique. Or, bien que ce procédé soit connu pour la grande qualité des produits fabriqués, le principe d'injection de lumière avec le couple DEL-miroir ellipsoïdal, dans une fibre de diamètre de cœur de 200 à 500 μm nécessite de respecter au minimum des défauts d'aspect de surface de l'ordre de $\lambda/4$ (avec $\lambda \approx 630 \text{ nm}$). Le « pari » est, par conséquent, délicat puisqu'à ce jour, il n'est pas certain que le respect de ces tolérances puisse être obtenu avec un matériau plastique. Pour des raisons de confidentialité, puisque ce projet reste d'actualité (brevetable), nous ne développerons pas davantage le principe de focalisation par DELs étudié.

Compte tenu de l'exigence technique de conception des concentrateurs, de la précision à obtenir et du temps nécessaire aux tests de validité, nous avons travaillé en parallèle, sur une autre solution d'injection sélective de lumière dans les DELs constituée de lentilles et de filtres linéaires.

2.2.2.3 Système de réception

La difficulté est double : il s'agit d'étudier et de mettre en œuvre une solution technologique pour l'acquisition simultanée de plusieurs spectres (entre 10 et 30), avec une résolution de 0,5 à 3 nm, utilisant la sonde à fibres optiques présentée précédemment (section 2.2.2.1).

Plusieurs systèmes de réception ont été testés. Il font appel :

- à un spectromètre USB2000,
- ou à une technologie multi-points simultanée en spectroscopie fibrée,
- ou à un spectromètre multi-voies.

Premier système envisagé :

Il consiste en la réalisation d'un module de réception utilisant un spectromètre miniature USB2000 (bande spectrale : 350 - 850 nm, résolution CCD $\approx 0,32$ nm) composé de deux miroirs argent permettant d'améliorer la sensibilité du détecteur (réflectance supérieure à 95% dans la bande proche infra-rouge, visible). Ce premier système a l'avantage d'être de taille réduite, ce qui permet de réaliser un appareil portable. Il vise à pouvoir sélectionner les fibres de réception souhaitées et à les faire défiler devant le spectromètre. Mais, comme nous l'avons vu précédemment, le spectromètre USB2000 ne peut accueillir qu'une seule fibre de réception à la fois : il nous faut par conséquent trouver un système nous permettant de positionner les fibres de réception devant le spectromètre l'une après l'autre [Grandidier and Morhain, 2004].

Ce support de réception doit pouvoir :

- accueillir les 36 fibres de réception issues de la sonde à fibres optiques,
- acquérir les spectres des fibres une à une en permettant l'accès de l'ensemble de ces fibres au spectromètre.

Pour permettre le positionnement de chacune des 36 fibres de réception devant le spectromètre, le support doit être en mouvement. Nous avons alors envisagé et étudié deux types de solutions liées aux mouvements possibles :

- soit un *déplacement linéaire* du module de réception : une barrette sur laquelle serait connecté l'ensemble des 36 fibres optiques de réception, chacune se déplaçant de manière linéaire. Après réflexion, cette solution a été écartée compte tenu de l'encombrement du module, dû à la longueur et à l'amplitude du déplacement et compte tenu de la complexité de sa réalisation,
- soit un *déplacement circulaire* d'encombrement plus réduit : un support circulaire composé de trous, chacun dans l'axe d'un connecteur SMA. Des capteurs optiques et des capteurs de fin de course seraient utilisés pour assurer une initialisation et un repositionnement précis. Cependant, chaque connecteur étant suivi d'une fibre optique, le montage reste fragile et pour éviter une torsion ou toutes autres contraintes risquant d'endommager les fibres, il est souhaitable que le support de réception ne fasse pas plus d'un demi-tour dans chaque sens de rotation à partir du point de référence, ce qui nécessite l'ajout de deux capteurs de fin de courses diamétralement opposés sur le support.

Deux solutions technologiques ont été envisagées pour assurer la rotation du support de réception : un moteur pas à pas ou un moteur en courant continu.

Le moteur pas à pas ne permet pas de préciser le nombre de pas. Or, notre système nécessite un positionnement très précis de la fibre de réception (de l'ordre de quelques centièmes de mm). Par conséquent, nous avons décidé d'opter pour un moteur à courant continu avec un asservissement en position.

La figure 2.12 présente le schéma du système de réception qui permet de positionner la ou les fibre(s) de réception désirée(s) en face du spectromètre. Pour positionner de façon très précise la fibre de réception, nous nous proposons d'utiliser un électro-aimant dont la tige mobile viendrait s'emboîter dans des encoches situées au pourtour de la roue, assurant ainsi un positionnement mécanique fin et une grande stabilité pendant l'acquisition du spectre par le spectromètre.

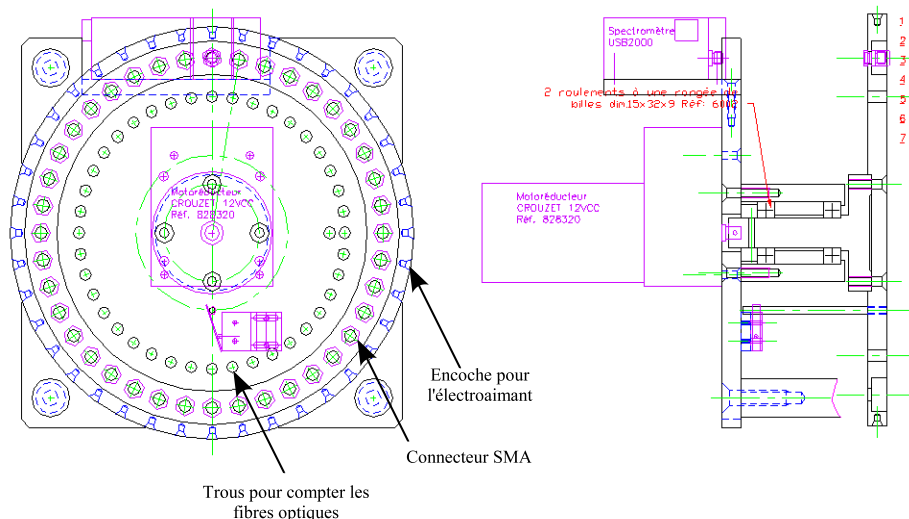


FIG. 2.12 – Schéma du module de réception, réalisé en partie sous Autocad.

Ce premier système envisagé pose un problème de temps d'acquisition des n spectres, temps supérieur à plusieurs secondes et non compatible avec des mesures *in vivo*.

Deuxième système envisagé :

Compte tenu du temps de développement, de réalisation et de validation du module de réception, nous avons également testé une **solution technique d'acquisition spectrale multi-points simultanée**, toujours avec l'idée de réaliser un appareil compact portable et d'acquérir rapidement plusieurs spectres à plusieurs distances entre la fibre d'excitation et les fibres de réception.

Le système composite testé est représenté Fig. 2.13. Il comprend :

- une caméra CCD (E²V 512x512 soit 8,19x8,19 mm², pixel : 16x16 μm^2) iXon DV887ECS-BV rétro-éclairée de la société Andor (Belfast, Irlande),
- un système de diffraction d'une ligne de lumière reliée au dispositif de détection.

Cette traversée est un « imSpector V10E OEM » de la société Spécim de Finlande (fente de 9,8 mm de longueur et de 50 μm de largeur) couplé à un bundle de 13 fibres en ligne (embouts SMA), de diamètre de cœur 200 μm . La gamme spectrale nominale se situe entre 400 et 1000 nm et la résolution spectrale nominale est de 6 nm.

Différentes expériences ont été réalisées : acquisition simultanée d'un à 13 spectres et acquisition de spectres d'autofluorescence de la paume de la main.

Pour l'acquisition simultanée d'un à 13 spectres, nous avons utilisé une source Hg(Ar) avec une fibre en acquisition. Nous remarquons qu'en mode image, lorsque nous diminuons le temps d'exposition sans modifier les autres paramètres, des traînées parasites apparaissent à la verticale

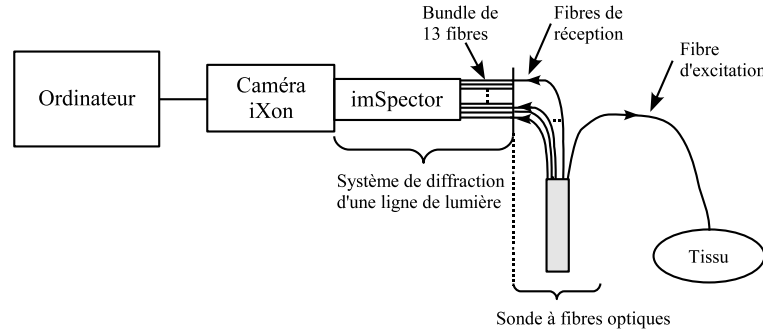


FIG. 2.13 – Schéma fonctionnel du système composite iXon-imSpector.

des pixels les plus intenses. Selon la société, il semblerait que ce « bruit » soit dû au décalage vertical des colonnes de pixels. Le même problème intervient également en mode multitrac (configuration en 13 bandes de dimension égale, seule une fibre est éclairée). Par ailleurs, un « bruit » vertical est présent sur les autres voies d'acquisition non éclairées (Fig. 2.14 (a) et (b)).

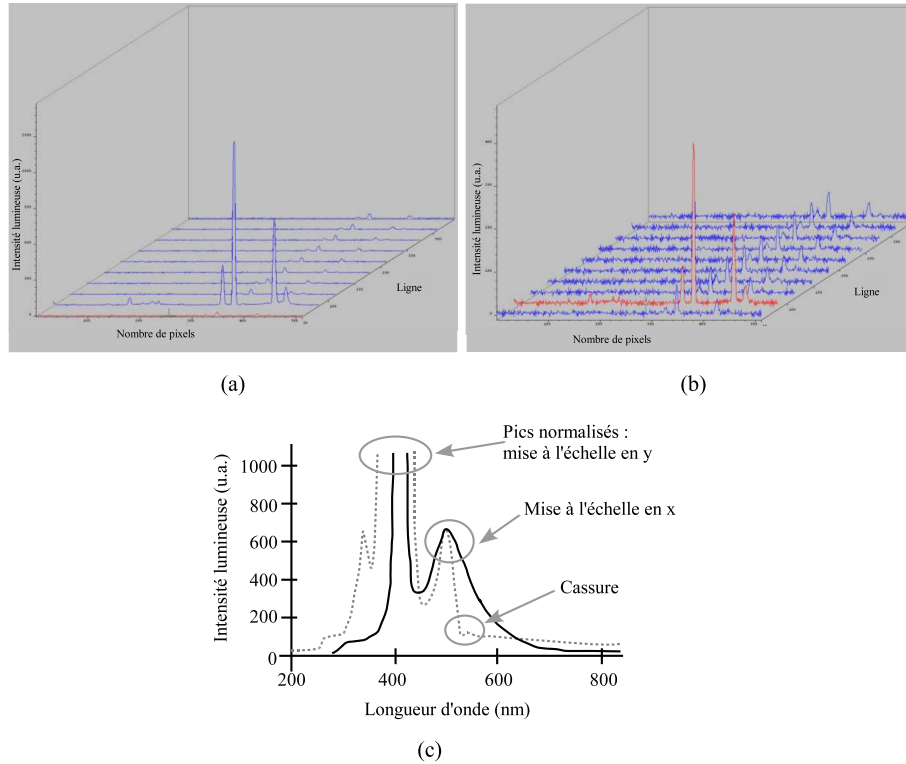


FIG. 2.14 – (a) Problème de « smearing », temps d'exposition (t_{exp}) : 1 ms, (b) t_{exp} : 0,1 ms, (c) Comparaison entre les spectres du système « imSpector + iXon » et du spectrofluorimètre.

Pour l'acquisition de *spectres d'auto fluorescence de la paume de la main*, nous avons utilisé un spectromètre de référence (pour ce type de mesures) : le spectrofluorimètre portable (sous-section 2.1.1). Le recueil de spectres d'auto fluorescence est réalisé à l'aide d'un capteur à fibres optiques connecté d'un côté, au système « caméra iXon + imSpector » et de l'autre, au spectrofluorimètre

portable. Aucun filtre d'excitation ni d'émission n'est utilisé sachant que nous devons pouvoir acquérir le spectre d'autofluorescence même en présence du pic de rétrodiffusion. Le temps d'exposition est alors réglé de telle sorte que le pic sature légèrement le CCD. Nous observons des artefacts autour du pic d'excitation et des artefacts « harmoniques » inexpliqués par la société. Sur la figure 2.14 (c), nous remarquons une différence significative de pente décroissante au-delà de 500 nm, confirmée par une mise à l'échelle de la courbe « caméra iXon+ imSpector » à savoir un décalage et une normalisation par rapport au pic d'autofluorescence. Les réponses en autofluorescence ne sont pas les mêmes pour les deux systèmes : la décroissance de la courbe de fluorescence entre 500 et 650 nm est beaucoup plus rapide avec ce système qu'avec le spectrofluorimètre portable. Aucune méthode de calibrage n'est proposée... Les essais n'étant donc pas concluants (problèmes de « smearing », de calibrage, de temps d'acquisition et de sensibilité : pas de détection d'autofluorescence de la paume de la main), nous nous sommes tournés vers des solutions plus classiques, notamment les **systèmes spectrographes imageant multi-voies**.

Troisième système envisagé :

Après étude des produits commercialisés, nous avons retenu le spectromètre « iHR 320 » d'HORIBA Jobin Yvon (Courcouronnes, France), basée sur un spectrographe imageant de configuration Czerny-Turner avec une adaptation spécifique permettant une entrée multi-fibrée pour acquérir simultanément 13 spectres (13 sites différents) en un seul « tir ». Le système est composé :

- d'une caméra CCD back-illuminated sensible dans l'UV (« Symphony 2048x512 Cryogenic Back Illuminated UV Sensitive CCD Detector »),
- d'un spectrographe « iHR 320 », muni de 3 réseaux de diffraction permettant de couvrir plusieurs bandes de longueurs d'onde :
 - un réseau de diffraction holographique blazé à 500 nm - 1 200 traits/mm,
 - un réseau plan blazé à 500 nm - 150 traits/mm,
 - un réseau plan blazé à 750 nm - 600 traits/mm.
- d'un bundle d'entrée de 15 fibres optiques dont 13 seront utilisées simultanément,
- d'une roue à 6 filtres à l'émission (1 filtre à quartz pour les mesures en réflectance diffuse et 5 filtres pour les mesures en autofluorescence : 385, 400, 435, 455 et 475 nm),
- d'un ensemble de détection et d'un logiciel pilotant l'ensemble (Synergy).

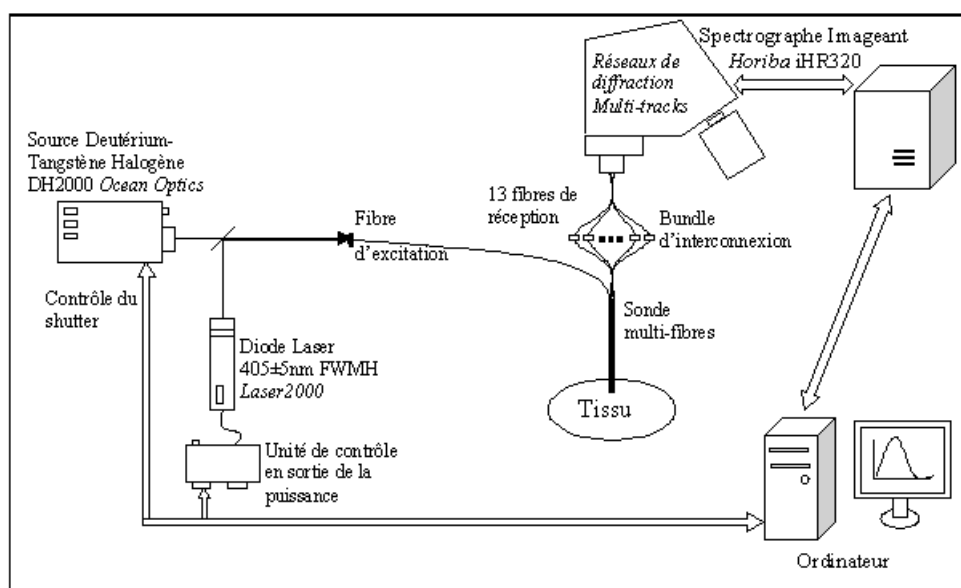


FIG. 2.15 – Schéma de principe du système mis en œuvre pour l’expérience, système constitué de : deux sources de lumière (lampe Deutérium-Halogène et diode laser), une sonde multi-fibres, un bundle de fibres optiques et un spectrographe imageant.

2.3 Conclusion et perspectives

La solution instrumentale finalement mise en œuvre pour l’étude *in vivo* comporte (Fig. 2.15) :

- deux sources de lumière :
 - une lampe Deutérium-Halogène pour la diffusion élastique : 380 - 940 nm,
 - une diode laser pour l’excitation de fluorescence : (410 ± 5) nm.
- une sonde possédant 37 fibres optiques à différentes distances les unes des autres (cf. annexe A),
- un spectrographe imageant (gamme spectrale : 350 - 940 nm, résolution : 2 nm) permettant, grâce à une adaptation spécifique, l’acquisition simultanée de 13 spectres d’intensité émis par le tissu.

Nous avons donc optimisé les sources d’excitation. En effet, la source d’excitation en lumière blanche est unique et composite en un point et la source d’excitation de la fluorescence n’est plus réalisée via une source externe à la sonde : les excitations de fluorescence et de diffusion élastique suivent le même chemin.

Par ailleurs, la résolution spectrale est améliorée : de 8 nm pour la maquette de diffusion élastique et pour le spectrofluorimètre portable, nous avons aujourd’hui un système avec une résolution spectrale de 2 nm (calcul réalisé avec une fente de $100 \mu\text{m}$). Enfin, la sonde multi-fibres réalisée est stérilisable.

L'originalité de notre système réside dans la modularité des combinaisons géométriques entre les fibres de réception (la distance entre les fibres d'excitation et de réception ainsi que la géométrie optimale des fibres de réception peuvent ainsi être étudiées) et dans l'acquisition simultanée de 13 spectres.

Des travaux sont en cours pour faire évoluer le dispositif existant et réaliser un système programmable/automatique d'excitation multiple de fluorescence et de diffusion élastique.

3

Modélisation statistique

CE chapitre rassemble les éléments théoriques fondamentaux liés aux phénomènes d'absorption et de diffusion impliqués dans les interactions entre la lumière et les tissus biologiques, indépendamment des effets physiologiques qui en découlent.

Sont d'abord présentés les phénomènes d'absorption et de diffusion et les grandeurs qui les caractérisent à partir des descriptions ondulatoire (équations de Maxwell) et énergétique (équation de transfert radiatif) de la lumière.

Ensuite, afin de caractériser les propriétés optiques des tissus testés lors de nos expérimentations (chapitres 4 et 5), nous expliquons ici l'approche choisie en simulation statistique pour modéliser les interactions lumière-tissus biologiques et nous décrivons l'algorithme développé au laboratoire. La validation du fonctionnement du programme développé est réalisée sur plusieurs fantômes synthétiques.

3.1 Interactions lumière-tissus

3.1.1 Caractéristiques des tissus biologiques

3.1.1.1 Photons balistiques vs photons serpentiles vs photons multidiffusés

Les tissus biologiques constituent des milieux de physiologie et de composition biochimique et anatomique complexes ; ces caractéristiques évoluant notamment avec le temps et les pathologies. Compte tenu de la taille et de l'organisation des éléments cellulaires et structuraux des tissus (quelques dizaines de nanomètres à quelques centaines de micromètres), ces derniers représentent des milieux turbides au sein desquels interviennent de nombreux processus photophysiques. Dans le domaine allant de l'UV (UltraViolet) au proche IR (InfraRouge), les mécanismes les plus importants sont l'absorption, la réflexion, les diffusions élastique et inélastique et la photoluminescence (fluorescence, phosphorescence). Ils sont la base de nombreuses méthodes d'imagerie microscopiques et macroscopiques et de spectroscopies qui visent à caractériser un milieu à partir de l'analyse (spectrale) des rayonnements émis par celui-ci, en réponse à une excitation lumineuse appropriée (chapitre 1, sections 1.1.3.4 et 1.3). Les grandeurs utilisées pour décrire ces phénomènes sont définies dans les paragraphes qui suivent.

A la traversée d'un milieu diffusant non absorbant, trois catégories de photons sont classiquement définies [Moneron *et al.*, 2005] :

- les *photons balistiques* : les moins nombreux. Ils se propagent sans être diffusés, donc en ligne droite dans un milieu homogène. Ils ressortent les premiers du tissu,
- les *photons serpentiles* : ils sont peu diffusés, c'est-à-dire qu'ils sortent peu décalés temporellement et gardent une trajectoire voisine de celle des photons balistiques. Ils se propagent de façon assez proche de la trajectoire balistique et peuvent encore être utilisés pour l'imagerie,
- les *photons multidiffusés* : la majorité des photons. Parcourant une distance beaucoup plus grande dans le tissu, ils en ressortent avec un retard significatif comparé aux photons balistiques. Ils ont perdu la « mémoire » de leur direction initiale mais leur cheminement aléatoire dans tout le tissu peut être exploité.

Selon les techniques ou les approches considérées (temporelles, spatiales ou fréquentielles), il peut être plus ou moins intéressant ou facile de travailler avec les photons balistiques ou avec les photons multidiffusés, ces derniers faisant l'objet de nos travaux (rétrodiffusion/réflectance). Ces techniques sont alors classées en fonction des photons « qu'elles utilisent » et qui conditionnent les épaisseurs limites qu'elles permettent d'atteindre [Selb, 2002].

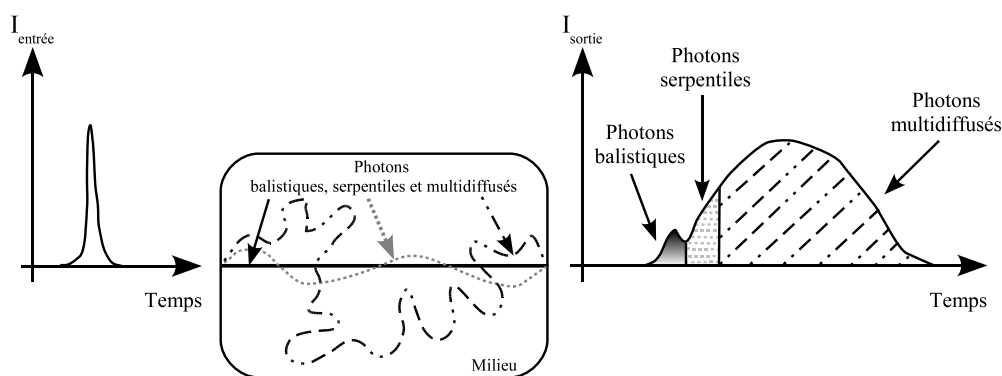


FIG. 3.1 – Schéma illustrant la définition des photons balistiques, serpentiles et multidiffusés (schéma modifié de [Selb, 2002]).

3.1.1.2 Hypothèses sur la nature des milieux

Les tissus biologiques sont à la fois inhomogènes microscopiquement (organites cellulaires, noyaux, membranes, matrices extra-cellulaires...) et macroscopiquement (stratifications, vaisseaux sanguins...).

Ces différents degrés d'inhomogénéité ne peuvent être pris en compte actuellement, à cause de la complexité de mise en œuvre et l'hypothèse habituellement faite est que les tissus biologiques étudiés peuvent être considérés comme des milieux stratifiés et continus, c'est-à-dire des milieux dont les propriétés optiques autorisent l'utilisation d'outils mathématiques applicables aux fonctions continues et/ou dérivables.

Des hypothèses supplémentaires sont classiquement posées. Les tissus biologiques sont des milieux :

- homogènes : leurs propriétés sont les mêmes en tout point d'une même couche,
- isotropes : leurs propriétés ne dépendent pas du repère dans lequel elles sont observées ou mesurées.

3.1.2 Théorie électromagnétique

Pour plus de détails sur les développements de la théorie électromagnétique présentés ci-après, le lecteur pourra se référer aux ouvrages de [Bruhat, 1992] [Elliott, 1993] [Olivier, 1996] [Verdier, 2000] [Jackson, 2001] [Bohren and Huffman, 2004].

3.1.2.1 Relations fondamentales : équations de Maxwell

Les équations de Maxwell ou équations de Maxwell-Lorentz, lois fondamentales de la physique, servent de base à l'électromagnétisme et à l'équation de transfert radiatif (ETR), équation décrivant le transport énergétique dans un milieu (absorbant et diffusant) et qui sera développée section 3.2.1. Pour des milieux continus, ces équations s'écrivent :

$$\left\{ \begin{array}{ll} \vec{\nabla} \cdot \vec{D} = \text{div} \vec{D} = \rho & \text{Équation de Maxwell-Gauss} \\ \vec{\nabla} \cdot \vec{B} = \text{div} \vec{B} = 0 & \text{Équation de conservation du flux} \\ \vec{\nabla} \wedge \vec{E} = \overrightarrow{\text{rot}} \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} & \text{Équation de Maxwell-Faraday} \\ \vec{\nabla} \wedge \vec{H} = \overrightarrow{\text{rot}} \vec{H} = \vec{J} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} & \text{Équation de Maxwell-Ampère} \end{array} \right. \quad (3.1)$$

avec :

- $\vec{E}$, $\vec{H}$ champs électrique et magnétique,
- $\vec{D}$, $\vec{B}$ densités de flux électrique et magnétique ou champs d'induction électrique et magnétique,
- $\vec{J}$ densité de courant,
- ρ densité volumique de charge électrique.

Si le milieu est soumis à un champ électro-magnétique permanent, $\vec{D}$ et $\vec{H}$ sont définis par :

$$\left\{ \begin{array}{l} \vec{D} = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P}_E \\ \vec{H} = \frac{\vec{B}}{\mu_0} - \vec{M} \end{array} \right. \quad (3.2)$$

$\vec{P}_E$ est la polarisation électrique (moment dipolaire électrique moyen par unité de volume), $\vec{M}$ l'intensité magnétique (moment dipolaire magnétique moyen par unité de volume), μ_0 et ε_0 la perméabilité magnétique et la permittivité électrique (F/m) dans le vide.

Pour déterminer l'absorption et la diffusion des ondes électromagnétiques par des particules, les équations de Maxwell sont complétées par des *relations constitutives*.

3.1.2.2 Relations constitutives liées aux caractéristiques physiques du milieu

Les relations constitutives liées aux caractéristiques physiques du milieu (linéarité, homogénéité, isotropie, diélectricité...) sont de la forme [Bohren and Huffman, 2004] :

$$\left\{ \begin{array}{l} \vec{J} = \sigma \cdot \vec{E} \\ \vec{B} = \mu \cdot \vec{H} \\ \vec{P}_E = \varepsilon_0 \cdot \chi \cdot \vec{E} \end{array} \right. \quad \text{Équations constitutives} \quad (3.3)$$

σ désigne la conductivité (S/m), μ la perméabilité magnétique du matériau dans lequel se propage l'onde (H/m) et χ la susceptibilité électrique (sans dimension). Les coefficients σ , μ et χ dépendent du milieu considéré mais ils sont supposés, pour un grand nombre de matériaux, indépendants des champs (milieu linéaire), de la position (milieu homogène) et de la direction (milieu isotrope).

Dans un milieu diélectrique (tissus biologiques), $\sigma = 0$, donc $\vec{J} = \sigma \cdot \vec{E} = \vec{0}$

En négligeant les effets de polarisation électrique, dans un milieu isotrope et linéaire, $\vec{D}$ et $\vec{B}$ peuvent s'écrire comme suit :

$$\left\{ \begin{array}{l} \vec{D} = \varepsilon \cdot \vec{E} \\ \vec{B} = \mu \cdot \vec{H} \end{array} \right. \quad (3.4)$$

Par ailleurs, on a les équations suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l} \varepsilon_r = \frac{\varepsilon}{\varepsilon_0} = n^2 \quad \text{et} \quad \varepsilon_0 \mu_0 c^2 = 1 \\ \mu_r = \frac{\mu}{\mu_0} \quad \text{avec} \quad \mu_r = 1 \quad \text{pour un milieu non magnétique} \\ n = \frac{c}{v} = \sqrt{\varepsilon_r \mu_r} \approx \sqrt{\varepsilon_r} \quad \text{dans le cas où} \quad \mu_r \approx 1 \end{array} \right. \quad (3.5)$$

μ_r et ε_r désignent la perméabilité magnétique et la permittivité électrique relatives et n l'indice de réfraction qui sera défini par la suite.

Ainsi, dans un milieu sans charge électrique et sans courant, les équations (3.1) deviennent :

$$\left\{ \begin{array}{l} \vec{\nabla} \wedge \vec{E} = -\mu \cdot \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \\ \vec{\nabla} \wedge \vec{H} = \varepsilon \cdot \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} = n^2 \cdot \varepsilon_0 \cdot \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \end{array} \right. \quad (3.6)$$

Ces deux équations peuvent s'écrire sous la forme :

$$\left\{ \begin{array}{l} \vec{\nabla} \wedge \vec{\nabla} \wedge \vec{E} = -\mu \vec{\nabla} \wedge \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \\ \vec{\nabla} \wedge \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} = \varepsilon \cdot \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} \end{array} \right. \quad (3.7)$$

D'où :

$$\begin{aligned}
 \vec{\nabla} \wedge \vec{\nabla} \wedge \vec{E} &= -\mu \cdot \varepsilon \cdot \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} \\
 \text{Or } \Delta \vec{E} &= \vec{\nabla} \wedge \vec{\nabla} \wedge \vec{E} \quad \text{car} \quad \text{div}(\vec{E}) = 0 \\
 \Rightarrow \Delta \vec{E} + \mu \cdot \varepsilon \cdot \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} &= 0 \quad (\text{idem pour } \vec{H})
 \end{aligned} \tag{3.8}$$

3.1.2.3 Propagation d'ondes planes

Une onde plane est une onde dont les champs électrique et magnétique se propagent en restant dans un même plan perpendiculaire à la direction de propagation [Elliott, 1993] [Jackson, 2001] [Bohren and Huffman, 2004]. Dans ce plan, appelé *plan de polarisation*, $\vec{E}$ et $\vec{H}$ sont orthogonaux. Les champs électrique et magnétique d'une onde plane harmonique monochromatique se propageant dans un milieu homogène peuvent s'écrire sous la forme :

$$\begin{cases} \vec{E}(r, t) = \vec{E}_0 e^{-i(\omega t - kr)} = \vec{E}_0 e^{-i\varphi} \\ \vec{H}(r, t) = \vec{H}_0 e^{-i(\omega t - kr)} = \vec{H}_0 e^{-i\varphi} \end{cases} \tag{3.9}$$

$\underline{E}$ et $\underline{H}$ sont des fonctions complexes du temps t et de l'espace (distance radiale r) pour lesquels sont définis respectivement :

- la pulsation : $\omega = 2\pi f$ avec $f = c/\lambda$ la fréquence,
- le vecteur d'onde précisant la direction de la propagation de l'onde : $\vec{k} = \frac{2\pi \underline{n}}{\lambda} \vec{u}$, de norme $k = \|\vec{k}\| = (2\pi n)/\lambda$ avec $\underline{n}$ l'indice de réfraction complexe du milieu dépendant de ses propriétés électromagnétiques, λ la longueur d'onde et $\vec{u}$ le vecteur unitaire indiquant la direction de propagation,
- la phase : $\varphi(r, t) = \omega t - kr$.

Dans ces conditions, $\vec{E}$ et $\vec{H}$ sont liées par les équations de Maxwell (3.6) tel que :

$$\begin{cases} \vec{\nabla} \wedge \vec{E} = i \cdot \omega \cdot \mu \cdot \vec{H} & = i \cdot \frac{c \cdot k}{\underline{n}} \cdot \mu \cdot \vec{H} \\ \vec{\nabla} \wedge \vec{H} = -(i \cdot \omega \cdot \varepsilon + \sigma) \vec{E} & = -i \cdot \frac{k}{\mu c} \cdot \frac{\underline{n}^2}{\underline{n}} \cdot \vec{E} \end{cases} \tag{3.10}$$

avec $\underline{n}$ l'indice de réfraction complexe à la fréquence ω (détaillé dans le paragraphe 3.1.2.6) :

$$\underline{n}^2 = \frac{\varepsilon}{\varepsilon_0} - i \frac{\sigma}{\omega \varepsilon_0} \tag{3.11}$$

Comme précédemment, en simplifiant, nous obtenons :

$$\begin{cases} \Delta \vec{E} + k^2 \vec{E} = 0 \\ \Delta \vec{H} + k^2 \vec{H} = 0 \end{cases} \quad \text{avec} \quad k^2 = \vec{k} \cdot \vec{k} = \omega^2 \varepsilon \mu \tag{3.12}$$

avec comme solutions les équations (3.9).

3.1.2.4 Vecteur de Poynting et énergie

Le vecteur de Poynting $\vec{P}$ donne la direction de propagation et l'amplitude de l'onde électromagnétique dans un milieu isotrope et représente le flux d'énergie de l'onde électromagnétique en tous points de l'espace [Olivier, 1996] [Jackson, 2001]. La puissance instantanée transportée par l'onde électromagnétique est donnée par ce flux tel que :

$$\vec{P} = \vec{E} \wedge \vec{H} \quad (3.13)$$

Le flux $\|\vec{P}\|$ (radiance totale) représente la puissance par unité de surface (W/m^2) qui est émise, transportée ou reçue sous forme de rayonnement lumineux.

La puissance moyenne de l'onde électromagnétique est définie par le vecteur de Poynting complexe [Verdier, 2000] :

$$\underline{\vec{P}} = \frac{\underline{\vec{E}} \wedge \underline{\vec{H}}^*}{2} \quad (3.14)$$

$\underline{\vec{H}}^*$ désigne le conjugué de $\underline{\vec{H}}$.

La puissance moyenne temporelle du vecteur de Poynting est :

$$\langle \vec{P} \rangle = \frac{1}{2} \text{Re} \left(\underline{\vec{E}} \wedge \underline{\vec{H}}^* \right) \quad (3.15)$$

Pour une onde électromagnétique plane harmonique dans un milieu absorbant (k complexe) :

$$\begin{aligned} \underline{\vec{P}} &= \frac{1}{2} \underline{\vec{E}} \wedge \underline{\vec{H}}^* = \frac{1}{2\omega\mu} \underline{\vec{E}} \wedge \underline{k}^* \wedge \underline{\vec{E}}^* \\ \Rightarrow \underline{P} &= \frac{1}{2\omega\mu} E^2 k^* \quad \text{avec} \quad E^2 = \underline{\vec{E}} \wedge \underline{\vec{E}}^* = E_0^2 e^{-2k''r} \\ \Rightarrow \underline{P} &= \frac{1}{2\omega\mu} E_0^2 e^{-2k''r} k^* = \frac{1}{2\omega\mu} E^2 (k' + ik'') \end{aligned} \quad (3.16)$$

3.1.2.5 Vitesse de phase

La vitesse de phase V_φ de l'onde est la vitesse à laquelle la phase de l'onde se propage dans l'espace [Bruhat, 1992] [Olivier, 1996] [Bohren and Huffman, 2004] telle que :

$$V_\varphi = \frac{dr}{dt} \quad (3.17)$$

dr est la distance parcourue par la phase pendant dt de sorte que :

$$\begin{aligned} \varphi(r, t) &= \varphi(r + dr, t + dt) = \omega t - kr = \omega(t + dt) - k(r + dr) \\ \text{d'où} \quad \omega dt &= k dr \\ \text{et} \quad V_\varphi &= \frac{\omega}{k} \end{aligned} \quad (3.18)$$

Le plan de phase correspond à une surface d'onde, c'est-à-dire à l'ensemble des points ayant la même valeur de phase.

3.1.2.6 Indice de réfraction complexe

Une onde électromagnétique se propage à différentes fréquences dans des milieux d'indices de propagation n différents [Jackson, 2001] [Bohren and Huffman, 2004] :

$$\begin{aligned} V_\varphi &= \frac{\omega}{k} \\ \text{or } k &= \frac{2\pi n}{\lambda} \quad \text{et } \lambda = \frac{c}{f} = \frac{2\pi c}{\omega} \\ \text{d'où } V_\varphi &= \frac{c}{n} \end{aligned} \quad (3.19)$$

La notion d'indice de réfraction appliquée aux tissus biologiques est développée ci-après dans la section 3.1.3.1.

Dans le cas d'un milieu d'indice complexe (partie imaginaire non nulle) :

$$\begin{aligned} \underline{n}(\omega) &= \frac{c \underline{k}}{\omega} = n'(\omega) + i n''(\omega) \\ \Rightarrow \underline{k} &= \frac{\omega}{c} \underline{n} = \frac{\omega}{c} (n' + i n'') = k' + i k'' \end{aligned} \quad (3.20)$$

où

- la partie réelle n' détermine la vitesse de phase de l'onde : $V_\varphi = \frac{\omega}{k'} = \frac{c}{n'}$
- la partie imaginaire n'' détermine l'absorption du champ électrique $\underline{E}$ sur une longueur $l = \frac{c}{n'' \omega}$

Les équations (3.9) deviennent alors :

$$\begin{cases} \underline{E}(r, t) = \underline{E}_0 e^{-i(\omega t - k r)} = \underline{E}_0 e^{-i(\omega t - k' r)} e^{-k'' r} \\ \underline{H}(r, t) = \underline{H}_0 e^{-i(\omega t - k r)} = \underline{H}_0 e^{-i(\omega t - k' r)} e^{-k'' r} \end{cases}$$

Le premier terme exponentiel avec k' correspond à un changement de vitesse (changement de direction du vecteur d'onde : diffusion) et le second terme à une atténuation (absorption).

3.1.3 Définition des propriétés optiques des tissus biologiques

3.1.3.1 Indice de réfraction d'un milieu et chemin optique

La **réfraction** est la déviation d'une onde lorsque celle-ci change de milieu donc de vitesse (indices différents). La lumière est alors dite réfractée et la propriété qui caractérise les différents milieux transparents est la réfringence, qui se traduit par une valeur numérique : l'indice de réfraction.

L'indice de réfraction n d'un milieu caractérise la vitesse de phase V_φ de l'onde électromagnétique dans le milieu (cf. section 3.1.2). Il est le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide ($c = c_0 \approx 3.10^8$ m/s) et sa vitesse V_φ dans le milieu et est fonction de la longueur d'onde [Jackson, 2001] :

$$n(\lambda) = \frac{c}{V_\varphi(\lambda)} \quad (3.21)$$

n (sans unité) est toujours supérieur ou égal à 1.

En règle générale, l'indice de réfraction dans les tissus biologiques dépend essentiellement de la teneur en eau du tissu ($n_{eau}=1,33$). Il peut varier en fonction du pH du milieu, il peut varier au sein d'un milieu si celui-ci n'est pas homogène et isotrope et même dépendre de la direction de polarisation, dans le cas de cristaux biréfringents. La variation de la vitesse de la lumière selon le milieu provient du phénomène d'absorption-réémission de l'onde par les atomes (voir diffusion Rayleigh dans le paragraphe 3.1.3.3).

La loi de Snell-Descartes de la réfraction exprime le changement de direction d'un faisceau lumineux lors de la traversée d'une paroi séparant deux milieux différents (dioptre), c'est-à-dire deux milieux de réfringences différentes (Fig. 3.2).

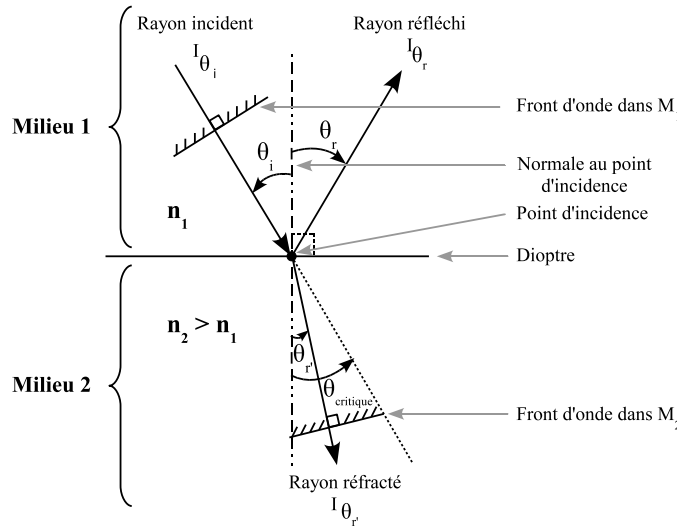


FIG. 3.2 – Optique Géométrique (lois de la réflexion et de la réfraction).

Considérons une onde passant d'un milieu 1 (M_1) d'indice de réfraction n_1 à un milieu 2 (M_2) d'indice $n_2 > n_1$. Soit θ_i l'angle entre la normale du dioptre au point d'incidence et le rayon incident (normale au front de l'onde), θ_r celui formé par la normale avec le rayon réfléchi au point d'incidence, $\theta_{r'}$ l'angle formé par la normale du dioptre avec le rayon réfracté et $\theta_{critique}$ l'angle critique.

La loi de Snell-Descartes s'énonce ainsi :

- le rayon réfracté est dans le plan d'incidence,
- la relation liant les indices de réfraction n_1 et n_2 de chacun des milieux et les angles incident θ_i et réfracté $\theta_{r'}$ sont liés par la relation dite de Snell-Descartes :

$$n_1 \sin(\theta_i) = n_2 \sin(\theta_{r'}) \quad (3.22)$$

Plus l'indice de réfraction n_2 est grand/petit, plus le rayon réfracté s'approche/s'éloigne de la normale et il existe donc un angle maximum de réfraction ou angle limite tel que :

- lorsque $n_2 > n_1$, pour une incidence rasante ($\theta_i = \pi/2$) :

$$\begin{aligned} \lim_{\theta_i \rightarrow \frac{\pi}{2}} \sin \theta_i &= 1 \\ \Rightarrow \lim_{\theta_i \rightarrow \frac{\pi}{2}} \sin \theta_{r'} &= \frac{n_1}{n_2} \\ \Rightarrow \lim_{\theta_i \rightarrow \frac{\pi}{2}} \theta_{r'} \lim &= \arcsin \frac{n_1}{n_2} \quad (\text{angle maximum de réfraction}) \end{aligned}$$

- lorsque $n_2 < n_1$, pour une réfraction limite ($\theta_{r'} = \pi/2$) :

$$\lim_{\theta_{r'} \rightarrow \frac{\pi}{2}} \theta_i \lim = \arcsin \frac{n_2}{n_1} \quad (\text{angle critique})$$

Pour tout angle θ_i dépassant l'angle critique $\theta_i \lim$, il n'y a pas de réfraction mais uniquement de la réflexion. Ce paramètre est particulièrement important dans notre application. En effet, les fibres optiques possèdent une ouverture numérique (ON) qui caractérise cet angle d'incidence critique, angle qui n'est pas le même si la fibre est au contact de l'air ou d'un tissu. L'ouverture numérique standard des fibres de type silice/silice à saut d'indice est de $(0,22 \pm 0,02)$, ce qui donne un angle total d'acceptance de la fibre de $25,4^\circ$.

Exemple Calcul des angles critiques selon que la fibre est en contact avec l'air ou avec un tissu.

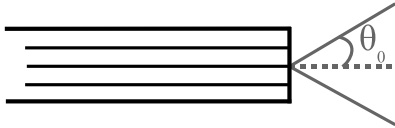


FIG. 3.3 – Angle critique d'une fibre.

$$\begin{aligned} n_{air} &= 1 \quad \text{et} \quad n_{tissus} \approx 1,4 \\ ON &= 0,22 = n \sin \theta_0 \\ \rightarrow \theta_{0|air} &= \arcsin(0,22) \approx 12,7^\circ \\ \rightarrow \theta_{0|tissus} &= \arcsin\left(\frac{0,22}{1,4}\right) \approx 9^\circ \end{aligned}$$

La **réflexion** est le brusque changement de direction d'une onde à l'interface de deux milieux. Après réflexion, l'onde reste dans son milieu de propagation initial. La loi de la réflexion s'énonce ainsi :

- le rayon réfléchi θ_r est dans le plan d'incidence (défini par le rayon incident et la normale au dioptré au point d'incidence),
- les angles incident θ_i et réfléchi θ_r vérifient : $\theta_r = -\theta_i$

Comme la vitesse de la lumière n'est pas la même selon les milieux, le temps qu'elle met à parcourir une certaine distance varie également. Pour exprimer cela sur le plan mathématique, on introduit la notion de *chemin optique* [Olivier, 1996].

Le chemin optique est défini comme la distance totale parcourue par une onde dans les différents

milieux traversés. Si un rayon change de milieu et parcourt une distance d_i dans p milieux d'indices n_i , alors le chemin optique parcouru L est égal à :

$$L = \sum_{i=1}^p n_i d_i = \frac{1}{c} \sum_{i=1}^p v_i d_i \quad (3.23)$$

A part dans le vide, l'indice de réfraction dépend de la longueur d'onde (phénomène de dispersion) : des rayons lumineux de « couleurs » différentes n'ont pas la même vitesse et ne subissent pas la même déviation à la traversée d'un dioptré (prisme, goutte d'eau - arc-en-ciel -, aberrations chromatiques des lentilles...). Les valeurs de n indiquées dans le tableau 3.1 sont donc des valeurs moyennes. Mais les variations de n sont faibles et dans de nombreuses applications, l'indice est considéré comme étant constant pour toutes les longueurs d'onde de la bande UV-Visible-NIR.

TAB. 3.1 – Exemple de valeurs d'indice de réfraction (Ref. 1 : [OPUS, 2003], Ref. 2 : [Vo-Dinh, 2003b], Ref. 3 : [Flahaut, 2007]).

Milieu	n	Ref
Air (CNTP)	1,00029	2
Téflon (polytétrafluoroéthylène)	1,35	3
Tissu biologique	1,35 - 1,45	2
Fibre Si/Si	$\approx 1,45$	1

CNTP : conditions normales de température et de pression.

Un tableau de synthèse de valeurs bibliographiques de n obtenues pour d'autres milieux et pour différents tissus biologiques d'intérêt pour notre étude est donné en annexe B.

3.1.3.2 Absorption

Définition :

Le **coefficient d'absorption** μ_a (cm^{-1}) est un paramètre moyen (échelle macroscopique) caractérisant l'absorbance d'un milieu homogène non diffusant tel que [Bohren and Huffman, 2004] :

$$dI(\lambda) = -\mu_a(\lambda) I_0(\lambda) dL \quad (3.24)$$

où $dI(\lambda) = I_1(\lambda) - I_0(\lambda)$ est la différence entre l'intensité transmise $I_1(\lambda)$ et l'intensité incidente $I_0(\lambda)$ d'un faisceau collimaté le long d'un trajet élémentaire $dL = L_1 - L_0$ à travers ce milieu (Fig. 3.4).

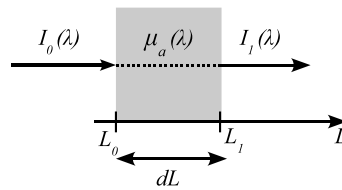


FIG. 3.4 – Modèle physique de l'absorption.

L'intégration de l'équation (3.24) sur une épaisseur L donne la loi d'atténuation de la lumière de Beer-Lambert :

$$I_1(\lambda) = I_0(\lambda) e^{-\mu_a(\lambda)L} \quad (3.25)$$

Le coefficient d'absorption correspond donc au coefficient d'atténuation exponentielle de l'intensité lumineuse. Il est défini par [Jackson, 2001] :

$$\mu_a(\lambda) = \frac{2 \omega k_{lin}}{c_0} = \frac{4 \pi k_{lin}}{\lambda} \quad (3.26)$$

ω (rad.s^{-1}) correspond à la pulsation angulaire du rayonnement électromagnétique, k_{lin} est le coefficient d'extinction linéique et exprime l'atténuation de l'énergie du rayonnement électromagnétique à travers le milieu.

Plusieurs grandeurs classiquement utilisées découlent de cette équation (3.25) :

- la **transmittance** du milieu (sans unité) est l'intensité transmise après un parcours au travers d'une épaisseur, rapportée à l'intensité incidente :

$$T_n(\lambda) = \frac{I_1(\lambda)}{I_0(\lambda)} = e^{-\mu_a(\lambda) L} \quad (3.27)$$

In vivo, les mesures en transmittance concernent l'oxymétrie (extrémités d'organes, épaisseur limitée) et les méthodes tomographiques - plus complexes - à cause des épaisseurs importantes des tissus (tomographie optique diffuse, tomographie de fluorescence...).

- la **densité optique** (DO) ou **absorbance** (sans unité) :

$$DO(\lambda) = \ln \frac{I_0(\lambda)}{I_1(\lambda)} = \ln \frac{1}{T_n(\lambda)} = \mu_a(\lambda) L \quad (3.28)$$

S'agissant d'un paramètre « moyen », la probabilité d'absorption dépend de la probabilité de rencontre qui peut s'exprimer en fonction de différents paramètres tels que [Jacques, 2005] :

$$\mu_a(\lambda) = \rho(\lambda) \sigma_a(\lambda) = \varepsilon(\lambda) [C] \quad (3.29)$$

ρ (cm^{-3}) désigne la densité volumique de particules, σ_a (cm^2) la section efficace d'absorption exprimant l'efficacité de la rencontre photon-matière ou l'efficacité d'absorption par une particule unique, ε le coefficient d'extinction molaire ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et $[C]$ la concentration molaire (mol.L^{-1}).

La section efficace d'absorption peut être supérieure ou inférieure à la section géométrique ou physique A_a (cm^2) de la particule de sorte que [Jacques, 2005] :

$$\sigma_a(\lambda) = Q_a(\lambda) A_a \quad (3.30)$$

Q_a correspond à l'efficacité d'absorption (sans unité).

Pour p différents absorbeurs dans le milieu, $\mu_a(\lambda)$ s'écrit :

$$\mu_a(\lambda) = \sum_{i=1}^p \rho_i(\lambda) \sigma_{ai}(\lambda) \quad (3.31)$$

Le **(libre) parcours moyen d'absorption** l_a (« absorption pathlength ») représente la distance moyenne parcourue par un photon entre deux événements consécutifs d'absorption à deux endroits dans le milieu : $l_a = \frac{1}{\mu_a}$

Exemples :

L'eau, qui est le principal composant des tissus biologiques, absorbe la lumière dans l'ultraviolet et surtout dans l'infrarouge. La figure 3.5(a) présente les spectres d'absorption de différents chromophores des tissus biologiques (protéine, eau, hémoglobine...). L'ADN et les protéines comme la mélanine et l'hémoglobine absorbent préférentiellement dans l'ultraviolet et le visible. Le spectre d'absorption de l'hémoglobine dépend de son état d'oxygénation (Fig. 3.5(b)). Les formes oxygénée (HbO_2) et désoxygénée (Hb) ont un coefficient d'absorption semblable et important aux longueurs d'onde du visible inférieures à 600 nm. La figure 3.5(c) présente l'exemple du spectre d'absorption de la mélanine⁶ mais d'autres chromophores peuvent être à l'origine de l'absorption dans le domaine du visible [Jacques and Prahl, 1998].

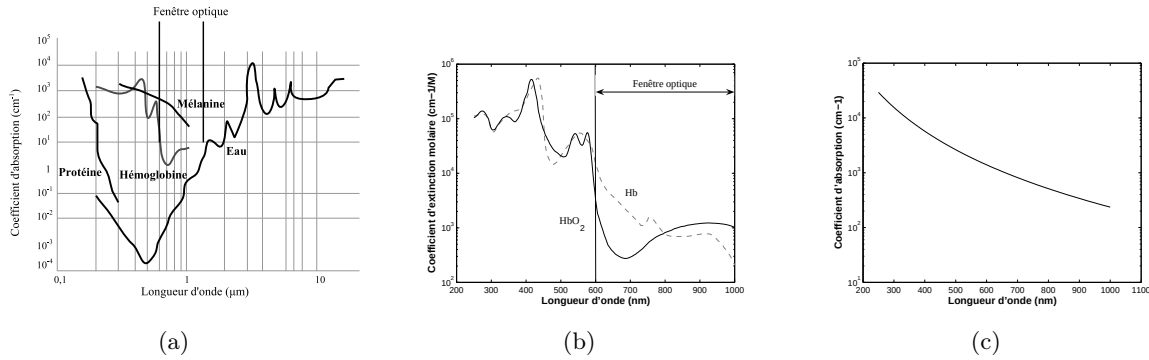


FIG. 3.5 – Spectres d'absorption en fonction de la longueur d'onde (a) de différents chromophores des tissus biologiques, (b) de l'oxy-hémoglobine HbO_2 et de la désoxyhémoglobine Hb dans l'eau, (c) des mélanosomes [OMLC, 2004].

La fenêtre optique correspond aux longueurs d'onde comprises entre 600 et 1 000 nm environ, soit la majeure partie de la gamme visible pour l'œil.

Un tableau de synthèse de valeurs bibliographiques de μ_a dans les tissus biologiques est présenté en annexe B. Il est à noter que les valeurs des coefficients d'absorption ne sont connues que pour très peu de longueurs d'onde.

3.1.3.3 Régimes de diffusion élastique

Introduction :

La diffusion élastique est une interaction au cours de laquelle la quantité d'énergie cinétique entre deux particules ou corps est conservée. La diffusion de la lumière (transmission dans des directions différentes de celle incidente) se produit lorsqu'une onde électromagnétique rencontre une « particule » d'indice de réfraction différent de celui du milieu environnant. Les caractéristiques de cette diffusion varient avec la taille et/ou la forme de cette particule [Brun, 2005].

La diffusion de la lumière dans les tissus biologiques perçue à l'échelle macroscopique est due aux différences d'indices de réfraction aux interfaces à l'échelle microscopique telles que les

⁶Il s'agit en fait du spectre d'absorption des mélanosomes, c'est à dire des organites où la mélanine est synthétisée. La concentration en mélanine variant d'un mélanosome à l'autre, la courbe correspond à des valeurs moyennes. Par ailleurs, il est également difficile de donner des valeurs du coefficient d'absorption molaire de la mélanine pure, car il s'agit d'une protéine complexe dont la structure exacte est mal connue et varie [OMLC, 2004].

membranes des cellules, l'interface noyau-cytoplasme, les organelles...

Selon les dimensions des particules diffusantes du milieu par rapport à la longueur d'onde λ de la lumière incidente, la résolution des équations de Maxwell conduit à trois « régimes » de diffusion différents [Selb, 2002] :

1. Si les particules diffusantes sont de tailles très inférieures à la longueur d'onde incidente ($< \frac{\lambda}{10}$ typiquement), nous parlons de *diffusion Rayleigh*. Cette diffusion est, par exemple, prédominante dans l'atmosphère car produite par les molécules de gaz. [Rayleigh, 1871] a calculé l'intensité dispersée par des diffuseurs beaucoup plus petits que la longueur d'onde comme :

$$I_1 = I_0 \frac{8\pi^4 N \alpha^2}{\lambda^4 R^2} (1 + \cos^2 \theta) \quad (3.32)$$

N désigne le nombre de particules, α la polarisabilité et θ l'angle entre la direction de l'onde incidente et celle diffusée. La diffusion est globalement isotrope (et/ou quasi-isotrope). L'intensité diffusée est inversement proportionnelle à λ^4 , ce qui explique par exemple les variations importantes de la couleur du ciel (allant du bleu en plein jour au rouge au coucher ou lever du soleil) puisque le bleu est 16 fois plus diffusé que le rouge.

2. Lorsque la taille des particules diffusantes possède une dimension moyenne de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde incidente, nous devons faire appel au formalisme de la diffraction pour interpréter les phénomènes de déviation de la lumière, c'est le régime de *diffusion anisotrope de Mie* [Mie, 1908]. Comme nous le verrons ci-après, les équations de Maxwell donnent des solutions pour des particules de géométrie simple comme les sphères.
3. Lorsque la taille des particules diffusantes est grande en regard de la longueur d'onde (par exemple les gouttes nuageuses de quelques micromètres ou les cristaux de glace de quelques dizaines de micromètres), les lois de l'*optique géométrique* (réflexion spéculaire) suffisent à traiter le problème.

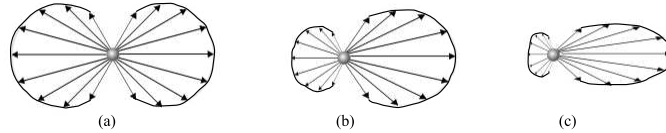


FIG. 3.6 – L'onde incidente arrive par la gauche. Intensité de la diffusion (a) de Rayleigh, (b) de Mie pour de petites particules, (c) de Mie pour de grosses particules.

Le schéma de la figure 3.7 récapitule les différents types de régimes de diffusion intervenant selon la dimension des éléments diffusants considérés [Jacques, 2005]. La diffusion dans les tissus biologiques est principalement anisotrope avec une orientation vers l'avant.

Les équations de Maxwell acceptent des solutions simples dans les milieux homogènes ou dans certains milieux à indice faiblement variable. Le principe d'analyse de la diffusion par la théorie électromagnétique consiste à résoudre les équations dans le milieu ambiant et dans les structures diffractantes (diffusantes) puis à appliquer des conditions aux limites (conditions de passage) aux interfaces séparant les cellules diffractantes du milieu ambiant [Brun, 2005].

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, ou géométrie complexe) et de la concentration des centres diffuseurs dans le milieu. Lorsque le degré d'hétérogénéité du milieu augmente, il n'est plus possible de

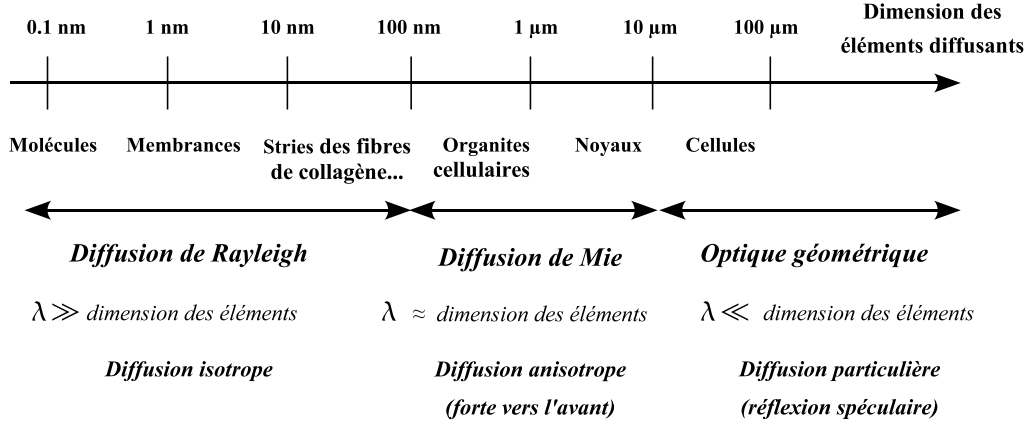


FIG. 3.7 – Schéma des différents régimes de diffusion en fonction de la dimension des éléments constitutifs des tissus biologiques.

négliger les interactions des particules diffusantes entre elles (diffusions multiples). La mise en œuvre de modèles théoriques électromagnétiques ou géométriques se heurte alors à l'impossibilité de trouver une solution rigoureuse (analytique ou numérique), soit à la limitation imposée dans la résolution des équations par les outils de calcul numérique. Il convient, dans ces conditions, de recourir à des méthodes probabilistes permettant de simuler le parcours aléatoire d'un rayon lumineux dans un milieu fortement diffusant. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser différentes approches mathématiques lors de la modélisation du phénomène de diffusion [Saidi *et al.*, 1995] (paragraphe 3.2.1).

Diffusion de Mie :

La théorie de Mie traite la modélisation rigoureuse de la diffusion d'une onde électromagnétique plane harmonique par une particule sphérique homogène et isotrope.

On « ajoute » aux relations fondamentales (3.1) et constitutives (3.3) des relations de passage d'un milieu continu (indice n_1) à un autre (indice n_2). Les solutions particulières des équations (3.6) sont obtenues à partir des conditions aux limites données (de façon générale) par les équations de continuité des composantes normales et tangentielles des champs électromagnétiques à l'interface de deux milieux d'indice n_1 et n_2 :

$$\left\{ \begin{array}{ll} \vec{u} \cdot (\vec{D}_2 - \vec{D}_1) = 0 & \text{Composante normale du courant de déplacement électrique} \\ \vec{u} \wedge (\vec{E}_2 - \vec{E}_1) = \vec{0} & \text{Composante tangentielle du champ électrique} \\ \vec{u} \cdot (\vec{B}_2 - \vec{B}_1) = 0 & \text{Composante normale de densité de flux magnétique} \\ \vec{u} \wedge (\vec{H}_2 - \vec{H}_1) = \vec{0} & \text{Composante tangentielle du champ magnétique} \end{array} \right. \quad (3.33)$$

$\vec{u}$ est le vecteur unitaire normal à l'interface.

Dans le cas d'un milieu diélectrique linéaire, homogène, isotrope, le champ électromagnétique en régime harmonique et avec une dépendance temporelle en $e^{-i\omega t}$ vérifie l'équation vectorielle de Helmholtz homogène en l'absence de source (équations 3.12) [Jackson, 2001] [Bohren and Huffman, 2004] :

$$\vec{\Delta} \vec{A} + k^2 \vec{A} = \vec{0} \quad (3.34)$$

- $\vec{A}$ peut être soit $\vec{E}$, soit $\vec{H}$,
- $\vec{\Delta} \vec{A} = \vec{\nabla}^2 \vec{A}$, le laplacien de $\vec{A}$,
- k le nombre d'onde tel que $k = n \frac{\omega}{c} = n k_0$ et $c = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_0 \mu_0}}$, donc $k = n \omega \sqrt{\varepsilon_0 \mu_0}$.

Chaque composante du champ vérifie l'équation scalaire sans second membre :

$$\Delta f(x, y, z) + k^2 f(x, y, z) = 0 \quad (3.35)$$

Si nous considérons une particule sphérique isolée diélectrique recevant une onde électromagnétique incidente très éloignée, il est utile de passer dans un repère de coordonnées sphériques avec :

$$\begin{cases} x = r \sin \theta \cos \phi \\ y = r \sin \theta \sin \phi \\ z = r \cos \theta \end{cases} \quad \text{avec} \quad \begin{cases} 0 \leq \theta \leq \pi \\ 0 \leq \phi < 2\pi \\ r \in \mathbb{R}^{+*} \end{cases} \quad (3.36)$$

de sorte que $f(x, y, z) = \psi(r, \theta, \phi)$.

Le développement du laplacien en coordonnées sphériques conduit à l'équation aux dérivées partielles scalaires [Jackson, 2001] :

$$\Delta \psi + k^2 \psi = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial \psi}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial}{\partial \phi} \left(\frac{\partial^2 \psi}{\partial \phi^2} \right) + k^2 \psi = 0$$

La solution d'une telle équation est de la forme :

$$\psi_{l,m} = \begin{Bmatrix} \cos(l\phi) \\ \sin(l\phi) \end{Bmatrix} P_m^l(\cos \theta) \cdot Z_m(n \cdot k \cdot r) \quad m \geq l \geq 0 \quad \text{et} \quad m, l \in \mathbb{N} \quad (3.37)$$

avec

- $P_m^l(\cos \theta)$ polynôme de Legendre,
- $Z_m(n \cdot k \cdot r)$ fonction de Bessel sphérique tel que $Z(x) = \sqrt{\frac{\pi}{2x}} Z_{m+\frac{1}{2}}(x)$

En considérant la diffusion d'une onde plane rencontrant une sphère homogène et en tenant compte de la polarisation ($E_{\perp}$ champ polarisé perpendiculairement au plan de diffusion, $E_{\parallel}$ champ polarisé dans le plan de diffusion), l'expression de la diffusion est :

$$\begin{cases} E_{\perp} = S_1(\theta) \frac{e^{-ikr+ikz}}{ikr} \cdot E_{\perp 0} \\ E_{\parallel} = S_2(\theta) \frac{e^{-ikr+ikz}}{ikr} \cdot E_{\parallel 0} \end{cases} \quad (3.38)$$

$S_1(\theta)$ et $S_2(\theta)$ sont les fonctions d'amplitudes et $E_{\perp 0}$ et $E_{\parallel 0}$ représentent les champs incidents.

Dans le cas d'une onde incidente I_0 non polarisée, l'intensité de l'onde diffusée I_1 peut s'écrire :

$$I_1 = \frac{1}{2} \frac{|S_1(\theta)|^2 + |S_2(\theta)|^2}{k^2 r^2} I_0 \quad (3.39)$$

Pour un angle $\theta = 0^\circ$, c'est-à-dire en transmission directe, l'équation (3.39) devient :

$$I_1 = I_0 e^{(-\mu_t L)} \quad (3.40)$$

μ_t est le **coefficient total d'extinction**, défini comme l'atténuation globale de la lumière balistique, donc en transmission (ligne droite), due à la diffusion et l'absorption de la lumière par le milieu. Il vaut :

$$\mu_t = J \frac{4\pi}{k^2} \text{Re}(S(\theta = 0)) \quad (3.41)$$

J est le nombre de diffuseurs par unité de volume et $S_1(\theta = 0^\circ) = S_2(\theta = 0^\circ) = S(\theta = 0^\circ)$.

Il s'écrit également :

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \quad (3.42)$$

$1/\mu_t$ fait souvent référence au libre parcours moyen entre un événement de diffusion et d'absorption.

Pour plus de détails sur cette partie, notamment le passage de (3.39) à (3.40), le lecteur se reportera à l'annexe C et aux livres de [Jackson, 2001] [Bohren and Huffman, 2004].

Coefficient de diffusion « moyen » :

Le coefficient de diffusion (« scattering ») μ_s (cm^{-1}) peut être défini comme le coefficient d'absorption, pour une source collimatée, tel que :

$$I_1(\lambda) = I_0 e^{-\mu_s(\lambda)L} \quad (3.43)$$

où I_1 est la quantité de lumière collimatée non diffusée (c'est-à-dire l'intensité balistique) après avoir traversé un échantillon non absorbant d'épaisseur L (Fig. 3.8). Le nombre de photons balistiques diminue donc en $e^{-\mu_s(\lambda)L}$.

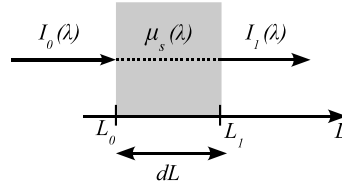


FIG. 3.8 – Modèle physique de la diffusion (milieu non absorbant).

Le coefficient de diffusion peut être exprimé en terme de densité de particules ρ (cm^{-3}) et de section de diffusion σ_s (cm^2) [Jacques, 2005] :

$$\mu_s = \rho \sigma_s \quad (3.44)$$

Un tableau de synthèse de valeurs bibliographiques de μ_s dans les tissus biologiques est présenté en annexe B. Il est à noter que les valeurs des coefficients de diffusion ne sont connues que pour pour très peu de longueurs d'onde. Le coefficient de diffusion d'un tissu est plutôt lié à sa structure, notamment à la densité des cellules, la taille des noyaux, la présence ou non de fibres structurales, l'état de déshydratation...

Le (libre) parcours moyen de diffusion l_s correspond à la distance moyenne parcourue par un photon entre deux événements de diffusion successifs (typiquement 20 - 100 μm dans les tissus biologiques) :

$$l_s = \frac{1}{\mu_s} \quad (3.45)$$

Fonction de phase :

Lorsqu'un photon, dont la direction d'incidence est représentée par le vecteur unitaire $\vec{s}$, subit une diffusion, la probabilité qu'il reparte dans une direction $\vec{s}'$ est donnée par la fonction de phase $f(\vec{s}, \vec{s}')$.

Une représentation des directions incidente et de rediffusion est présentée Fig. 3.9.

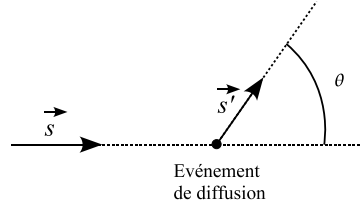


FIG. 3.9 – Représentation de la direction incidente $\vec{s}$, de la direction de rediffusion $\vec{s}'$ et de l'angle de déflexion θ .

Plus généralement, soit un point $M(r, \theta, \phi)$ dans un repère sphérique de centre O (angle de déflexion $\theta \in [0, \pi]$; angle azimutal $\phi \in [0, 2\pi]$), le vecteur unitaire $\vec{s} = [\sin \theta \cos \phi, \sin \theta \sin \phi, \cos \theta]^T$ définit la direction du segment OM pour M sur la surface de la sphère de rayon $r = 1$. L'angle solide élémentaire est $d\Omega = \sin \theta \, d\theta \, d\phi$.

La fonction de phase normalisée $f(\vec{s}, \vec{s}')$ obéit à la condition de normalisation :

$$\int \int_{4\pi} f(\vec{s}, \vec{s}') \, d\Omega = 1 \quad (3.46)$$

$f(\vec{s}, \vec{s}') = \frac{1}{4\pi}$ signifie que la fonction de phase est indépendante de la direction, donc qu'il s'agit d'une diffusion isotrope (Rayleigh).

Pour les tissus biologiques et en cas de distribution aléatoire homogène des particules diffusantes, nous pouvons supposer que la probabilité de distribution est seulement fonction de l'angle entre les directions incidente et diffusée et ne dépend pas de l'angle de l'incidence relative de la diffusion [Selb, 2002]. Ainsi, la fonction de phase peut être communément écrite comme une fonction du cosinus de l'angle de déflexion θ , c'est-à-dire l'angle entre les droites de la précédente et de la nouvelle direction dans le même plan, soit $\vec{s} \cdot \vec{s}' = \cos \theta$ (Fig. 3.9) :

$$f(\vec{s}, \vec{s}') = f(\cos \theta) \quad (3.47)$$

L'*indicatrice de diffusion* représente la répartition spatiale continue dans tout l'espace de l'énergie réémise.

Modèles de fonction de phase A partir des lois physiques, différentes formes analytiques de fonction de phase sont utilisées selon le type de diffusion considéré [Prah, 1988] [Liu, 1994] [Saidi *et al.*, 1995]. La fonction de phase de [Rayleigh, 1871] s'exprime par :

$$f(\cos \theta) = \frac{3}{4} (1 + \cos^2 \theta) \quad (3.48)$$

Nous remarquons sur la figure 3.10(a) que cette fonction de phase est paire, ce qui implique une intensité de diffusion identique vers l'avant et l'arrière de la direction du rayon incident.

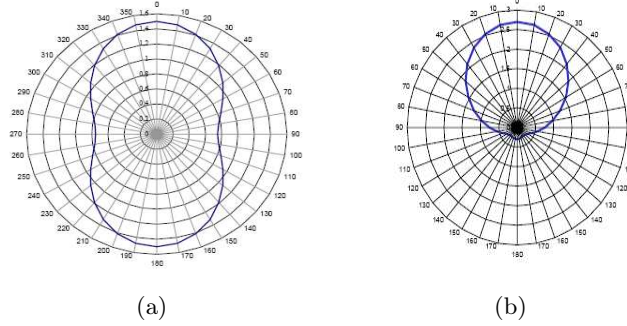


FIG. 3.10 – Exemples de fonction de phase (a) Modèle de Rayleigh, (b) Modèle de Mie.

[Mie, 1908] a donné une expression analytique exacte de la fonction de phase d'une onde plane électromagnétique pour des diffuseurs isotropes, sphériques, de taille indifférente, basée sur les équations de Maxwell. Dans le cas de très petites particules, la fonction de phase de Mie peut être simplifiée :

$$f(\cos \theta) = \frac{3}{5} \left[\left(1 - \frac{1}{2} \cos \theta \right)^2 + \left(\cos \theta - \frac{1}{2} \right)^2 \right] \quad (3.49)$$

La figure 3.10(b) représente ce modèle simplifié.

Cependant, la dérivation exacte d'une fonction de phase des tissus biologiques basée sur les équations de Maxwell semble très difficile voire impossible, à cause de la variété importante des diffuseurs. Ainsi, plusieurs chercheurs travaillant dans le domaine de l'optique biomédicale ont adopté une formule empirique et pratique dans leurs applications. Parmi ces formules, la plus utilisée pour modéliser la diffusion dans les tissus est la fonction de Henyey-Greenstein.

Pour simuler la dépendance angulaire de la diffusion de la lumière par des particules de petite taille dans les nuages de poussière interstellaire, [Henyey and Greenstein, 1941] ont développé une expression de fonction de phase, qui s'est révélée utile pour décrire également la dépendance angulaire de la diffusion dans les tissus biologiques [Bevilacqua and Depeursinge, 1999]. Cette fonction possède un intérêt pratique ; en effet, parfois, nous n'avons pas accès au détail de la fonction $f(\cos \theta)$ mais en revanche, il est possible de mesurer le coefficient d'anisotropie g d'un tissu. La fonction d'Henyey-Greenstein modifiée est la suivante [Prahl, 1988] :

$$f_{m-HG}(\cos \theta) = \frac{1}{4\pi} \left[\beta + (1 - \beta) \frac{1 - g_{HG}^2}{(1 + g_{HG}^2 - 2g_{HG} \cos \theta)^{3/2}} \right] \quad (3.50)$$

Dans cette fonction, le premier terme représente la somme de la diffusion isotrope de la lumière, le second terme la fonction anisotrope d'Henyey-Greenstein.

Les formules d'Henyey-Greenstein et Mie sont comparables pour des cosinus moyens inférieurs à 0,8 [Van de Hulst, 1980].

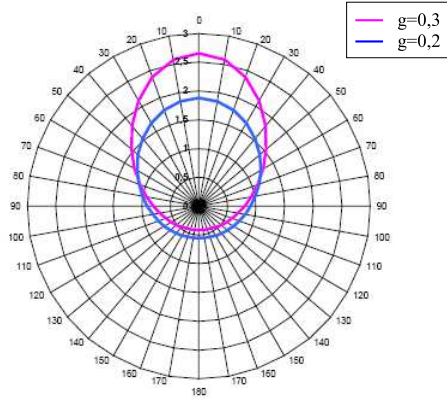


FIG. 3.11 – Exemple de fonction de phase d’Henyey-Greenstein.

Facteur d’anisotropie :

Le *coefficient d’anisotropie* g (« *anisotropy factor* ») traduit le caractère plus ou moins isotrope de l’indicatrice de diffusion. Il est défini comme le cosinus moyen de l’angle de diffusion tel que :

$$g = \int_{4\pi} f(\vec{s}, \vec{s}') (\vec{s} \cdot \vec{s}') d\Omega' \quad \text{en 3D} \quad (3.51)$$

$$\equiv \int_{-1}^{+1} f(\cos \theta) \cos \theta d(\cos \theta) \quad \text{en 2D} \quad (3.52)$$

Les valeurs limites sont :

- $g = -1$: diffusion anisotrope, vers l’arrière de l’onde incidente,
- $g = 0$: diffusion parfaitement isotrope,
- $g = 1$: diffusion anisotrope complète vers l’avant de l’onde incidente.

Dans le spectre de longueurs d’onde UV-Visible-NIR, la diffusion dans les tissus biologiques se fait préférentiellement vers l’avant, avec un coefficient d’anisotropie compris entre $0,69 \leq g \leq 0,99$ [Cheong *et al.*, 1990]. Un tableau de synthèse de valeurs de g issues de la littérature se trouve en annexe B.

Coefficient de diffusion réduit :

A partir des paramètres μ_s et g , nous pouvons définir le coefficient de diffusion réduit $\mu_{s'}$ (« *transport (or reduced) scattering coefficient* ») :

$$\mu_{s'} = \mu_s (1 - g) = \frac{1}{l^*} = \frac{1 - g}{l_s} \quad (3.53)$$

l^* et l_s sont respectivement les libres parcours moyens de transport ($\approx 500 \mu\text{m}$ dans les tissus biologiques) et de diffusion (20 - 100 μm).

$\mu_{s'}$ peut être interprété comme l’équivalent du coefficient de diffusion isotrope ; il est un paramètre fondamental dans la théorie de la diffusion de la propagation de la lumière à travers un milieu quelconque. Un tableau de quelques valeurs de $\mu_{s'}$ est présenté en annexe B.

Nous pouvons également définir le **coefficient d’extinction effective** μ_{eff} . Il décrit l’atténuation de la lumière totale et non plus uniquement l’atténuation de la lumière balistique ; il

tient compte de l'atténuation par diffusion de la lumière balistique et de la lumière non balistique redirigée par diffusion vers le point d'observation :

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_{s'})} \quad (3.54)$$

Ainsi, la transmission d'un milieu d'épaisseur L vaut $e^{-\mu_{eff}L}$.

Enfin, le **coefficient d'atténuation de transport** est défini comme [Schmidt, 1999] :

$$\mu_{tr} = \mu_a + \mu_s(1 - g) = \mu_a + \mu_{s'} \quad (3.55)$$

La composante balistique d'une onde plane à la traversée d'un tissu absorbant et diffusant d'épaisseur L peut s'écrire :

$$I_1 = I_0 e^{-\mu_{tr}L} \quad (3.56)$$

3.1.3.4 Caractérisation des propriétés optiques des tissus

Il s'agit de déduire les valeurs des coefficients optiques pour les différentes couches du tissu modélisé à partir des mesures de surface. Il faut donc établir un modèle théorique et empirique permettant de relier la distribution de la lumière rétrodiffusée aux coefficients optiques. Mais, il existe un problème : dans la littérature, les coefficients optiques ont des valeurs très variables ; de nombreuses incertitudes subsistent et il s'agit la plupart du temps d'ordres de grandeur.

La détection et l'identification *in situ* de lésions épithéliales ne peuvent s'effectuer qu'au moyen d'un accès direct à leur surface (peau) ou par voie endoscopique (vessie, utérus, voies aériennes, respiratoires, digestives...). Or, cette approche implique l'utilisation de méthodes spectroscopiques et d'imagerie endoscopique en réflectance.

3.2 Modélisation du transport des photons dans les tissus biologiques

Dans le cas des tissus biologiques, il est souvent fait appel à la théorie quantique car elle permet de mieux prendre en compte la grande complexité de ces milieux (turbidité, hétérogénéité des formes et tailles des structures, absorption, diffusion, fluorescence) en utilisant des grandeurs moyennes caractéristiques du milieu.

Selon la théorie quantique, la lumière est constituée de paquets d'énergie ou quanta appelés photons. L'énergie de chaque photon est inversement proportionnelle à la longueur d'onde du champ électromagnétique et est décrite par la formule de Planck :

$$E_p = \frac{hc}{\lambda} = h\nu \quad (3.57)$$

E_p l'énergie du photon (J), h la constante de Planck ($h = 6,62 \cdot 10^{-34}$ J.s), c la célérité de la lumière (m/s), λ la longueur d'onde (nm) et ν la fréquence (Hz).

La théorie de transfert radiatif a été construite sur des considérations énergétiques et sert de base en radiométrie/photométrie (rayonnement électromagnétique optique). Les principales grandeurs de base sont :

- le **flux radiant** ϕ_r (W) / le **flux lumineux** ϕ_v (lm),
- l'**intensité radiante** $I_r(\vec{r}, \vec{s}, d\Omega)$ (W.sr⁻¹), flux dans un angle solide unitaire dans une direction / l'**intensité lumineuse** (cd) :

$$I_r = \frac{d\phi_r}{d\Omega}$$

- la **radiance** $I(\vec{r}, \vec{s}, t)$ / la **luminance** $L(\vec{r}, \vec{s}, t, \lambda)$ (W.m⁻².sr⁻¹) ou la **radiance spectrale** $I(\vec{r}, \vec{s}, t, \lambda)$ (W.m⁻².sr⁻¹.nm⁻¹) qui représente la valeur moyenne de l'intensité émise dans un angle solide $d\Omega$ dans une direction $\vec{s}$ en un point $\vec{r}$ d'un élément de surface unitaire projetée dA^p :

$$I = \frac{d^2\phi_r}{dA^p d\Omega} \quad \text{avec} \quad dA^p = dA \cos \theta$$

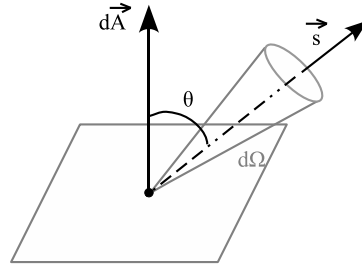


FIG. 3.12 – Espace des grandeurs utilisées.

3.2.1 Équation de transfert radiatif (ETR)

L'équation de transfert radiatif ou équation de transport de densité d'énergie radiative décrit la propagation de l'énergie lumineuse dans un milieu caractérisé par ses paramètres macroscopiques (μ_a , μ_s , g). Elle décrit le transport particulier d'un rayonnement de l'espace sans considérer la nature électromagnétique des ondes, mais 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 $\vec{s}$ [Schmidt, 1999] [Selb, 2002]. Cette équation ne prend en compte ni les effets de polarisation, ni les effets de cohérence. L'équation de transfert radiatif (équation 3.58) constitue une équation d'équilibre d'un bilan énergétique. Elle exprime l'égalité entre les gains et les pertes d'énergie dans l'élément de volume considéré.

$$\frac{1}{c} \frac{\partial L(\vec{r}, \vec{s}, t, \lambda)}{\partial t} + \vec{s} \cdot \vec{\nabla}_r L(\vec{r}, \vec{s}, t, \lambda) = \mu_s(\lambda) \int_{4\pi} L(\vec{r}, \vec{s}', t, \lambda) f(\vec{s}, \vec{s}') d\Omega' - \mu_t(\lambda) L(\vec{r}, \vec{s}, t, \lambda) + Q(\vec{r}, \vec{s}, t, \lambda) \quad (3.58)$$

avec

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

μ_t correspond au coefficient total d'extinction, $f(\vec{s}, \vec{s}')$ est la fonction de phase normalisée et $Q(\vec{r}, \vec{s}, t, \lambda)$ une source locale de rayonnement (par exemple : fluorescence, phosphorescence...). Dans le membre de gauche, le 1^{er} terme correspond à la variation temporelle de la radiance, le 2^{ème} terme au flux de photons dans la direction $\vec{s}$.

Dans le membre de droite, le 1^{er} terme correspond aux photons qui sont diffusés selon $\vec{s}$ et proviennent de toutes les directions $\vec{s}'$ de l'espace. Le 2^{ème} terme représente les pertes de photons à l'intérieur de l'élément de volume par absorption et diffusion. Enfin, le 3^{ème} terme permet de prendre en compte la contribution d'une source locale de rayonnement éventuelle.

Si des solutions exactes existent pour l'ETR dans des cas simples comme la diffusion isotrope et dans des géométries simples [Patterson *et al.*, 1991], il n'y a pas de solution générale. Il existe ainsi plusieurs types de modèles (déterministes et stochastiques) du transport de photons dérivant de l'équation de transport radiatif.

La forme intégral-différentielle de cette équation implique d'envisager différents cas de résolutions :

- $\mu_s = 0$ (**milieu non diffusant**), il existe des solutions analytiques simples.

Dans le cas où $Q(\vec{r}, \vec{s}, t, \lambda) = 0$ et en considérant une onde continue telle que $\frac{\partial L}{\partial t} = 0$. L'équation (3.58) s'écrit :

$$\vec{s} \cdot \vec{\nabla} L(\vec{r}, \vec{s}, \lambda) = -\mu_a L(\vec{r}, \vec{s}, \lambda) \quad (3.59)$$

Si nous considérons un faisceau parallèle et L se propageant selon $\vec{z}$, l'équation (3.58) se simplifie :

$$\begin{aligned} \frac{\partial L(\vec{r}, \lambda)}{\partial z} &= -\mu_a L(\vec{r}, \lambda) \\ \Rightarrow L(x, y, z) &= L_0(x, y) e^{-\mu_a z} \quad \text{loi de Beer-Lambert} \end{aligned} \quad (3.60)$$

Ce cas ne correspond pas à la situation des tissus biologiques qui sont au contraire très diffusants.

- $\mu_s \neq 0$ (**milieu diffusant**), il existe différentes approches :

1. Approche par résolutions numériques.

Il s'agit par exemple des méthodes des flux : méthodes multi-flux [Welch *et al.*, 1987], méthodes P_N [Storchi, 1984], méthodes des ordonnées discrètes qui fournissent des valeurs de fluence interne (distribution de l'intensité dans le milieu) [Liou, 1973], méthode « adding-doubling », qui fournit des valeurs de transmission et de réflexion [Prahl, 1995]. Les méthodes P_N séparent les dépendances angulaires et spatiales de la luminance de façon à remplacer l'équation de transfert radiatif par un système d'équation aux dérivées partielles (EDP) après intégration sur tout l'espace angulaire. Mais, différentes hypothèses sont associées à cette approche notamment $\mu_a \ll \mu_s$, ce qui limite son application dans le cas des tissus biologiques. Les méthodes des ordonnées discrètes et « adding-doubling » permettent de trouver des solutions précises à l'équation de transfert radiatif avec une diffusion anisotrope et pour des frontières mal délimitées. La méthode « adding-doubling » permet de travailler facilement avec des milieux multi-couches et des rendements en réflexion et transmission. Quant à la méthode des ordonnées discrètes, elle génère des fluences internes.

2. Approche par approximations.

Les deux modèles les plus couramment employés sont un modèle physique (approximation de la diffusion) [Takatani and Graham, 1979] [Contini *et al.*, 1997] et un modèle « phénoménologique » décrivant le comportement (théorie de Kubelka-Munk) [Kubelka and Munk, 1931] [Vargas, 2002]. Quelques avantages et inconvénients sont simplement énoncés ci-après. Ces deux modèles sont présentés en détails en annexe D.

La théorie de la diffusion est valable lorsque la diffusion est le processus dominant dans la distribution de la lumière, lorsque les photons sont diffusés plusieurs fois et lorsque la diffusion est isotrope [Groenhuis *et al.*, 1983a] [Groenhuis *et al.*, 1983b] [Flock *et al.*, 1989a] [Farrel *et al.*, 1992] [Hyde *et al.*, 2001] [Mobley and Vo-Dinh, 2003].

Les solutions analytiques de l'équation de la diffusion dépendante du temps n'existent que pour quelques géométries simples, notamment un milieu homogène infini illuminé par une source ponctuelle isotrope [Patterson *et al.*, 1989] [Contini *et al.*, 1997]. Pour plus de détails sur les solutions analytiques de la théorie de la diffusion, le lecteur pourra se reporter à [Parell *et al.*, 1992] [Kienle and Patterson, 1997].

La théorie à deux constantes de Kubelka-Munk (K et S_{KM}) est une approche particulièrement utilisée dans l'industrie des colorants et pigments, dans le textile, les encres fluorescentes [Emmel, 2000], les peintures et teintures [Simonot, 2002]. . . : elle permet de caractériser le degré de diffusion et d'absorption des revêtements polymères diffusants et absorbants [Cortat, 2004]. Elle a également été utilisée dans les mesures de réflectance diffuse de matériaux diffusants [Vargas, 2002], dans l'interprétation des données de réflectance diffuse de tumeurs et de tissus sains de cerveau *ex vivo* (les niveaux relatifs d'absorption et de diffusion sont estimés à partir des niveaux relatifs de réflexion mesurés avec la théorie de Kubelka-Munk) [Eggert and Blazek, 1987] et dans la détermination des propriétés optiques de l'oeil dans le domaine visible et proche infrarouge [Farrar *et al.*, 1999].

Cette théorie à deux constantes de Kubelka-Munk n'est strictement valable que pour les milieux diffusants éclairés par un rayonnement diffus isotrope [Cortat, 2004].

D'autres modèles à 4, 6 ou 8 flux existent [Ishimaru, 1978]. Néanmoins, leur utilité est limitée à des géométries simples (exemple : superposition de couches horizontales constituées d'éléments horizontaux ou verticaux uniformément distribués [Pinel, 1997]).

3. Approche expérimentale.

Cette approche utilise des fantômes pour définir les coefficients optiques d'un tissu en comparant la distribution spatiale de la lumière dans ce dernier et dans un fantôme dont les propriétés sont *a priori* connues. L'application de cette méthode est basée sur la règle de similarité selon la théorie de transport radiatif dans les conditions de diffusion multiple [Van de Hulst and Graaff, 1996]. Cette règle définit combien de paramètres du système doivent rester constants pour obtenir un profil de diffusion identique.

[Flock *et al.*, 1992] ont décrit une méthode de préparation de fantôme Intralipid®-Encre de chine ayant la même réflectance diffuse que le muscle de boeuf.

[Dam *et al.*, 2001] ont décrit un instrument capable de mesurer les coefficients d'absorption et de diffusion d'un milieu diffusant. Pour la calibration, ils ont utilisé une matrice de fantômes Intralipid® ayant des propriétés optiques différentes, définies au préalable à l'aide d'une sphère d'intégration. Ils ont mesuré la distribution de la lumière rétrodiffusée du milieu grâce aux données de calibration et ils ont calculé les coefficients par régression polynomiale multiple. Ils ont obtenu une bonne corrélation entre la méthode expérimentale et la simulation numérique.

Cette méthode n'est utilisable que dans le cas d'une approximation de diffusion valide ; elle est limitée par les possibilités de préparation de fantômes ayant des propriétés connues. La réalisation d'une telle méthode paraît simple mais fastidieuse et complexe si l'on veut tenir compte des effets combinés des absorbeurs, diffuseurs et fluorophores des tissus, ce qui est le cas pour nos travaux.

4. Approche par simulation statistique numérique.

Il s'agit d'un principe de propagation aléatoire de rayons (ou migration de photons) utilisé dans les applications des interactions lumière-matière. Cette approche, choisie pour notre étude, est plus particulièrement détaillée dans la section 3.2.2.

5. Approches complémentaires hybrides.

Pour décrire la propagation de la lumière, d'autres équipes combinent les modélisations physique (analytique) et comportementale (statistique). Cependant, cette utilisation n'est pas fréquente.

Par exemple, [Wang, 1998] utilise la simulation de Monte Carlo pour décrire la distribution de la lumière proche de la source et la théorie de la diffusion pour les endroits éloignés de la source puisque dans ce cas, l'approximation de la diffusion est valide. De façon théorique, ces modèles permettent d'améliorer la précision des calculs.

Comme précisé précédemment, la théorie à deux constantes de Kubelka-Munk fournit une expression de la composante diffuse, c'est pourquoi elle sert de base à de nombreux autres modèles (notamment des modèles hybrides en ajoutant une composante spéculaire) [Vargas and Niklasson, 1997] [Vargas, 2002].

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.

3.2.2 Simulation statistique et problématique

Les méthodes de Monte Carlo étaient utilisées depuis plusieurs siècles, mais ce n'est qu'après la seconde guerre mondiale qu'elles ont acquis un véritable statut de méthode. L'utilisation systématique, par Ulam, Metropolis et Von Neumann notamment, est intervenue à Los Alamos, pendant la préparation de la bombe atomique. Elle consistait à simuler directement les problèmes de dispersion et d'absorption de neutrons pour les matériaux fissibles. Dès les premières applications, des méthodes de réduction de la variance ont été utilisées. A partir des années 50, ces méthodes ont été utilisées notamment en sciences physiques, en sciences économiques, pour

le calcul des intégrales, en physique de la matière condensée. . .

Ces méthodes sont très prometteuses puisque leur vitesse de convergence est indépendante de la dimension du problème mathématique posé. En revanche, elles fournissent non pas la solution numérique du problème, mais un intervalle de confiance la contenant avec une probabilité donnée. Les **avantages** de la méthode de Monte Carlo incluent une implémentation facilitée, la capacité à traiter des géométries complexes et inhomogènes, ainsi que la possibilité d'incorporer une dépendance en temps. Il est également possible de modéliser des phénomènes d'onde tels que des phénomènes d'interférences ou de polarisation. Les simulations numériques sont très précises et performantes ; mais, le **principal inconvénient** est la durée des simulations.

Les méthodes de Monte Carlo sont employées pour simuler directement un phénomène macroscopique résultant d'une infinité d'interactions élémentaires. Il est cependant nécessaire de pouvoir décrire le système en terme de fonction de densité de probabilité. On peut ainsi, connaissant la loi de probabilité, faire un tirage aléatoire d'un très grand nombre d'événements pour quantifier macroscopiquement des phénomènes aléatoires à l'échelle microscopique. Il s'agit alors de transformer un problème déterministe en un problème probabiliste [Tuffin, 1997] [Selb, 2002]. Dans le cas de la propagation de la lumière en milieu diffusant, on peut simuler directement le transfert radiatif. L'énergie radiative est simulée à l'aide de photons envoyés successivement dans le milieu.

3.2.2.1 Applications

Plusieurs équipes de recherche utilisent les modélisations de Monte Carlo pour simuler le transport de la lumière en réflectance ou en fluorescence dans des milieux absorbants et très diffusants, notamment en faisant varier la concentration en fluorophore et/ou les coefficients optiques du milieu mais en ne considérant qu'un seul fluorophore par couche et un nombre réduit de longueurs d'onde particulières. Ces méthodes de Monte Carlo sont employées pour pallier la difficulté de résoudre analytiquement des problèmes avec un nombre de variables très important [Murrer *et al.*, 1995] [Mourant, 1997] [Dam *et al.*, 1998] [Bevilacqua and Depeursinge, 1999]. Elles sont très largement utilisées dans les problèmes de propagation de la lumière dans les tissus biologiques pour le diagnostic, le calcul des paramètres optiques *in vivo*. . . [Canpolat and Mourant, 2000a] [Dam *et al.*, 2000] [Alexandrakis *et al.*, 2001] [Hayakawa *et al.*, 2001] [Nair *et al.*, 2002] [Pfefer *et al.*, 2003a] [Thueler *et al.*, 2003].

Des équipes de recherche évaluent également l'effet des géométries des fibres d'excitation et d'émission, aussi bien pour valider les modèles analytiques de fluorescence des tissus, que pour obtenir les coefficients d'absorption et de diffusion [Liu and Ramanujam, 2002] [Zhu *et al.*, 2003]. [Kumar and Singh, 2003] obtiennent le profil 2D de la rétrodiffusion des photons et la distribution de la rétrodiffusion à l'intérieur de tissus (cœur, rate, tissus adipeux). [Hourdakakis and Perris, 1995] utilisent la simulation Monte Carlo pour améliorer la dosimétrie utilisée à des fins thérapeutiques. [Meglinski and Matcher, 2003] calculent les spectres de réflectance diffuse de la peau humaine dans la région spectrale visible et proche infra-rouge en utilisant cette technique de Monte Carlo sans fluorescence.

3.2.2.2 Principe général de la simulation de propagation de photons par méthode de Monte Carlo

Le principe consiste à « découper » l'énergie lumineuse incidente en paquets d'énergie, décrits par leurs positions dans l'espace des phases. Ces paquets d'énergie subissent des cascades aléatoires d'événements qui correspondent à une description des processus élémentaires que sont les émissions de lumière, les propagations, les diffusions, les changements de milieux et les absorptions. La description élémentaire des phénomènes est identique à celle mise en œuvre pour obtenir l'équation de transfert radiatif et ne fait pas intervenir d'approximation supplémentaire. La solution est obtenue de manière statistique, en analysant l'histoire d'un grand nombre de paquets d'énergie. La précision du résultat dépend du nombre de réalisations, c'est-à-dire du nombre de photons lancés lors de la simulation. Cependant, la précision est proportionnelle à $1/\sqrt{N}$ où N est le nombre de photons lancés. Ainsi, pour obtenir une erreur relative inférieure à une dizaine de pourcent, dans un cas simple d'absorption et de diffusion moyen, un nombre important de photons doit être envoyé (entre 10^6 et 10^9) donc un temps machine important [Prah, 1988].

Le schéma de la figure 3.13 illustre le principe de migration aléatoire de photons. Injectés en (X_0, Y_0, Z_0) en très grand nombre par une source lumineuse, ils subissent, chacun à leur tour, un déplacement dans des directions et sur des distances tirées au sort suivant des fonctions de densités de probabilités caractéristiques du milieu (fonctions de μ_a , μ_s , g). Afin de réduire le nombre de photons à envoyer, chaque photon est en fait considéré comme un paquet de photons de « poids ou d'énergie » fictive unitaire partiellement perdue à chaque événement d'absorption jusqu'à un certain seuil au-dessous duquel il n'est plus propagé.

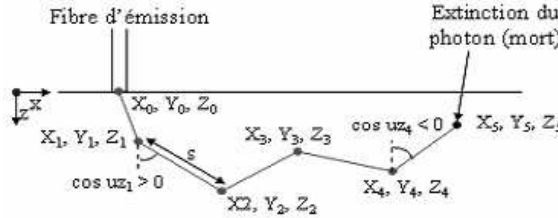


FIG. 3.13 – Principe de migration aléatoire du photon.

Brièvement, chaque photon est lancé à partir de la position d'injection (X_0, Y_0, Z_0) et possède un « poids » de 1. Chaque nouvelle direction 3D de la trajectoire du photon est déterminée par un échantillonnage statistique.

Le principe consiste à générer des nombres aléatoires x selon une distribution $p(x)$ spécifique. Par exemple, la probabilité, pour que le photon soit diffusé à une distance l , est définie comme suit :

$$p(l) = e^{-\mu_s l} \quad (3.61)$$

En utilisant la fonction de distribution cumulative $\xi(x) = \int_0^x p(x') dx'$, nous pouvons transformer le problème en générant un nombre aléatoire $\xi \in [0, 1]$ distribué uniformément tel que :

$$\xi = \int_0^l e^{-\mu_s x} dx = 1 - e^{-\mu_s l} \quad (3.62)$$

La distance entre les différents événements est ainsi donnée par :

$$l = -\frac{1}{\mu_s} \ln(1 - \xi) \quad (3.63)$$

En opérant le changement de variable $\xi' = 1 - \xi$:

$$l = -\frac{1}{\mu_s} \ln(\xi') \quad \text{pour } \xi' \in [0, 1] \quad (3.64)$$

La distance parcourue dans la nouvelle direction entre deux événements (pas Δs variable) est donc tirée au sort selon une fonction de densité de probabilité dépendant des paramètres optiques ($\mu_a(\lambda)$, $\mu_s(\lambda)$) de la couche telle que :

$$\Delta s = -\frac{\ln \xi}{\mu_t} \quad (3.65)$$

De la même manière, les angles de déflexion $\theta \in [0, \pi]$ (angles choisis aléatoirement en fonction de $g(\lambda)$ de manière à être compatible avec l'équation de transfert radiatif) et azimuthal⁷ $\phi \in [0, 2\pi]$, relatifs à la précédente direction du mouvement, sont obtenus grâce aux fonctions suivantes (en considérant la fonction de phase d'Henye-Greenstein) :

$$\begin{cases} \cos\theta &= \frac{1}{2g} \left[1 + g^2 - \left(\frac{1 - g^2}{1 - g + 2g\xi_2} \right) \right] \\ \phi &= 2\pi \xi_1 \end{cases} \quad (3.66)$$

avec ξ_1 et $\xi_2 \in [0, 1]$ des nombres aléatoires distribués uniformément.

Après chaque déplacement, le photon dépose, aux coordonnées auxquelles il se trouve dans le milieu, une partie de son « poids » par absorption, proportionnelle au rapport des coefficients optiques. La course de chaque photon se termine soit lorsque, ayant subi un nombre suffisant d'absorption, son poids n'est plus suffisant pour lui permettre de poursuivre, soit lorsqu'il sort du milieu. Les poids des photons sortant du milieu aux coordonnées correspondantes aux positions des fibres d'émission sont finalement comptabilisés.

Le paragraphe 3.2.2.4 précise tous ces éléments.

3.2.2.3 Problématique

Le transport de la lumière résolu spatialement est bien décrit dans la littérature [Prah et al., 1989] [Wang et al., 1995] [Jacques, 1998]. Ces articles nous ont servi de base pour développer notre algorithme d'absorption/diffusion. En fluorescence, nous nous sommes inspirés de [Liu et al., 2003]. Nous présentons ci-dessous quelques-uns des travaux les plus récents sur la simulation de fluorescence.

[Drezek et al., 2001] ont développé un modèle de Monte Carlo afin d'examiner quantitativement la contribution de la fluorescence intrinsèque de NaDH et de collagène dans les spectres mesurés de tissus. [Churmakov et al., 2003] ont simulé une distribution spatiale de l'excitation de fluorescence dans un modèle de peau humaine. Dans cette simulation, chaque paquet de photon ne

⁷Angle avec le plan précédent.

produit qu'un événement fluorescent. Les résultats de la simulation suggèrent que la distribution d'auto fluorescence est sensiblement supprimée dans la région spectrale proche-infrarouge. [Liu *et al.*, 2003] ont permis de valider un algorithme de simulation intégrant le couplage en fluorescence pour un modèle monofluorophore et monocouche. A partir des paramètres μ_{af} (coefficient d'absorption du fluorophore) et ϕ (rendement quantique de fluorescence) pour la simulation, les auteurs définissent une probabilité p d'absorption pour la fluorescence : $p = \mu_{af}/(\mu_a + \mu_{af} + \mu_s)$. Une validation expérimentale est montrée sur fantômes (encre, billes de polystyrène, FAD⁸) à différentes concentrations, avec une excitation à 460 nm et une mesure en émission à 520 nm. [Chang *et al.*, 2004] ont présenté un modèle analytique du spectre de fluorescence d'un milieu bi-couches de tissu épithélial normal et pré-néoplasique et comparent des résultats entre les simulations de Monte Carlo et le modèle analytique. Ils considèrent que dans la couche épithéliale, l'absorption de la lumière est la plupart du temps causée par le fluorophore. En conséquence, tout le poids du photon absorbé contribue à l'émission de fluorescence. Dans le papier de [Matszrak *et al.*, 2004], la simulation des spectres de fluorescence se compose de deux parties : la simulation du spectre d'excitation puis la simulation des spectres des photons émis. [Skala *et al.*, 2004] comparent l'influence de la géométrie de deux sondes à fibres optiques différentes pour diagnostiquer des tumeurs pré-cancéreuses dans les tissus épithéliaux *in vivo*. Ils utilisent un modèle de Monte Carlo pour simuler des mesures de fluorescence avec un modèle de tissu épithélial et avec une sonde à fibres optiques permettant d'exploiter au maximum les propriétés de fluorescence des tissus épithéliaux dépendants de la profondeur sondée.

Les programmes de simulation développés dépendent des besoins spécifiques des travaux menés par les différentes équipes de recherche. Le modèle de tissu peut être mono ou multi-couches, gérer plusieurs absorbeurs ou de la fluorescence ou envoyer différentes quantités de photons. La plupart des programmes de simulation ont été développés en langage C pour sa rapidité, sa robustesse et sa souplesse. Ces programmes de simulation de fluorescence multiple autorisent l'accès aux spectres de fluorescence intrinsèque des différentes couches des tissus. En effet, il existe plusieurs fluorophores intrinsèques d'intérêt dans les tissus (NADH, flavine, collagène, élastine) dont les spectres interfèrent [Ramanujam, 2000]. Une des difficultés actuelles réside dans la simulation couplée de l'absorption, de la diffusion et de la fluorescence multiple dans un milieu multi-couches, sur une large bande spectrale au lieu d'une seule ou deux longueurs d'onde, comme réalisé actuellement.

Pour nos applications, le programme de simulation de parcours de photon doit permettre la sélection de différents paramètres tel que : le nombre de photons, leur longueur d'onde, l'épaisseur du milieu, le nombre de couches le constituant, le coefficient de réflexion et les paramètres physiques du milieu ($g(\lambda)$, $\mu_a(\lambda)$, $\mu_s(\lambda)$) et la gestion de la fluorescence du milieu. Il doit également permettre de simuler l'absorption et la dispersion de la lumière dans le cas où nous mettrions des sources de lumière polychromatiques.

Au cours de nos travaux, nous nous proposons de mettre en œuvre une simulation statistique en diffusion multiple et fluorescence. La fluorescence prendra en compte les caractéristiques spectrales (absorption et émission) d'un ou plusieurs fluorophores dans une ou plusieurs couches d'un milieu homogène isotrope (par couche), chaque couche étant paramétrable séparément.

⁸Fluorophore FAD : Flavin Adenin Dinucleotide.

3.2.2.4 Caractéristiques du simulateur développé

Comme nous l'avons souligné dans le paragraphe 1.2.3.2, l'autofluorescence et la diffusion multiple des photons modifient les caractéristiques d'émission spectrale des tissus biologiques. Pour extraire ces informations, il est nécessaire de développer un modèle optique approprié aux tissus biologiques et de résoudre le problème de propagation du rayonnement dans ce milieu. Pour modéliser le comportement optique des tissus, un modèle générique stratifié est utilisé (Fig. 3.14) dans lequel chaque couche homogène est décrite par un ensemble de paramètres caractéristiques (épaisseur, indice de réfraction, coefficients d'absorption, de diffusion et d'anisotropie, spectres d'excitation et d'émission des fluorophores, concentrations moléculaires, ...).

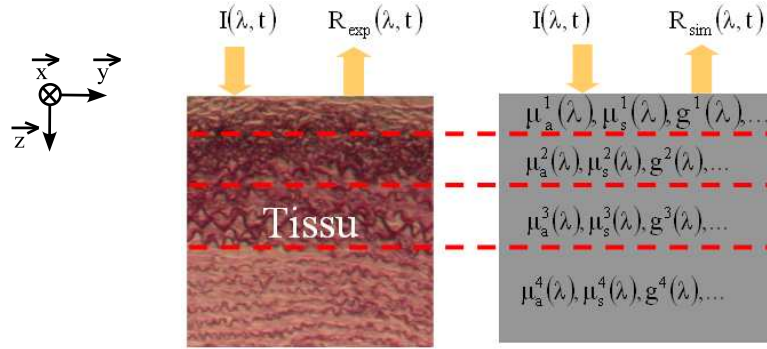


FIG. 3.14 – Schéma du modèle optique stratifié de tissu. $I(\lambda, t)$ et $R(\lambda, t)$ sont respectivement les intensités spectrales incidente et rétrodiffusée ; $\mu_a^i(\lambda)$, $\mu_s^i(\lambda)$ et $g^i(\lambda)$ les coefficients d'absorption, de diffusion et d'anisotropie de la couche i du modèle de tissu.

Le programme développé simule donc la trajectoire des photons dans un milieu multi-couches semi-infini (épaisseurs définies). L'absorption prend en compte les deux transitions : radiatives (avec absorption ou émission de lumière : la fluorescence) et non radiatives (sans émission de lumière). Le milieu est caractérisé par ses propriétés optiques ($\mu_a(\lambda)$, $\mu_s(\lambda)$ et $g(\lambda)$) liées aux différentes couches et interfaces d'indice de réfraction n . Le milieu de propagation est modélisé par une matrice 3D dont les dimensions et la maille élémentaire sont définies par l'utilisateur. Aucune hypothèse n'est nécessaire quant à la géométrie du milieu et ce type de simulation permet de traiter des cas complexes [Boas *et al.*, 2002].

L'utilisateur définit un nombre de photons ($N_{photons}$) qui vont se propager l'un après l'autre dans le milieu, longueur d'onde par longueur d'onde ; les événements successifs subis par le photon sont traités indépendamment les uns après les autres : les photons n'interagissent pas entre eux. Chaque photon est caractérisé par plusieurs variables dont la valeur est modifiée au cours de la propagation :

- la position actuelle du photon est décrite par ses trois coordonnées x , y et z ,
- sa trajectoire est définie par ses cosinus directeurs (cosinus de l'angle du photon par rapport à l'axe abordé) u_x , u_y et u_z ,
- le « poids » W du photon permet de prendre en compte les effets de l'absorption.

Le programme traite séparément les n échantillons du spectre pouvant aller de 300 à 1000 nm, par pas de 10 nm, ce qui permet de déterminer un spectre en longueur d'onde.

N'importe quel spectre source peut être défini dans le simulateur : lampe deutérium-halogène, diode laser, DELs associées... Ce spectre module l'amplitude du résultat du spectre d'émission.

Le nombre de photons injecté identiquement pour chaque longueur d'onde dépend de la précision attendu sur le résultat.

De nombreux paramètres sont modifiables tels que le seuil minimum d'énergie du photon, le nombre de positions radiales, les indices de réfraction du tissu, de l'air et des fibres optiques, le rayon et la position des fibres, le nombre de sources, les interfaces. . .

Description de la simulation de la propagation de la lumière dans un milieu absorbant et diffusant (sans fluorescence)

Pour une longueur d'onde donnée, le comportement d'un photon dans le milieu peut être décrit comme suit (cf. organigrammes 3.15 et 3.16) :

- le « poids » initial du photon est fixé à 1 et ses position et direction initiales sont déterminées. Quelle que soit la source, tous les photons sont lancés à partir de la même hauteur initiale ($z = 0$) et répartis uniformément sur le rayon de la fibre optique (différents x et y selon les photons),
- une fois la position et la direction initiales du photon déterminées, le pas Δs du premier événement de diffusion et les angles de propagation sont générés de façon aléatoire. Le poids est diminué de l'albedo (proportion d'énergie qui n'a pas été absorbée pendant l'événement). L'albedo du tissu, qui dépend uniquement de $\mu_a(\lambda)$ et de $\mu_s(\lambda)$, est calculé pour déduire la proportion d'énergie absorbée :

$$\begin{cases} albedo &= \frac{\mu_s(\lambda)}{\mu_a(\lambda) + \mu_s(\lambda)} \\ absorb &= W \times (1 - albedo) = W \times \frac{\mu_a(\lambda)}{\mu_a(\lambda) + \mu_s(\lambda)} \end{cases}$$

absorb est la quantité d'énergie absorbée et W l'énergie actuelle du photon.

- l'angle de rediffusion est alors calculé en utilisant la distribution de probabilités donnée par la fonction de phase d'Henye-Greenstein (équation 3.66). La nouvelle direction de propagation est déduite de cet angle de rediffusion. La nouvelle longueur de propagation Δs est calculée de la même façon que précédemment. Le photon est déplacé de Δs selon sa nouvelle direction,
- le processus est réitéré jusqu'à ce qu'un des événements suivants se produise : soit le photon sort du milieu sans rencontrer de fibres et disparaît, soit le photon sort dans une fibre de rétrodiffusion ou de transmission (intensité comptabilisée), soit le « poids » du photon est inférieur à une valeur limite prédéfinie et est absorbé définitivement, soit il est absorbé par un fluorophore.

Un nouveau photon est alors lancé et subit le même processus, pour une longueur d'onde donnée. L'opération est répétée jusqu'à atteindre le nombre total de photons initialement défini. Tous les photons étant lancés l'un après l'autre, le temps de calcul est proportionnel au nombre de photons lancés. Les paramètres de la longueur d'onde suivante sont ensuite chargés ($g(\lambda)$, $\mu_a(\lambda)$, $\mu_s(\lambda)$) et le calcul est relancé.

Lancée de photons :

A chaque lancement de photons, deux sortes de photons peuvent être différenciées :

- les *photons émis par la source* : leurs positions sont aléatoires et comprises dans la surface de la fibre d'émission ; leur première trajectoire est également aléatoire et comprise dans l'angle d'ouverture numérique de la fibre d'émission,
- les *photons émis par les fluorophores* : leurs positions correspondent aux lieux où les photons ont été absorbés par les fluorophores. La direction de leur première trajectoire est tirée aléatoirement entre 0 et 360° (émission isotrope puis propagation selon les propriétés du milieu).

Réflexion et réfraction aux interfaces :

Lorsque le photon atteint une interface entre deux milieux (caractérisés par leur coefficient de réfraction), il peut y avoir un changement des propriétés optiques et le photon peut être soit réfléchi, soit réfracté (Fig. 3.2) :

- soit il est complètement *réfracté* : $n_i < n_t$ avec n_i et n_t les indices de réfraction du milieu incident et transmis. Dans ce cas, il n'existe pas d'angle critique ;
- soit il est complètement *réfléchi* : $n_i > n_t$ et $\alpha_t > \alpha_c$ où α_t représente l'angle de transmission et α_c l'angle critique ;
- soit il est *réfracté* ou *réfléchi* : $n_i > n_t$ et $\alpha_t < \alpha_c$ en fonction du coefficient de réflexion R calculé (formule de Fresnel) et d'un nombre aléatoire.

Le coefficient de réflexion est calculé grâce à la formule de Fresnel :

$$R = \frac{1}{2} \left[\frac{\sin^2(\alpha_i - \alpha_t)}{\sin^2(\alpha_i + \alpha_t)} + \frac{\tan^2(\alpha_i - \alpha_t)}{\tan^2(\alpha_i + \alpha_t)} \right] \quad (3.67)$$

α_i est l'angle formé entre la normale à l'interface et la trajectoire du photon, α_t est l'angle de réfraction calculé et α_c est l'angle critique au-delà duquel le photon sera totalement réfléchi.

Ainsi, nous pouvons calculer en fonction de la trajectoire du photon la probabilité que le photon soit réfléchi dans le milieu d'où il vient ou réfracté dans le milieu suivant. Deux méthodes de simulation existent pour connaître la destination du photon :

- la *Méthode de la réflexion partielle*. R représente la proportion d'énergie réfléchie et $(1 - R)$ la proportion d'énergie réfractée. Lorsque le photon franchit une frontière, son énergie W est divisée : une partie ($W \times R$) est réfléchie dans le milieu d'incidence et l'autre partie ($W \times (1 - R)$) est réfractée dans le milieu suivant. Cette méthode est surtout utilisée dans le cas où le milieu de transmission est le milieu ambiant, la partie transmise du photon est alors comptabilisée dans une matrice résultat puis éliminée,
- la *Méthode du Tout Ou Rien* (**implémentée dans notre programme**) préférentiellement utilisée lorsque le photon doit être suivi des deux côtés de la frontière (cas d'un changement de couche dans le milieu). Nous considérons que R représente la probabilité que le photon soit réfléchi dans le milieu incident. Après avoir calculé R , un nombre aléatoire est tiré entre 0 et 1 (distribution uniforme). Si ce nombre est inférieur ou égal à R , alors la totalité du photon sera réfléchi. Sinon, le photon sera totalement réfracté dans le milieu suivant.

Photon rencontrant la limite d'une couche :

Après chaque pas, si un changement de couche a lieu, le photon est ramené à la frontière des deux milieux. Ensuite, nous déterminons d'après les propriétés optiques de chaque milieu si le photon va être réfracté ou réfléchi. S'il est réfracté, le pas du photon est corrigé en fonction des paramètres du nouveau milieu ; s'il est réfléchi, nous calculons ses nouvelles coordonnées. Après avoir calculé les nouvelles coordonnées du photon, nous vérifions que celui-ci n'a pas franchi d'autres limites.

Trajectoire et « mort » des photons :

Après son parcours dans le milieu, le photon peut terminer son cheminement de trois façons différentes :

- soit *il ne possède plus d'énergie* (son énergie est descendue en dessous d'un seuil prédéfini). Lorsque l'énergie du photon atteint ce seuil, il subit une épreuve de roulette russe [Hendricks and Booth, 1985] [Prah, 1988]. Cette technique de réduction de la variance est utilisée pour réduire le nombre de photons nécessaires pour atteindre la précision souhaitée de la simulation.
Un nombre aléatoire est tiré (toujours entre 0 et 1 avec une distribution uniforme). Si ce nombre est inférieur à la variable « chance », son énergie se voit multipliée par un facteur $1/\text{chance}$. S'il est supérieur à la variable « chance », le photon est définitivement éliminé et nous passons au suivant,
- soit *il est réfracté en dehors du tissu* : il est soit comptabilisé dans une fibre de réception en transmission ($z > 0$) ou en réflectance ($z < 0$) s'il se situe dans le rayon de la fibre, soit éliminé,
- soit *il est absorbé par un fluorophore* : dans ce cas, le photon est totalement absorbé et un nouveau photon est réémis à une autre longueur d'onde et avec un niveau d'énergie calculé en fonction des paramètres du fluorophore (cf. paragraphe 3.3).

Résolution temporelle :

Le simulateur permet également de travailler en « résolution temporelle ». Les temps de parcours des photons dans le milieu sont calculés (pour ceux qui ressortent dans les fibres). Nous utilisons la formule :

$$\Delta t = \frac{\Delta s}{v} = \frac{n \Delta s}{c_0} \quad (3.68)$$

et $t = \sum_i \Delta t$

Δt est la durée d'un parcours Δs entre deux événements, v la vitesse, n l'indice de réfraction du tissu, c_0 la célérité de la lumière dans le vide, t le temps de parcours total d'un photon comptabilisé dans une fibre de réception et i le nombre de pas Δs effectués par un photon au cours de toute sa trajectoire.

Par ailleurs, plusieurs représentations graphiques ont été créées pour vérifier visuellement le fonctionnement du simulateur. La première représentation permet de suivre le parcours des photons en pas à pas dans les différentes couches du milieu. Lorsqu'un photon est absorbé par un fluorophore et réémis, il change de couleur dans la fenêtre graphique. D'autres fenêtres graphiques représentent l'énergie déposée par les photons dans le milieu soit sous forme de coupes (2D), soit sous forme de volume.

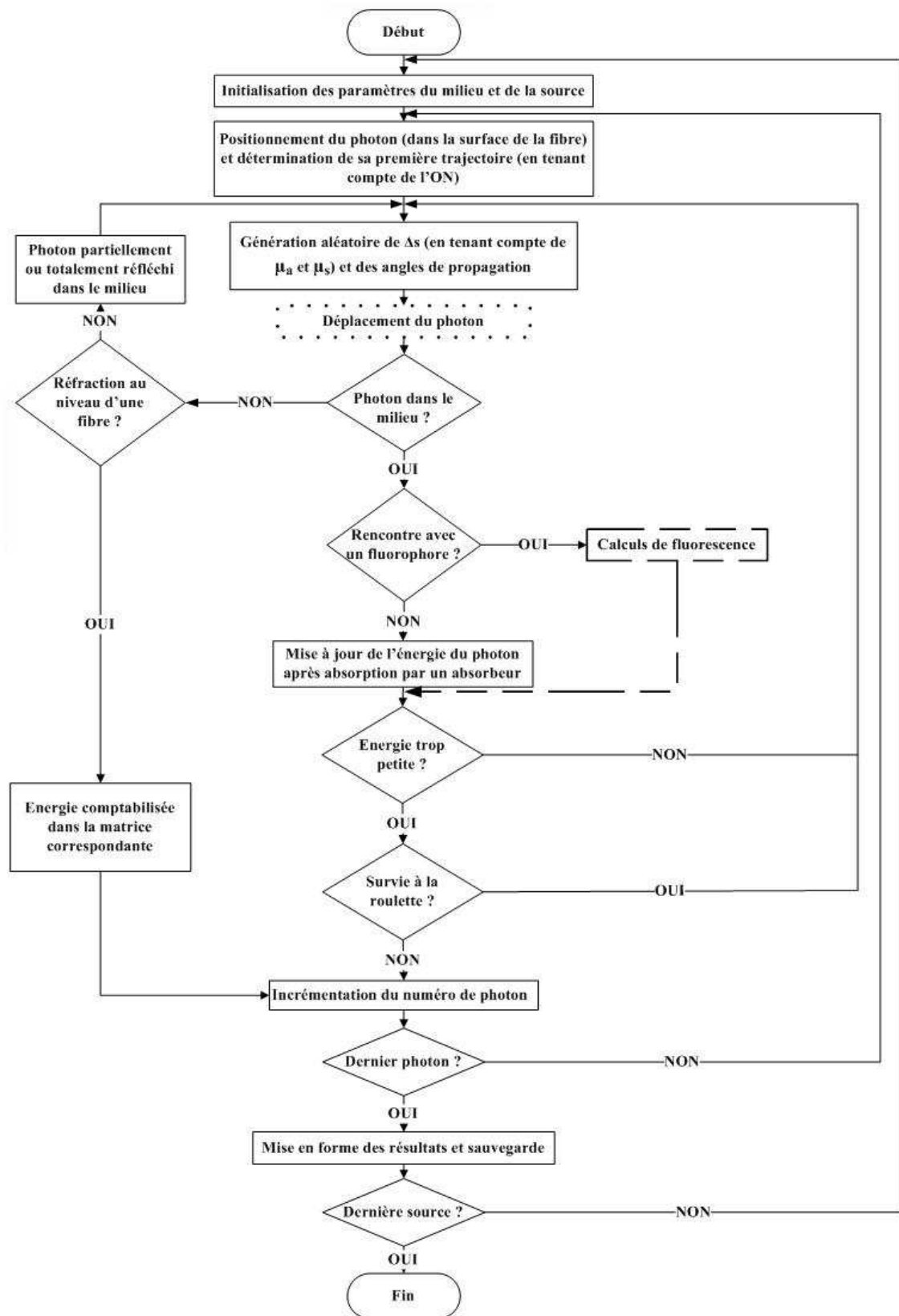


FIG. 3.15 – Organigramme du programme de simulation de Monte Carlo.

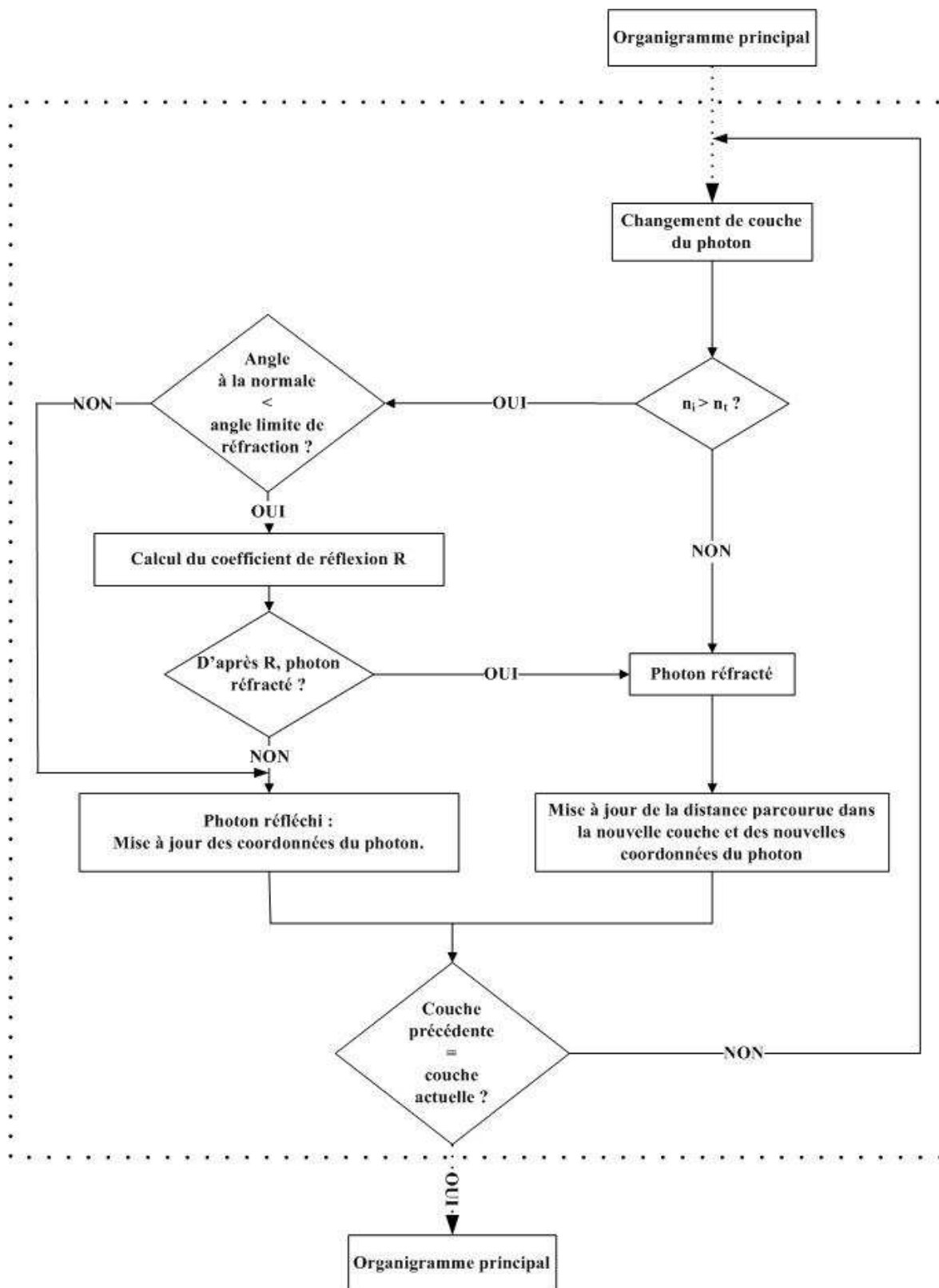


FIG. 3.16 – Détails de l'organigramme sur le déplacement des photons.

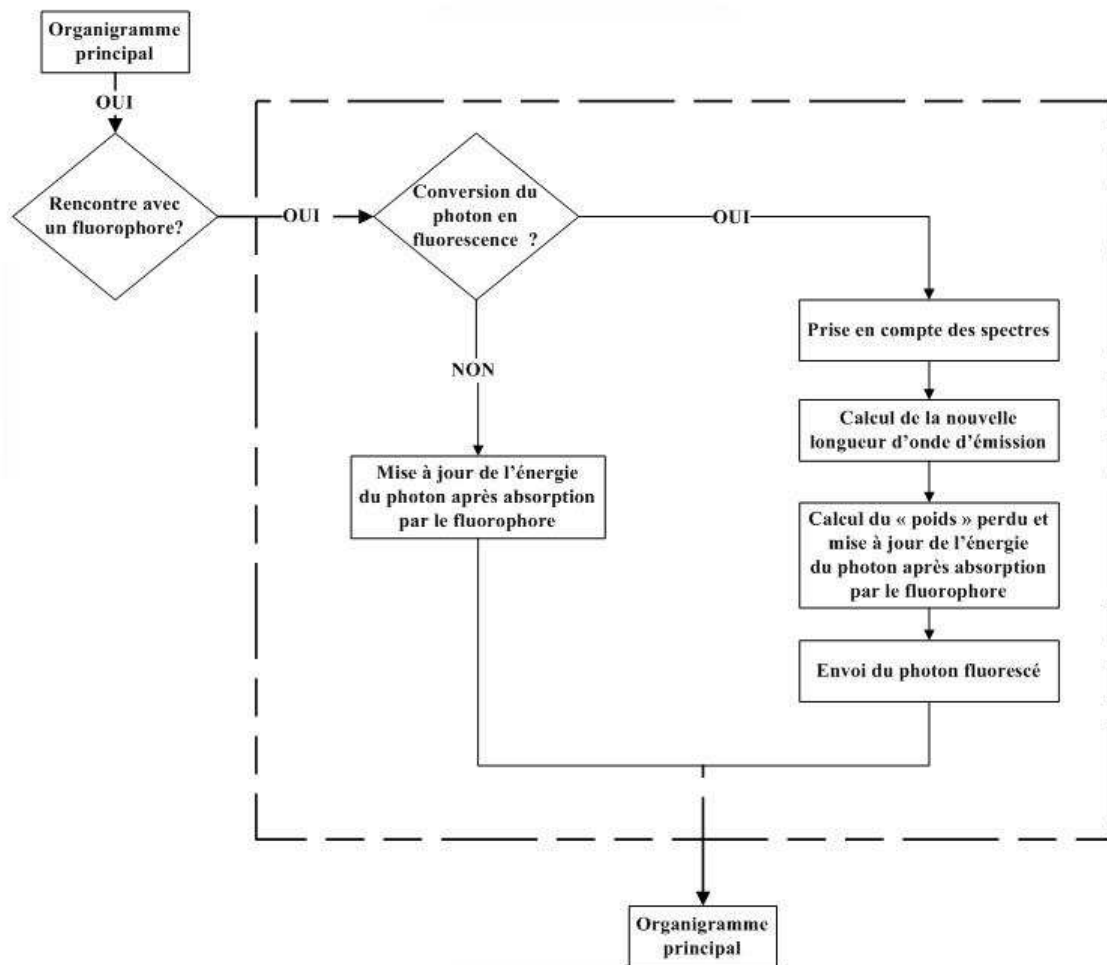


FIG. 3.17 – Détails de l'organigramme sur la fluorescence.

3.3 Solution proposée pour implémenter la fluorescence multiple

Comme nous l'avons vu précédemment (section 3.2.2), les principaux travaux publiés concernent la validation d'algorithmes de simulation intégrant le couplage en fluorescence pour des modèles mono-fluorophore et/ou mono-couche.

Nous nous proposons d'implémenter une solution pour intégrer plusieurs fluorophores dans un modèle mono- ou multi-couche(s). L'excitation des fluorophores est prise en compte en fonction de leur absorbance et de leur rendement quantique spectraux (qui peuvent être différents pour chaque couche). Techniquement, les paramètres d'absorption et d'émission, le rendement quantique et le coefficient d'absorption du fluorophore sont stockés dans un fichier spécifique pour chaque fluorophore.

Les différentes étapes décrites ci-dessous sont représentées sur l'organigramme 3.17.

Considérons un milieu composé d'un (ou plusieurs) absorbeur(s) de coefficient total d'absorption μ_a , d'un (ou plusieurs) diffuseur(s) de coefficient total de diffusion μ_s et de i fluorophores de coefficients d'absorption μ_{af_i} et de rendements quantiques ϕ_i .

En présence de fluorophores, le pas Δs , défini en (3.65), est calculé comme :

$$\begin{aligned} \Delta s &= -\frac{\ln \xi}{\mu_t} \\ \text{avec} \quad \mu_t &= \mu_a + \sum_i \mu_{af_i} + \mu_s \end{aligned} \quad (3.69)$$

Le test permettant de déterminer un événement d'**absorption par un fluorophore ou non** est réalisé à chaque changement de coordonnées. On tire un nombre aléatoire uniformément distribué $\xi \in [0, 1]$ et on calcule un nouveau nombre « normalisé » :

$$\xi_{norm} = \xi \times \left(\frac{\mu_a + \sum_i \mu_{af_i}}{\mu_t} \right) \quad (3.70)$$

La probabilité que le photon soit absorbé par un absorbeur « pur » est définie par :

$$p_{abs} = \frac{\mu_a}{\mu_t} \quad (3.71)$$

La probabilité que le photon soit absorbé par un fluorophore f_i est :

$$p_{f_i} = \frac{\mu_{af_i}}{\mu_t} \quad (3.72)$$

De sorte que :

pour $0 \leq \xi_{norm} < p_{abs}$
 $\Rightarrow$ le photon sera purement absorbé

pour $p_{abs} \leq \xi_{norm} < p_{abs} + p_{f_1}$
 $\Rightarrow$ le photon sera absorbé par le fluorophore f_1

pour $p_{abs} + \sum_{i=1}^{nf_{max}-1} p_{f_i} \leq \xi_{norm} \leq p_{abs} + \sum_{i=1}^{nf_{max}} p_{f_i}$ avec $nf_{max} \in [2, 10]$
 $\Rightarrow$ le photon sera absorbé par un fluorophore f_i

Le nombre maximal nf_{max} de fluorophores f_i pouvant être défini par couche est fixé arbitrairement à 10.

Nous réalisons donc une répartition proportionnelle par rapport aux probabilités trouvées. Si le photon est absorbé par un absorbeur « pur », il dépose de l'énergie conformément au schéma classique (section 3.2.2.4). Si le photon est absorbé par un fluorophore f_i , la probabilité qu'il soit **converti en fluorescence ou non** doit être prise en compte en fonction du rendement quantique du fluorophore. Comme précédemment, on tire un nombre aléatoire ξ uniformément distribué entre 0 et 1.

- $\phi < \xi \leq 1$: si le nombre aléatoire tiré est supérieur au rendement quantique ϕ , alors *le photon n'est pas converti en fluorescence*. Il se comporte alors comme un « absorbeur pur » et poursuit son chemin jusqu'au prochain événement, après avoir mis à jour son niveau d'énergie.

$$absorb = W \times \frac{\mu_{af_i}}{\mu_a + \sum_i \mu_{af_i} + \mu_s} \quad (3.73)$$

avec *absorb* la quantité d'énergie absorbée et donc déposée à l'« impact », W l'énergie actuelle du photon, μ_{af} représente le coefficient d'absorption du fluorophore considéré, μ_a et μ_s les coefficients d'absorption et de diffusion du milieu.

- Si $0 \leq \xi \leq \phi$, alors *le photon est converti en fluorescence*. Son énergie restante n'est pas comptabilisée ; il disparaît et un photon de fluorescence est généré à l'endroit où il a été absorbé suivant une nouvelle direction totalement aléatoire : l'angle de réémission est tiré au sort entre 0° et 360° . La longueur d'onde du nouveau photon est choisie aléatoirement d'après la courbe d'émission du fluorophore. L'énergie absorbée, et donc perdue, s'écrit : $W \times \phi$.

Pour la détermination de la **longueur d'onde d'émission** d'un nouveau photon de fluorescence, nous avons envisagé deux approches :

1. soit le photon est émis à une longueur d'onde tirée aléatoirement selon une distribution de probabilité correspondant au spectre d'émission, quelque soit la longueur d'onde d'absorption. Par exemple, si le fluorophore a un pic d'émission à 650 nm, la probabilité d'émission du fluorophore sera la plus forte à cette longueur d'onde,

2. soit nous nous servons de la valeur de la longueur d'onde pour laquelle le photon a été absorbé, afin de connaître la longueur d'onde d'émission. Par exemple, un photon absorbé en début de spectre d'absorption a une plus grande chance d'être émis en début de spectre d'émission. Le comportement d'absorption conditionnerait alors le comportement d'émission.

Nous avons donc choisi d'implémenter la 1^{ère} solution. La perte d'énergie est calculée en récupérant l'énergie restante du photon et en la pondérant avec le spectre d'émission. Le choix du fluorophore se fait de manière homogène et aléatoire, avant le calcul de l'absorption. Un photon de fluorescence peut provoquer ou non une autre chaîne de fluorescence (mode cascade).

Par ailleurs, un photon absorbé à une longueur d'onde λ_{abs} ne pourra pas être réémis à une longueur d'onde inférieure à λ_{abs} .

Ainsi, connaissant les valeurs du spectre d'émission $v(\lambda_j)$ pour chaque fluorophore dans une bande de longueur d'onde donnée, nous calculons la probabilité d'émission d'un photon de fluorescence à la longueur d'onde λ_j :

$$p[\text{photon}(\lambda_j)] = v'(\lambda_j) \quad (3.74)$$

où $j \in [1, n]$, n correspond ici au nombre de longueurs d'onde de discrétisation du spectre et $v'(\lambda_j)$ correspond au pourcentage d'apparition de ces valeurs dans le spectre d'émission tel que :

$$v'(\lambda_j) = \frac{v(\lambda_j)}{\sum_{j=1}^n v(\lambda_j)} \quad (3.75)$$

En utilisant la fonction de distribution cumulative $\xi = \sum_{j=1}^n v'(\lambda_j)$, nous obtenons :

$$\left\{ \begin{array}{ll} \text{si } \xi \leq v'(\lambda_1) & \text{alors le photon sera émis à la longueur d'onde } \lambda_1 \\ \text{si } v'(\lambda_{i-1}) < \xi \leq v'(\lambda_i) & \text{alors le photon sera émis à la longueur d'onde } \lambda_i \end{array} \right. \quad (3.76)$$

avec $i \in [2, n]$ et $\xi \in [0, 1]$ nombre aléatoire uniformément distribué.

Finalement, le tableau (3.2) récapitule les caractéristiques des deux principaux programmes existant dans la littérature [Wang *et al.*, 1995] [Liu *et al.*, 2003] et celles de l'algorithme développé au laboratoire.

3.4 Validation théorique

Différents tests d'épreuve ont été réalisés avant de travailler sur des fantômes. Nous avons effectué un grand nombre de simulations avec différents profils spectraux de coefficients d'absorption et de diffusion. Par ailleurs, nous avons comparé nos résultats de réflectance avec ceux de la littérature en nous plaçant dans les mêmes configurations. Enfin, pour valider le comportement de l'ensemble du programme et surtout de la fluorescence, nous avons comparé les spectres simulés et les spectres expérimentaux obtenus avec le dispositif expérimental sur plusieurs fantômes mono et multi-couches (absorption, diffusion, fluorescence) : intralipides, encre de chine, fluorophores émettant dans différentes bandes spectrales (fluorescéine, cryptocyanine, éosine).

TAB. 3.2 – Comparaison des caractéristiques de différentes simulations.

Caractéristiques	Sources		
	Mcml [Wang <i>et al.</i> , 1995]	Mcmf [Liu <i>et al.</i> , 2003]	Notre approche
Simulateur	Multi-couches	Multi-couches	Multi-couches
Absorption et Diffusion	Par proportion d'énergie	Méthode du Tout ou Rien	Par proportion d'énergie
Fluorescence	Non	Un fluorophore	- Spectres d'absorption/émission - Plusieurs fluorophores - Effet « Cascade »

3.4.1 Exemples de résultats de simulation en absorption/diffusion

Nous simulons la propagation des photons entre 600 et 800 nm dans un milieu constitué d'une couche de 6 mm, nous lançons 500 000 photons par longueur d'onde. Les paramètres optiques du milieu sont connus et différents selon les simulations.

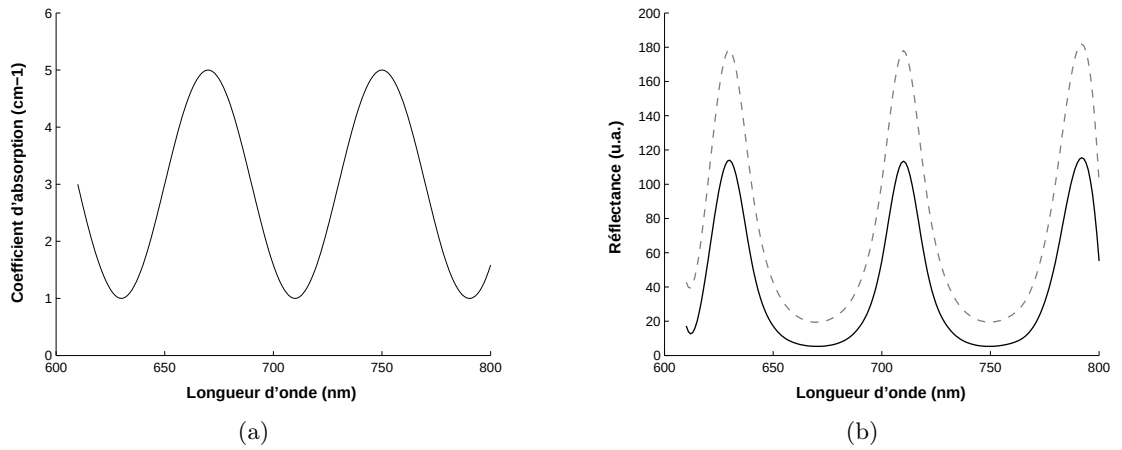


FIG. 3.18 – (a) μ_a sinusoïdal, (b) Réflectance simulée μ_a sinusoïdal et $\mu_s = 100$, à deux distances entre les fibres d'émission et de réception (0,53 et 1,74 mm respectivement en traits pointillé et continu).

Sur la figure 3.18, nous pouvons noter les pics et les creux d'intensité du spectre de réflectance aux longueurs d'onde correspondant (avec une déformation non-linéaire) respectivement aux creux et pics des valeurs du coefficient d'absorption. Nous remarquons également que l'intensité moyenne (c'est-à-dire le nombre de photons recueillis) est plus faible pour la distance inter-fibres la plus grande.

La figure 3.19 montre la diminution de la réflectance en fonction de la longueur d'onde conformément à la diminution de la valeur du coefficient de diffusion en fonction de la longueur d'onde. Nous notons que si l'intensité de réflectance moyenne est plus faible pour la fibre la plus éloignée, l'allure des deux courbes est légèrement différente avec une diminution plus marquée pour la distance la plus courte.

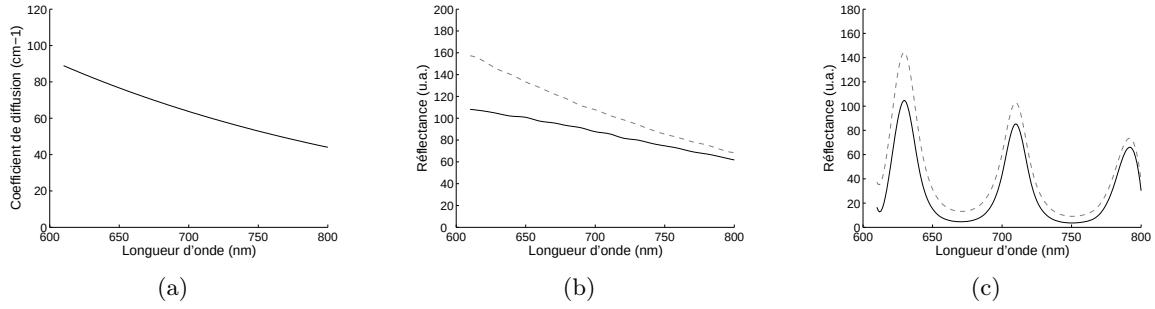


FIG. 3.19 – (a) μ_s exponentiel décroissant, (b) Réflectance simulée $\mu_a = 1$ et μ_s exponentiel décroissant, à deux distances entre les fibres d’émission et de réception (0,53 et 1,74 mm respectivement en traits pointillés et continus), (c) Réflectances simulées pour μ_s exponentiel décroissant et un μ_a sinusoïdal.

Après avoir répété les simulations en faisant varier les paramètres optiques de $\pm 5\%$, nous avons obtenu des spectres significativement différents (test Student-Fisher, $p < 0,05$).

3.4.2 Comparaison des données issues de notre algorithme et des données de la littérature

Pour vérifier le fonctionnement correct de notre algorithme, nous comparons nos résultats aux résultats connus de simulation de Monte Carlo pour un modèle de tissu identiquement paramétré. Ainsi, nous calculons la réflectance diffuse totale d’un milieu trouble, avec des indices bien définis. Les propriétés optiques choisies sont les suivantes : $\mu_a = 10 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 90 \text{ cm}^{-1}$, $g = 0,75$, $n = 1$ et $e = 0,02 \text{ cm}$. Nous réalisons dix simulations de Monte Carlo de 50 000 photons par longueur d’onde et nous calculons la moyenne et l’écart type de la réflectance diffuse (TAB. 3.3). Le tableau 3.3 récapitule les résultats trouvés par Van de Hulst [Van de Hulst, 1980] et les simulations de Monte Carlo de [Prah et al., 1989] et [Wang et al., 1995].

TAB. 3.3 – Vérification de la réflectance diffuse totale d’un milieu trouble.

Source	R_d moyen	Écart-type
[Van de Hulst, 1980]	0,09739	-
[Prah et al., 1989]	0,09711	0,00033
[Wang et al., 1995]	0,09734	0,00035
Notre algorithme	0,09737	0,00019

Trouver des solutions exactes pour un milieu avec des indices « mal définis » est difficile mais [Giovanelli, 1955] fournit des données pour un milieu trouble semi-infini avec une diffusion isotrope et un indice de réfraction compris entre 1 et 1,5. Nous calculons alors la réflectance diffuse moyenne totale et son écart-type et nous comparons nos résultats à ceux de [Giovanelli, 1955] [Prah et al., 1989] [Wang et al., 1995] (TAB. 3.4). Les propriétés optiques du milieu sont les suivantes : $\mu_a = 10 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 90 \text{ cm}^{-1}$, $g = 0$ (diffusion isotrope), $n = 1,5$. Dix simulations de Monte Carlo ont été effectuées (5 000 photons par longueur d’onde).

Les résultats de notre simulation sont bien corrélés avec les résultats de simulation de la littérature.

TAB. 3.4 – Vérification de la réflectance diffuse totale dans un milieu semi-infini avec une frontière « mal définie ».

Source	R_d moyen	Écart-type
[Giovannelli, 1955]	0,26000	-
[Prahl <i>et al.</i> , 1989]	0,26079	0,00079
[Wang <i>et al.</i> , 1995]	0,25907	0,00170
Notre algorithme	0,26204	0,00138

3.5 Validation expérimentale sur fantômes

3.5.1 Protocole et description des fantômes

Pour valider notre algorithme de fluorescence, nous avons préparé des échantillons tests, appelés fantômes, en solution, composés d'un ou plusieurs fluorophores, l'éthanol servant de diluant pour les fantômes liquides puisque les spectres d'absorption et d'émission des fluorophores sont donnés avec l'éthanol comme diluant [OMLC, 2004]. L'intérêt des fantômes mono-fluorophore est de vérifier la bonne corrélation entre les mesures et le simulateur. L'intérêt des fantômes multi-fluorophores est de vérifier si l'effet cascade est correctement pris en compte. Ensuite, nous avons préparé des fantômes solides multi-couches avec des fluorophores, un absorbeur et un diffuseur.

L'encre de chine⁹ a été choisie comme absorbeur. Le spectre d'absorption a été mesuré avec le spectrophotomètre Lambda EZ210, au Département de Chimie Physique des Réactions (DCPR, Nancy) en collaboration avec C. Frochot.

Les intralipides sont des nutriments intraveineux se composant d'une émulsion d'eau et de phospholipides. Ils sont souvent employés comme diffuseurs parce qu'ils n'ont pas de bande d'absorption forte dans la région visible du spectre électromagnétique. Par ailleurs, ils sont facilement disponibles et relativement peu coûteux [van Staveren *et al.*, 1991] [Flock *et al.*, 1992] [Giusto *et al.*, 2003]. Les coefficients optiques des intralipides sont précisés dans [Flock *et al.*, 1992].

La figure 3.20 représente les coefficients d'absorption et de diffusion de l'encre de chine pure et des intralipides.

Nous avons choisi trois fluorophores ayant des spectres d'émission distincts et des rendements quantiques différents :

- la fluorescéine - en poudre - ($C_{20}H_{12}O_5$, Fluka) : rendement quantique de 0,79,
- l'éosine Y - en poudre - ($C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$, Sigma Aldrich) : rendement quantique de 0,67,
- la cryptocyanine - en poudre - ($C_{25}H_{25}IN_2$, Sigma Aldrich) : rendement quantique de 0,007.

Les pics d'émission de la fluorescéine, de l'éosine et de la cryptocyanine sont respectivement de 540, 550 et 730 nm pour des excitations de 425, 490 et 650 nm [OMLC, 2004]. Par ailleurs, la fluorescéine est citée dans plusieurs articles pour la création et la validation d'appareillages [Vishwanath *et al.*, 2002] [Yadavalli *et al.*, 2004].

Pour chaque fantôme, les fluorophores sont pesés systématiquement pour obtenir une quan-

⁹Sa composition exacte est encore inconnue de nos jours. Cependant, l'encre de chine est une encre faite à partir d'un pigment de noir de fumée, d'une gélatine pas clairement identifiée, de camphre diluée dans l'alcool et de sucre [Shiyan, 2007].

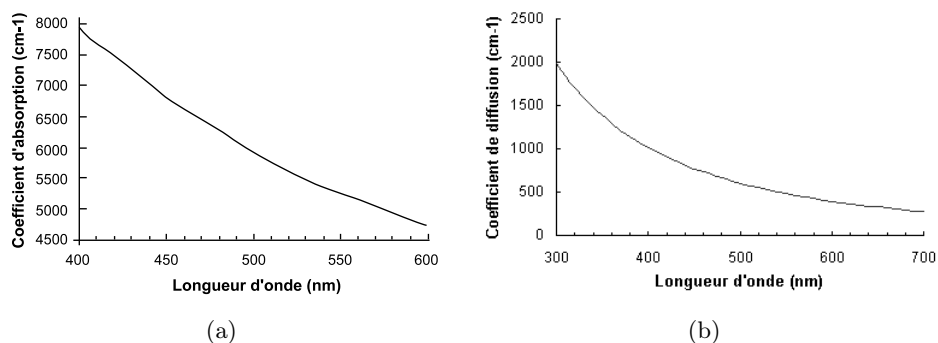


FIG. 3.20 – (a) Coefficient d'absorption de l'encre de chine pure [Liu *et al.*, 2003], (b) Coefficient de diffusion des intralipides 10% [Flock *et al.*, 1992].

tité de 10 μmol de produit. Les fantômes liquides sont versés dans un récipient noir comparable à une récipient en polystyrène expansé, jusqu'à atteindre une hauteur de 5 mm. Pour les fantômes multi-couches, nous utilisons une solution d'agarose (Agarose L, VWR Prolabo, France) à 5% (0,35 g d'agarose + 8 mL d'eau). Cet élément a la propriété de devenir liquide à 82°C et solide vers 35°C. Nous avons vérifié, au préalable, avec un spectrophotomètre et un spectrofluorimètre du DCPR que les contributions de la diffusion et de la fluorescence de l'agarose étaient négligeables par rapport aux contributions des fluorophores aux longueurs d'onde d'excitation choisie pour nos expériences.

Les expériences ont été réalisées avec une diode laser à 410 nm et avec la sonde à fibres optiques réalisée (distances entre les fibres d'excitation et de réception variant de 271 μm à 1341 μm). Par souci de clarté, ne sont indiqués dans ce mémoire que les spectres obtenus avec la fibre de réception dont la distance avec la fibre d'excitation est de 271 μm . Les spectres simulés ont été vérifiés pour toutes les distances.

Sur les graphiques, nous parlons d'intensité lumineuse normalisée. Toutes les valeurs des spectres sont normalisées par rapport au pic maximal des spectres afin de comparer la forme des courbes entre elles. Ainsi, les spectres expérimentaux sont normalisés entre eux et les spectres simulés le sont également.

3.5.2 Résultats expérimentaux

3.5.2.1 Fantômes liquides

Pour tous les fantômes liquides, nous lançons 500 000 photons par longueur d'onde.

Vérification des spectres d'émission simulés pour les trois fluorophores :

Dans un premier temps, nous vérifions que les spectres d'émission simulés et mesurés de chaque fluorophore pris séparément sont identiques (Fig. 3.21).

Les durées de simulation sont respectivement de 5, 6 et 8 minutes pour les fantômes composés d'éthanol et de fluorescéine, d'éosine et de cryptocyanine.

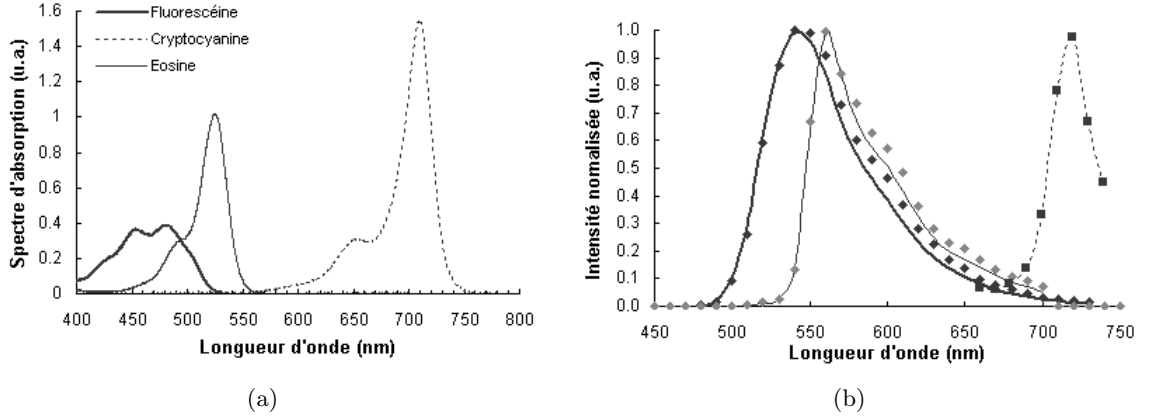


FIG. 3.21 – (a) Spectres d'absorption de la fluorescéine (trait épais), de l'éosine (trait fin) et de la cryptocyanine (trait pointillé) tirés de [OMLC, 2004], (b) Spectres de réflectance diffuse mesurée (ligne pleine) et simulée (points).

Vérification de l'effet « cascade » :

Le simulateur comporte deux modes distincts. Le mode type « mono-absorption » est seulement utilisable quand nous travaillons avec un fluorophore ou quand il n'y a pas de chevauchement des spectres d'émission des fluorophores. En fait, une fois que le photon a été émis et absorbé par un fluorophore, il ne peut plus être absorbé à nouveau. Il rentre dans un cycle standard de diffusion élastique et d'absorption. L'approche développée en mode « multi-absorption » permet à un photon, qui a été absorbé par un fluorophore, d'être réémis et absorbé par un autre fluorophore.

Nous comparons alors les résultats du simulateur en mode mono et multi-absorption pour un fantôme liquide composé de 6,47 mg d'éosine, de 3,32 mg de fluorescéine et de 5 mL d'éthanol (Fig. 3.22).

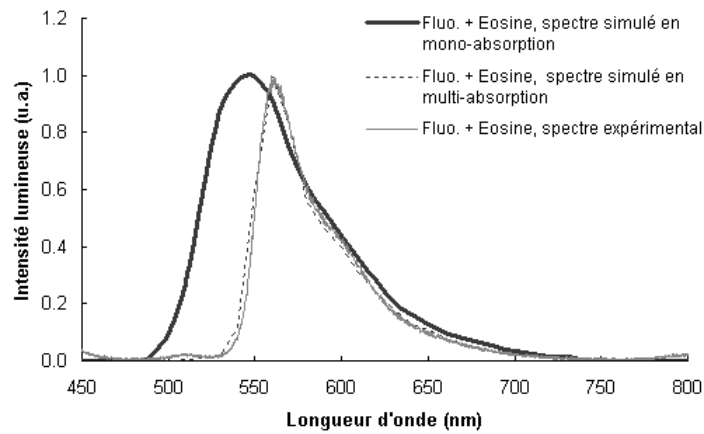


FIG. 3.22 – Réflectances expérimentale (trait fin) et simulée en mode mono (trait épais) et multi-absorption (pointillés) pour un fantôme liquide composé de fluorescéine et d'éosine.

Sur la courbe expérimentale, nous constatons qu'une grande partie de l'émission de la fluorescéine a servi à exciter l'éosine. Nous obtenons donc le spectre d'émission de l'éosine (Fig.

3.21(b)) avec une faible intensité résiduelle de fluorescéine, entre 500 et 550 nm, qui n'a pas été utilisé pour exciter l'éosine.

Le spectre de réflectance simulée en mode « mono-absorption » correspond presque au seul spectre d'émission de la fluorescéine. Si nous comparons avec le spectre mesuré expérimentalement, nous pouvons constater que la correspondance entre ces deux courbes n'est pas pertinente. Nous avons un signal très fort de fluorescéine et une présence de l'éosine en fin de courbe. En effet, en excitant à 410 nm, les photons sont d'abord absorbés par la fluorescéine. Comme ils ne peuvent être absorbés qu'une seule fois (mode mono-absorption) et compte tenu de l'efficacité quantique importante de la fluorescéine, nous retrouvons le spectre d'émission de la fluorescéine. Nous ne pouvons donc pas modéliser correctement le comportement de l'ensemble avec une logique basée sur un mode type « mono-absorption ». Par contre, le spectre de réflectance simulée en mode « multi-absorption » est semblable au spectre expérimental. En effet, les photons émis par la fluorescéine peuvent être à nouveau absorbés pour exciter l'éosine.

Fantôme multi-fluorophores :

Le fantôme est composé de deux fluorophores (3,32 mg de fluorescéine et 4,8 mg de cryptocyanine) avec 5 mL d'éthanol comme diluant (Fig. 3.23).

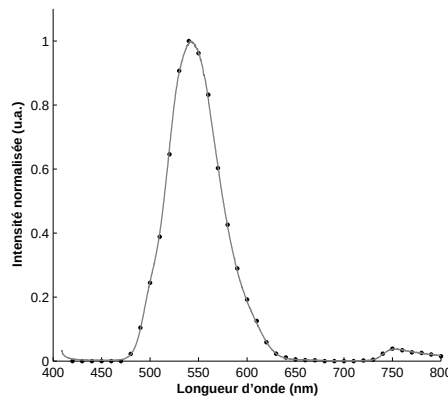


FIG. 3.23 – Réflectances expérimentale (trait plein) et simulée (points) pour un fantôme liquide composé de fluorescéine et de cryptocyanine.

Il y a une très bonne corrélation entre les spectres de réflectance expérimentale et les spectres de réflectance simulée. Nous pouvons constater l'influence de la fluorescéine entre 480 et 650 nm avec un pic vers 550 nm ($\lambda_{\text{émission}} \simeq 540$ nm) et l'influence de la cryptocyanine pour des longueurs d'onde supérieures à 700 nm ($\lambda_{\text{émission}} \simeq 730$ nm).

3.5.2.2 Fantômes multi-couches

La figure 3.24 schématise la structure utilisée des fantômes multi-couches.

Pour les fantômes multi-couches, nous lançons 1 000 000 photons par longueur d'onde.

Fantômes absorbants, diffusants et fluorescents :

Ces fantômes sont composés de deux couches. La première couche est soit de l'encre de chine, soit des intralipides, soit un mélange d'encre de chine et d'intralipides et la deuxième couche

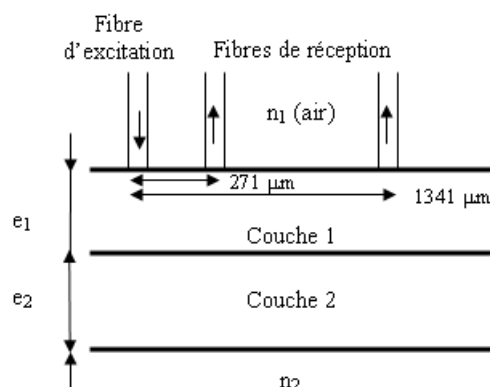


FIG. 3.24 – Représentation schématique de l'organisation des fantômes multi-couches.

est composée de fluorescéine dans de l'agarose (TAB. 3.5). La première couche est en solution puisque nous ne pouvons pas faire chauffer les intralipides à cause du changement de propriétés optiques. Nous avons également réalisé un fantôme « témoin » composé uniquement de 3,32 mg de fluorescéine, de 0,35 g d'agarose et de 8 mL d'eau (épaisseur : 3 mm) afin d'observer l'influence de l'ajout d'une couche d'un absorbeur ou d'une couche d'un diffuseur ou d'une couche composée d'un absorbeur et d'un diffuseur.

Les réflectances mesurées et simulées pour le fantôme « témoin » et pour les trois fantômes multi-couches sont représentées sur la figure 3.25.

TAB. 3.5 – Caractéristiques des fantômes multi-couches.

Nom du fantôme	1 ^{re} couche $e_1=2,8$ mm	2 ^e couche $e_2=3$ mm
MC1	5 mL d'encre de chine diluée à 0,011% (solution 1)	3,32 mg de fluorescéine 0,35 g de poudre d'agarose et 8 mL d'eau
MC2	5 mL d'intralipides 10% (solution 2)	
MC3	2,5 mL de la solution 1 et 2,5 mL de la solution 2	

Pour les spectres mesurés de réflectance, nous constatons que l'ajout d'encre de chine (absorbeur) entraîne une diminution de l'intensité lumineuse, la forme globale du spectre de fluorescéine étant la même (fantôme MC1).

Sur le spectre du fantôme MC2, nous remarquons tout d'abord que l'ajout d'une couche composée d'intralipides provoque une forte diminution de l'intensité lumineuse recueillie et un changement d'allure de la courbe (diminution du pic à 540 - 550 nm) en comparaison avec la courbe du fantôme « témoin ». Ceci est dû aux variations spectrales des coefficients d'absorption et de diffusion. Le coefficient de diffusion est déterminant notamment dans le calcul du déplacement, les intralipides étant fortement diffusants. En effet, il diminue entre 500 et 700 nm, la lumière étant plus diffusée vers 500 nm. Sur le spectre du fantôme MC3, nous constatons une chute de l'intensité lumineuse et une déformation du signal.

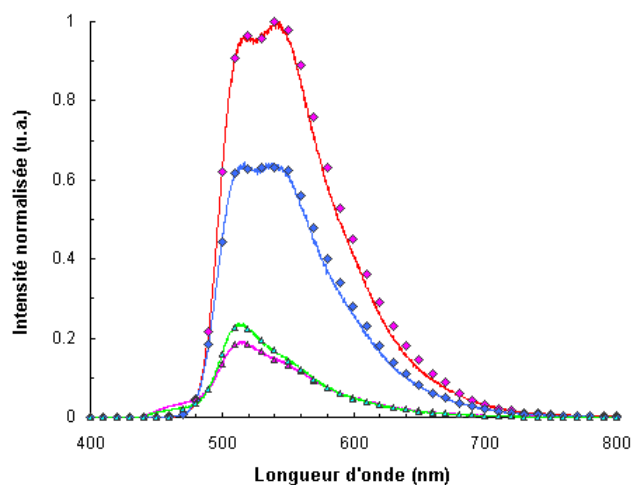


FIG. 3.25 – Réflectances mesurées (ligne pleine) et simulées (points) pour les fantômes « témoin » (Fluorescéine seule, rouge ; Durée de simulation ≈ 6 min), MC1 (Encre de chine et fluorescéine, bleu ; Durée de simulation ≈ 15 min), MC2 (Intralipides et fluorescéine, violet ; Durée de simulation ≈ 12 min) et MC3 (Encre de chine, intralipides et fluorescéine, vert ; Durée de simulation ≈ 18 min).

Les spectres simulés de réflectance sont très semblables à ceux mesurés.

En raison des propriétés acido-basiques des états initiaux et excités, les spectres d'absorption et de fluorescence peuvent être dépendants du pH (potentiel hydrogène) [Valeur, 2001]. Cela introduit, parfois, un décalage entre les spectres simulés et les spectres expérimentaux. Il pourrait donc être intéressant de tenir compte du pH dans le simulateur.

Fantôme bi-couches, multi-fluorophores :

Deux fantômes bi-couches ont été réalisés.

Le premier fantôme bi-couches est composé d'éosine et de fluorescéine (Fig. 3.26). La première couche d'épaisseur 3 mm est composée de 6,47 mg d'éosine, de 0,35 g de poudre d'agarose et de 8 mL d'eau (agarose à 5%). La seconde couche d'épaisseur 2,7 mm est composée de 3,32 mg de fluorescéine, de 0,35 g d'agarose et de 8 mL d'eau.

Nous constatons que les spectres sont bien corrélés.

Le second fantôme est composé de fluorescéine et de cryptocyanine (Fig. 3.27). La première couche d'épaisseur 2,9 mm est composée de 4,8 mg de cryptocyanine, de 0,35 g de poudre d'agarose et de 8 mL d'eau. La seconde couche d'épaisseur 2,8 mm est composée de 3,32 mg de fluorescéine, de 0,35 g d'agarose et de 8 mL d'eau.

Lorsque nous mesurons la réflectance avec un temps d'intégration de 8 s, nous n'observons pas le pic de cryptocyanine (faible efficacité quantique par rapport à celle de la fluorescéine, Fig. 3.27(a)) ; c'est pourquoi nous sommes contraints de saturer le pic de fluorescéine en augmentant le temps d'intégration de l'iHR320 afin d'observer le pic de cryptocyanine (Fig. 3.27(b)). Nous constatons également un shift des pics d'émission de la fluorescéine et de la cryptocyanine, probablement dû au pH de la solution. En effet, les spectres d'émission de la fluorescéine et de la cryptocyanine sont donnés avec l'éthanol comme diluant et non avec l'eau.

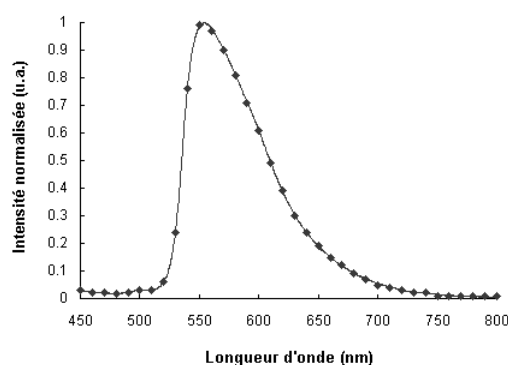


FIG. 3.26 – Réflectances mesurée (ligne pleine) et simulée (points) pour le fantôme bi-couches (Éosine/Fluorescéine).

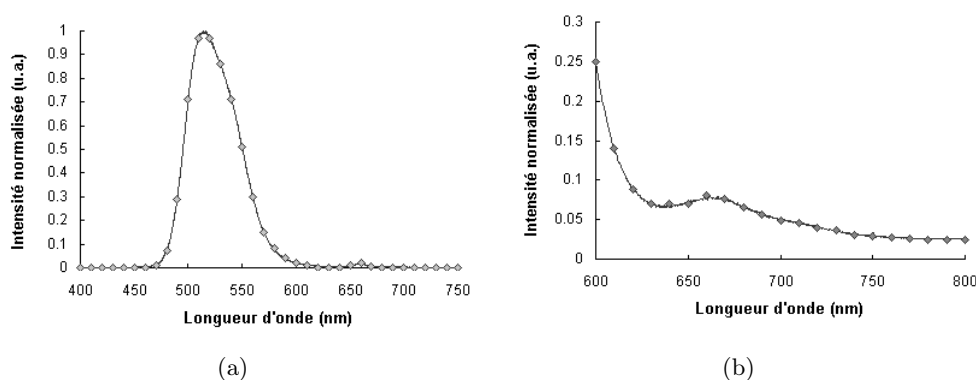


FIG. 3.27 – Réflectances mesurée (ligne pleine) et simulée (losange) pour le fantôme bi-couches (Fluorescéine/Cryptocyanine) (a) Temps d'intégration pour la réflectance mesurée : 8 s, (b) Zoom entre 600 et 800 nm (temps d'intégration : 40 s).

Fantôme tri-couches :

Ce fantôme tri-couches est composé d'encre de chine, d'éosine et de fluorescéine (Fig. 3.28). La première couche d'épaisseur 2,7 mm est composée d'encre de chine diluée à 0,011%. La deuxième couche d'épaisseur 2 mm est composée de 6,47 mg d'éosine, de 0,35 g d'agarose et de 8 mL d'eau. La troisième couche d'épaisseur 5,4 mm est composée de 3,32 mg de fluorescéine, de 0,35 g d'agarose et de 8 mL d'eau.

Les spectres sont également bien corrélés.

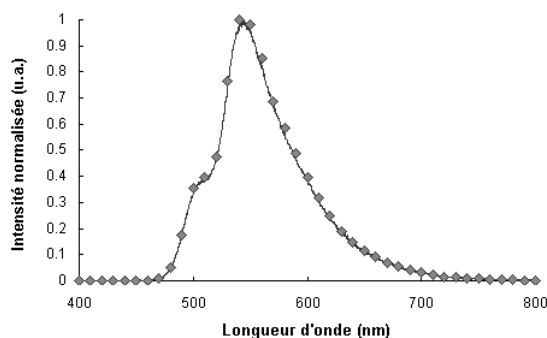


FIG. 3.28 – Réflectances mesurée (ligne pleine) et simulée (losange) pour le fantôme tri-couches (Encre de chine/Éosine/Fluorescéine). Durée de simulation ≈ 34 min.

3.6 Conclusion et Perspectives

Nous avons développé, à partir des programmes existant dans la littérature, un algorithme de simulation des interactions lumière-tissus, adapté à nos besoins et à notre configuration expérimentale. Le nombre de photons doit être choisi selon la configuration expérimentale (simulation mono ou multi-fluorophores, rendement quantique des fluorophores...). Par ailleurs, nous avons intégré la fluorescence multiple, qui permet de simuler plus fidèlement l'existence de plusieurs fluorophores comme dans le cas des tissus biologiques. L'algorithme a été validé en absorption, en diffusion et en fluorescence sur des fantômes liquides et multi-couches. Ce modèle va ainsi être utilisé dans l'étude expérimentale sur les artères.

Nous avons aussi montré qu'il était très important de connaître les véritables paramètres optiques du milieu, faute de quoi le spectre simulé est erroné. Il serait donc intéressant de déterminer les paramètres optiques à partir des spectres expérimentaux afin d'observer si leur changement pourrait traduire une modification pathologique du tissu considéré. D'autres travaux sont sans doute à poursuivre dans cette direction.

Pour coller encore plus à la réalité, il faudrait diminuer le pas d'échantillonnage en longueur d'onde du simulateur. Actuellement, nous travaillons par pas de 10 nm ; ce pas avait été choisi car il donnait une assez bonne approximation des spectres expérimentaux au départ, pour un temps d'exécution acceptable si nous traitons toute la bande 400 - 800 nm. Comme nous avons vérifié la validité du simulateur, il pourrait être intéressant d'adapter le pas d'échantillonnage tout en conservant un bon compromis avec le temps d'exécution. Pour réduire les temps de calcul du simulateur, il serait également intéressant d'envisager de travailler avec des systèmes calcul de type architecture parallèle.

Étude vasculaire *ex vivo*

NOS objectifs de début de thèse étaient double :

- caractériser de façon précise les instruments existants et disponibles au laboratoire,
- disposer rapidement de données expérimentales en diffusion élastique et en autofluorescence sur tissus biologiques utiles et pratiques à la modélisation.

Considérant les différentes contraintes liées aux modèles optiques tissulaires utilisés actuellement dans la littérature (milieux homogènes, isotropes et en couches) [Flock *et al.*, 1989a] [Flock *et al.*, 1989b] [Liu *et al.*, 2003], l'idée originale retenue a été l'étude spectroscopique couplée aux propriétés mécaniques de tissus artériels. La sensibilité des techniques disponibles a ainsi pu être caractérisée en faisant varier l'organisation du tissu (allongements, épaisseurs...).

De nombreuses études, visant à mieux appréhender le comportement mécanique de tissus vasculaires, sont menées depuis longtemps [Cilesiz and Welch, 1994] [Filippidis *et al.*, 2000] [Wallace *et al.*, 2000]. Celles-ci sont de deux types :

- *in vivo*, avec notamment l'utilisation de techniques d'échographie ultrasonore, l'écho-doppler, la mesure de la vitesse de l'onde de pouls¹⁰ (VOP ou PWV : « Pulsed Wave Velocity »)...
- *in vitro*, où les nombreux tests mécaniques réalisés (uni-axial, bi-axial, anneaux, segments...) permettent d'obtenir de plus amples informations sur les propriétés mécaniques des vaisseaux sanguins sous environnement « contrôlé ».

Dans le cas de certaines pathologies artérielles, il est nécessaire de recourir à des substituts vasculaires notamment des greffons cryoconservés (sténose, plaque d'athérome). L'évaluation des propriétés mécaniques d'artères issues de cryoconservation présente donc un intérêt du point de vue du contrôle de la qualité du protocole de conservation mis en œuvre (test global d'intégrité), mais également du point de vue chirurgical, dans la mesure où l'implantation d'une allogreffe peut être envisagée en tenant compte de ses propriétés particulières (adaptation de la longueur d'allongement, test de pulsatilité, limitation des contraintes de traction pour les sites d'anastomoses...). Cependant, à ce jour, dans le cadre de la préparation d'allogreffes pour l'implantation chirurgicale, aucune méthode simple de tests pré-implantatoires n'est proposée pour déterminer les caractéristiques mécaniques du greffon artériel à réimplanter.

¹⁰Méthode non-invasive simple utilisée comme un indicateur d'élasticité et de rigidité des grosses artères, mais dépendante de la pression artérielle du sujet au moment de sa mesure et du technicien la réalisant.

Les segments artériels frais et cryoconservés se caractérisent par des différences de viabilité cellulaire [Rosset *et al.*, 1996] [Blondel *et al.*, 2000] et de structure [Dobrin, 1978] pouvant se traduire par des modifications de leurs propriétés optiques (absorption, diffusion, fluorescence) [Cilesiz and Welch, 1994] [Ramanujam, 2000]. Ainsi, en ouvrant la voie d’une corrélation entre les propriétés optiques des tissus vasculaires et leur état de contrainte, il est possible d’envisager le développement de nouvelles méthodes, *in vitro* et *in vivo*, sans contact et atraumatiques de caractérisation des propriétés mécaniques des vaisseaux sanguins en corrélant les propriétés optiques des tissus vasculaires et leur état de contrainte axiale.

4.1 Problématique, objectifs de l’étude et caractéristiques des artères

4.1.1 Motivation et objectifs de l’étude

Les objectifs de ces expériences sont de proposer et de mettre en œuvre une méthode simplifiée et fiable de caractérisation expérimentale des propriétés « bio-opto-mécaniques » de tissus artériels en vue de déterminer des paramètres pertinents corrélant propriétés optiques et état mécanique du tissu.

L’originalité de ces mesures est multiple et concerne la caractérisation d’un tissu biologique de structure déformable, permettant ainsi la caractérisation des deux appareils de spectrométrie de diffusion élastique et de fluorescence. Ainsi, nous pourrions déterminer les améliorations à apporter à l’instrumentation existante et réfléchir au nouveau système de spectrométrie bimodale combinant la fluorescence et la diffusion élastique. L’originalité de l’étude réside dans le couplage de tests mécaniques à des relevés spectroscopiques (autofluorescence et diffusion élastique résolue dans l’espace), afin de rechercher d’éventuelles corrélations entre les comportements rhéologiques de tissus vasculaires sous contrainte et des modifications d’intensité spectrales et/ou des changements d’allure spectrale en réponse à une excitation. Enfin, ce tissu biologique déformable nous permettra d’appliquer l’algorithme développé pour la simulation de propagation de la lumière dans ces tissus.

4.1.2 Histologie artérielle

Fonctions, structure et composition pariétale

Les artères distribuent un sang à haute pression éjecté des ventricules cardiaques vers les différents tissus du corps. Elles doivent s’accommoder des grandes variations de pression engendrées par l’activité cardiaque : elles sont constituées de fibres musculaires lisses capables de se contracter (vasoconstriction) ou de se détendre (vasodilatation) en fonction des signaux nerveux et hormonaux reçus.

La structure de la paroi artérielle varie d’une espèce à l’autre. Les différences d’architecture pariétale conduisent à distinguer deux grands types d’artère : les artères pulmonaires (artères de type « élastique » car plus proche du cœur ; exemples : aorte, carotides...) et les artères systémiques (également appelées « musculaires » ; exemples : artères fémorales, rénales, coronaires, cérébrales...) [Tedgui and Levy, 1994].

L’étude histologique de l’arbre vasculaire met en lumière une constante dans la constitution des parois des vaisseaux sanguins [Stevens and Lowe, 1997]. Ceux-ci présentent toujours une organisation en trois couches, appelées aussi tuniques, qui sont, de la lumière du vaisseau vers

sa périphérie (ou de l'intérieur – en contact avec le sang – vers l'extérieur, Fig. 4.1) : l'intima, la média et l'adventice. L'importance respective de ces couches varie en proportion selon le type de vaisseaux (artères ou veines), mais aussi au sein d'un même type, en fonction du calibre des vaisseaux et de leurs caractéristiques hémodynamiques.

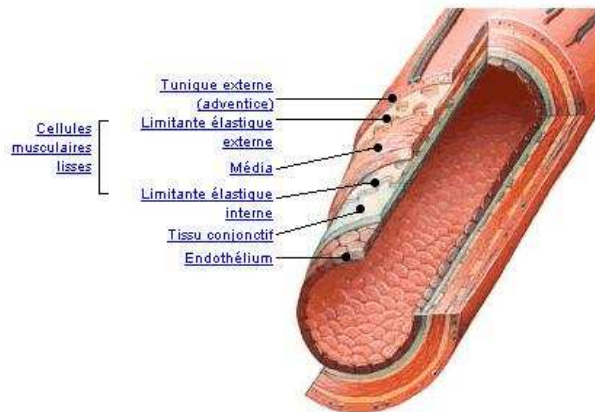


FIG. 4.1 – Artère en coupe.

L'INTIMA

La tunique interne, également appelée intima, est formée d'une seule couche de cellules endothéliales minces et aplaties (épaisseur inférieure à $10\ \mu\text{m}$, pour $100\ \mu\text{m}$ de longueur et $10\ \mu\text{m}$ de largeur environ), d'une membrane basale fine (de l'ordre de $0,1\ \mu\text{m}$) composée de microfibrilles de collagène, support de l'endothélium et d'une couche sous-endothéliale se développant avec l'âge au niveau des gros troncs artériels.

LA MÉDIA

Plus mince dans les veines que dans les artères, la tunique moyenne, ou média, est la couche la plus développée dans les artères de gros calibre, dites artères élastiques. Elle est constituée de cellules musculaires lisses (forme cylindrique de 50 à $80\ \mu\text{m}$) ainsi que d'un ensemble conséquent de fibres d'élastine et de collagène. Ce réseau fibrillaire, disposé de façon lamellaire et concentrique par-rapport à l'axe du vaisseau, est en majeure partie responsable des propriétés mécaniques de la paroi vasculaire [Roach and Burton, 1957]. Le rôle de ces constituants est non seulement de résister à la distension lors de la systole cardiaque et d'amortir le flux pulsatile, mais aussi de maintenir une certaine pression artérielle résiduelle lors de la relaxation des structures pariétales pendant la diastole.

C'est cette couche musculaire qui donne au vaisseau sa souplesse et sa contractilité, indispensables pour la régulation de la pression et du débit sanguin.

L'ADVENTICE

L'adventice, ou tunique externe, est plus mince dans les veines que dans les artères. Ce tissu conjonctif fibreux et élastique, relativement lâche, est parcouru de vaisseaux sanguins, qui nourrissent les parois. La couche la plus superficielle est constituée en majeure partie de fibres de collagène dans un milieu d'élastine, de nerfs, de fibroblastes et de vasa vasorum (petits conduits vasculaires), et occasionnellement de cellules musculaires lisses [Williams and Heistad, 1996].

L'adventice représente respectivement environ 10% et 50% de la paroi des artères élastiques et

musculaires [Dobrin, 1978].

4.1.3 Propriétés mécaniques des artères

Les propriétés mécaniques des artères sont essentielles à la compréhension et la modélisation de l'appareil circulatoire [Vito and Dixon, 2003]. La connaissance du fonctionnement physiologique ou pathologique de l'arbre artériel et des moyens thérapeutiques à mettre en œuvre lors de pathologies vasculaires découle, entre autres, des études mécaniques réalisées sur ce type de tissu. Le tissu artériel, comme la plupart des autres matériaux biologiques, présente de nombreuses particularités qui rendent son étude plus complexe. En effet, les échantillons biologiques se distinguent par des singularités mécaniques spécifiques dues à la nature même de leur composition histologique et de leur organisation architecturale. Pour tenter une approche du comportement artériel du point de vue mécanique, il est donc nécessaire d'introduire certaines spécificités propres aux tissus biologiques.

Incompressibilité, homogénéité et isotropie

Un matériau est dit incompressible si l'application d'une charge sur celui-ci n'entraîne pas de changement de son volume. Ainsi, si l'échantillon incompressible est déformé dans une direction de l'espace, les valeurs des déformations dans les deux autres directions vont changer de sorte que le volume reste identique. Ce phénomène est réel pour les éprouvettes artérielles, si celles-ci sont soumises à des sollicitations de l'ordre de celles qu'elles subiraient *in vivo*, en conditions physiologiques [Carew *et al.*, 1968]. Cette particularité est essentielle car l'hypothèse d'incompressibilité simplifie la méthode de tests mécaniques et facilite les calculs qui s'ensuivent. Lors d'essais mécaniques, même uni-axiaux, effectués sur des tissus biologiques, les trois dimensions de l'éprouvette varient en fonction de la charge appliquée. Le principe d'isotropie signifie que la constitution du matériau est telle que les efforts subis sont les mêmes dans toutes les directions de l'espace tridimensionnel. Cependant, ceci n'est pas le cas pour des tissus biologiques : en effet, la composition hétérogène et en trois couches des artères fait que celles-ci se comportent différemment selon la direction dans laquelle est appliquée la charge [Cox, 1975]. Néanmoins, dans de nombreuses études mécaniques de tissus biologiques, les hypothèses d'homogénéité et d'isotropie sont posées afin de simplifier les calculs.

Déformations, contraintes et module élastique

Les méthodes expérimentales les plus fréquemment employées pour caractériser un matériau, en régimes statique et dynamique, consistent soit à appliquer une contrainte à l'échantillon et relever la déformation correspondante, soit à imposer une déformation à l'éprouvette et à mesurer la contrainte subie [Shadwick, 1992].

Une déformation ϵ est une variation relative de distance entre deux points. Il existe plusieurs expressions mathématiques selon que les déformations sont petites (quelques %) ou grandes, comme c'est le cas pour les artères (plusieurs dizaines de %). Nous utiliserons donc l'expression (4.1) également choisie dans d'autres études pour calculer ϵ en grande déformation [Demiray, 1981] :

$$\epsilon = 100 \times \ln \frac{L}{L_0} \quad (4.1)$$

avec ϵ la déformation (%), L et L_0 les longueurs initiales mesurées (mm) respectivement sans charge et en charge.

La contrainte (équation 4.2) est définie comme une force exercée perpendiculairement sur une surface S , telle que :

$$\sigma = \frac{F}{S} \quad (4.2)$$

avec σ la contrainte (N/m^2), F la force appliquée (N) et S la section de l'éprouvette sur laquelle s'exerce la force (m^2).

Dans le cas de matériaux à loi de comportement élastique linéaire, on peut calculer un autre paramètre, appelé module élastique E (ou module d'Young), défini comme le rapport de la contrainte sur la déformation ($E = \sigma/\epsilon$). Le module élastique est une propriété du matériau, indépendante de sa quantité ou de sa forme géométrique. D'autres expressions de module d'élasticité existent, notamment lorsque le comportement du matériau n'est pas linéaire, comme c'est le cas pour les artères. On utilise par exemple le module élastique incrémental (E_{inc}), défini comme la pente de la tangente en chaque point de la courbe contrainte-déformation correspondante [Dobrin, 1978].

Viscoélasticité, fluage, relaxation et hystérésis

Les tissus biologiques constituent des matériaux solides qui se caractérisent par des comportements mécaniques spécifiques. Ainsi, dans le cas des parois vasculaires, les rhéogrammes contrainte-déformation typiques sont non-linéaires et suivent plutôt une courbe de forme exponentielle croissante. Cette particularité de leur loi de comportement correspond au caractère viscoélastique des artères, principalement induit par l'association des fibres d'élastine et de collagène [Sharma, 1974]. La viscoélasticité artérielle se traduit par des spécificités de fluage (phénomène de déformation retardée ou différée pour une contrainte maintenue constante imposée au matériau), et de relaxation (adaptation du matériau consécutive à l'effet instantané d'une déformation maintenue ensuite constante). Enfin, un phénomène d'hystérésis (décalage des rhéogrammes de charge et de décharge du matériau) apparaît aussi en conséquence des composantes visqueuse et élastique des artères.

Pathologies et cryoconservation

Au cours de la vie d'un individu, le système cardio-vasculaire peut être le siège de différents phénomènes physiologiques ou pathologiques qui tendent à modifier, voire perturber, le fonctionnement normal de l'arbre vasculaire et de la circulation sanguine. Ainsi, lors du vieillissement, de traumatismes ou de pathologies (artériopathies, anévrismes), on assiste à une modification des propriétés mécaniques de la paroi artérielle [Girerd *et al.*, 1992]. Afin de palier les dysfonctionnements du système circulatoire, différentes techniques chirurgicales existent. La chirurgie vasculaire restauratrice, le remodelage endovasculaire (curetage, dilatation), les pontages par greffes, mais aussi le recours aux biomatériaux de synthèse offrent une large palette pour suppléer un vaisseau artériel défaillant. Les allogreffes sont communément utilisées pour des pontages artériels.

Néanmoins, il faut trouver un moyen fiable de conserver ces tissus en vue de constituer une banque de données viable. De plus, afin d'éviter tout risque de contamination entre les donneurs et les futurs transplantés, une période de stockage correspondant au temps d'incubation de certains virus doit être respectée. La méthode employée consiste en la cryoconservation à -150°C car cette technique répond aux deux nécessités précédemment citées [Rosset *et al.*, 1996]. Des études des propriétés mécaniques *in vitro* ont été réalisées dans le but de comparer les segments artériels frais et issus de cryoconservation [Bia *et al.*, 2006]. Dans certains cas, [Gournier *et al.*, 1993]

n'observent pas de différence mécanique significative entre des échantillons en lames, cependant les fonctions des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales sont fortement diminuées après cryoconservation [Langerak *et al.*, 2001]. D'autres études sur des segments complets montrent que les artères issues de cryoconservation présentent des caractéristiques mécaniques significativement différentes [Blondel *et al.*, 2000] [Thakrar *et al.*, 2006], voire même des ruptures précoces de leur paroi après réimplantation [Lehalle *et al.*, 1997].

4.2 Matériels et Méthodes

4.2.1 Banc de test

4.2.1.1 Banc de test mécanique

Le banc de test mécanique, que nous avons réalisé, permet d'imposer des déformations uniaxiales à un anneau artériel (de 0% à 60%, par pas de 5 ou 10%) et de mesurer la force axiale correspondante [Choserot *et al.*, 2005].

Le banc de test (Fig. 4.2) est principalement constitué des éléments suivants :

- un socle en aluminium sur lequel sont fixés une platine de déplacement micrométrique et un crochet de préhension fixe,
- un second crochet mobile, permettant d'allonger l'échantillon annulaire testé, solidaire d'un capteur de force longitudinal par l'intermédiaire d'une tige filetée assurant un préréglage en fonction de la dimension de l'échantillon,
- une platine micrométrique qui permet d'imposer les déformations suivant l'axe $\vec{x}$ avec une résolution de 0,02 mm. Une vis micrométrique permet un déplacement en $\vec{y}$, afin d'ajuster les crochets de préhension dans l'axe du déplacement en $\vec{x}$,
- un capteur de force fixé sur la platine micrométrique et constitué d'un corps d'épreuve en aluminium sur lequel sont collées quatre jauges d'extensiométrie montées en pont de Wheatstone (compensation aux parasites et aux variations de température; TRMC¹¹ : 80 dB). Un montage électronique (amplificateur d'instrumentation) permet de fournir une tension électrique directement exploitable,
- une cuve remplie d'une solution d'eau physiologique (NaCl¹² à 0,9%) et maintenue à 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), permettant d'immerger l'échantillon artériel durant les mesures.

4.2.1.2 Systèmes de mesures spectrométriques

Pour effectuer les mesures spectroscopiques optiques des échantillons artériels sous contrainte, les deux appareils de spectrométries, présentés dans le chapitre 2 section 2.1, sont couplés au banc de test. Pour résumer, il s'agit :

- du spectrofluorimètre portable, qui recueille les spectres d'autofluorescence des tissus, sous excitation par diode laser ($\lambda_{exc} = 410 \pm 10$ nm),
- de la maquette de spectromètre de diffusion élastique résolue dans l'espace, mesurant les intensités rétrodiffusées avec comme source d'excitation lumineuse un ensemble de trois diodes électroluminescentes, dont les pics d'émission se situent à 700, 740 et 780 nm.

Un dispositif de maintien des fibres optiques permet, pendant les expériences, d'amener la sonde fibrée de chaque appareil au contact du tissu artériel. Les deux appareils utilisent un spectro-

¹¹Taux de Réjection de Mode Commun.

¹²Chlorure de Sodium.

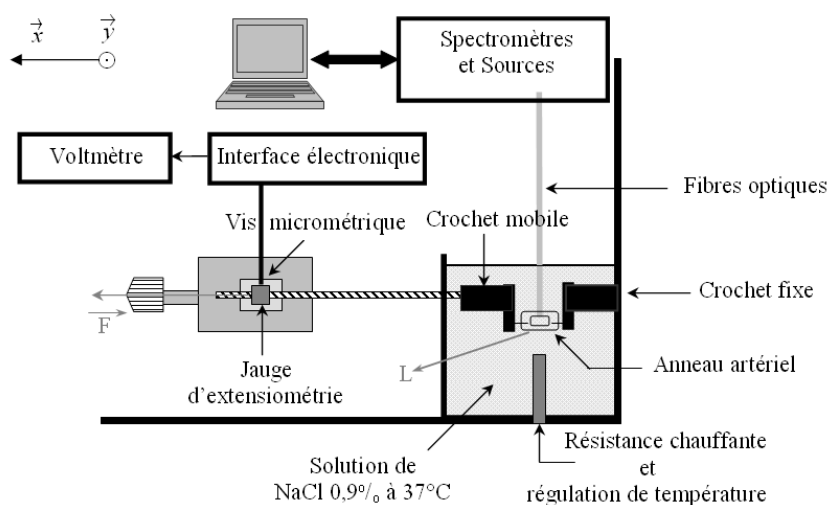


FIG. 4.2 – Représentation schématique du banc de test.

mètre USB2000 (Ocean Optics, France, résolution $\approx 0,32$ nm) connecté à un ordinateur. Deux programmes informatiques spécifiques permettent de recueillir, traiter et enregistrer les spectres d'auto fluorescence et de diffusion élastique pour chaque contrainte appliquée. Le banc de test mécanique et les spectromètres sont calibrés avant chaque expérience et après chaque nouvel échantillon.

4.2.1.3 Calibrages

Mesures de force

Exploitant la relation « *force* = $f(\text{élongation})$ » linéaire pour un ressort de traction, nous utilisons un ressort de traction fixé aux crochets de préhension du banc de test. D'après les caractéristiques du ressort (acier inox, diamètre moyen : 5,5 mm, section du fil : 0,5 mm, 78,25 spires), nous pouvons déduire, pour chaque élongation du ressort, la force en Newtons subie par le capteur de force. Nous pouvons alors tracer la caractéristique de transfert de la tension électrique délivrée par le capteur en fonction de la force exercée par le ressort de traction (Fig. 4.3). Une régression linéaire (moindres carrés) nous permet de déterminer l'équation théorique approximant cette caractéristique réelle avec une erreur inférieure à 1%.

La calibration métrologique de la chaîne d'acquisition de force vise à :

- régler la pente et le décalage de la courbe « *tension*(V) = $f(\text{force})$ »,
- déterminer l'erreur globale (linéarité, hystérésis).

Mesures spectrales

Pour chaque allongement de l'anneau, trois spectres d'auto fluorescence sont acquis, chacun des spectres étant la moyenne de cinq mesures successives. Le temps d'intégration est de 1000 ms.

En diffusion élastique, cinq spectres sont acquis pour chaque déformation et pour chaque canal. Les temps d'intégration du canal 1 et du canal 2 (0,53 et 1,74 mm entre les fibres d'excitation et d'émission) sont de 400 ms.

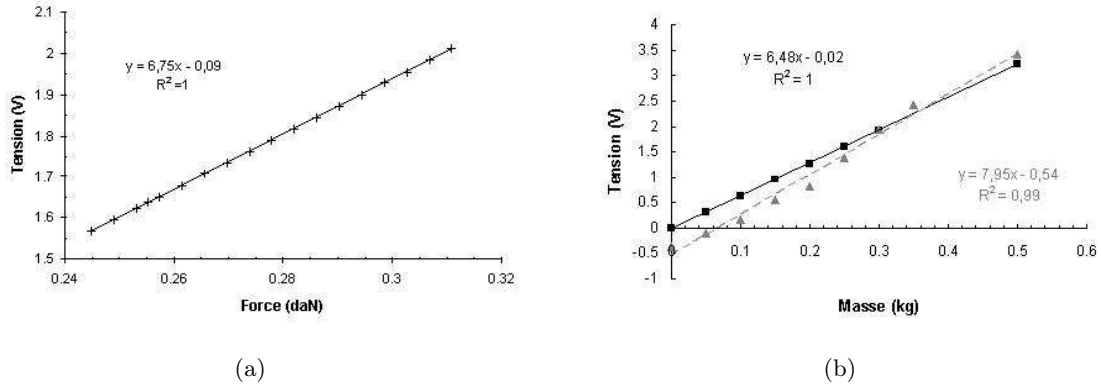


FIG. 4.3 – (a) Réponse du capteur de force du banc de test, (b) Linéarité de la jauge de contrainte (triangle : position horizontale, carré : position verticale).

4.2.2 Modélisation mécanique

4.2.2.1 Mesures des dimensions initiales des anneaux artériels

Pour obtenir des échantillons annulaires, nous découpons les segments artériels afin d'obtenir des anneaux de longueur moyenne de 4 mm (surface suffisante pour le contact des fibres optiques utilisées pour les relevés spectrométriques). Des photographies, avec référence dimensionnelle, permettent de déduire la longueur initiale de l'éprouvette, l'épaisseur initiale de la paroi artérielle et le diamètre extérieur initial (précision de 0,02 mm). La connaissance de ces dimensions permet de calculer le volume V_0 de l'anneau artériel. Un autre relevé photographique est effectué afin de déterminer la longueur x_0 (Fig. 4.4), qui correspond à la longueur initiale à régler sur le banc de test pour effectuer la première série de mesures (déformation de 0%). Cette longueur est obtenue en pinçant légèrement l'anneau artériel de façon que les deux parois opposées soient en contact l'une avec l'autre. Une fois ces différents paramètres connus, les échantillons sont fixés par les crochets de préhension du banc de tests mécaniques pour commencer les mesures mécano-optiques.

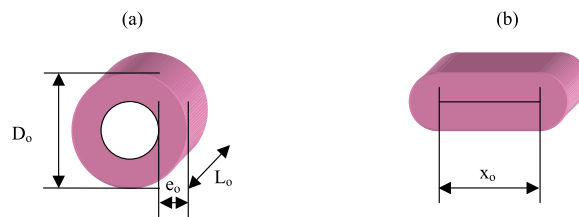


FIG. 4.4 – Représentation des deux états initiaux utilisés pour les calculs mécaniques : anneau artériel à un état de référence appelé « non chargé » (a) et pincé (b). D_0 est le diamètre externe initial, h_0 l'épaisseur initiale de la paroi, L_0 la longueur initiale et x_0 la longueur initiale à régler lors du placement de l'anneau sur le banc de test.

4.2.2.2 Paramètres mécaniques

Pour calculer les déformations, nous utilisons une théorie classique en grande déformation [Demiray, 1981] [Fung and Liu, 1993]. Les anneaux artériels sont supposés uniformes, cylindriques, homogènes, incompressibles et isotropes [Carew *et al.*, 1968]. Le volume d'un anneau « non

chargé » V_0 est calculé à partir des dimensions initiales relevées sur l'échantillon non contraint (équation 4.3). Ce volume permettra de calculer l'épaisseur de l'anneau pendant les essais de traction et d'en déduire la contrainte circonférentielle subie par l'échantillon.

$$V_0 = L_0 \pi \left[\left(\frac{D_0}{2} \right)^2 - \left\{ \left(\frac{D_0}{2} \right) - h_0 \right\}^2 \right] \quad (4.3)$$

Pour notre modèle d'échantillon annulaire sous traction uniaxiale, la contrainte circonférentielle peut s'écrire sous la forme (équation 4.4) [Cox, 1983] :

$$\sigma_{\theta\theta} = \frac{F}{S} = \frac{F}{2 L h} \quad (4.4)$$

avec $\sigma_{\theta\theta}$ la contrainte circonférentielle (N/m^2), F la force axiale appliquée (N), L la longueur de l'échantillon en charge (m), h l'épaisseur de la paroi artérielle en charge (m) et S la surface d'application totale (m^2) de la force F sur les deux sections.

Compte tenu du caractère hyper-élastique non linéaire des artères [Sharma, 1974], la déformation circonférentielle peut être calculée comme [Demiray, 1981] :

$$\epsilon_{\theta\theta} = \ln \frac{x}{x_0} \quad (4.5)$$

avec $\epsilon_{\theta\theta}$ la déformation circonférentielle, x la longueur imposée en charge (mm) et x_0 l'état initial (mm).

En charge, nous considérons le volume artériel V auquel on applique une déformation circonférentielle tel que :

$$V \cong 2 L h x = S x \quad (4.6)$$

Le volume ainsi calculé correspond au volume total des deux parois parallèles de l'anneau lors des essais en traction (Fig. 4.5) [Attinger, 1968].

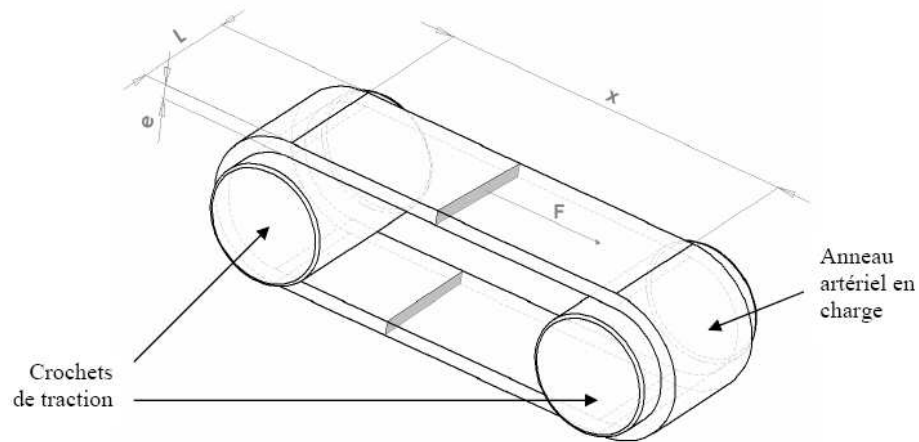


FIG. 4.5 – Représentation schématique d'un anneau artériel en traction.

Les extrémités de l’anneau artériel au contact des crochets de préhension ne sont pas prises en compte dans les calculs des contraintes car celles-ci subissent des contraintes locales supplémentaires [Shadwick, 1992].

En approximant le volume artériel initial V_0 par le volume considéré en charge V et compte tenu de l’incompressibilité du tissu, la mesure de x et de F permettent de calculer :

$$\sigma_{\theta\theta} = \frac{F x}{V} \approx \frac{F x}{V_0} \quad (4.7)$$

$$h = \frac{V}{2 L x} \approx \frac{V_0}{2 L x} \quad (4.8)$$

x_0 , V_0 et L étant connus.

Comme la caractéristique contrainte/déformation est non-linéaire, nous calculons le module élastique incrémental E_{inc} donné par la relation suivante [Dobrin, 1978] :

$$E_{inc} = \frac{\Delta\sigma_{\theta\theta}}{\Delta\epsilon_{\theta\theta}} \quad (4.9)$$

4.2.3 Mesures préliminaires

Des observations en microscopie confocale sous excitation à deux photons ont été réalisées en collaboration avec Monsieur D. Dumas au plateau d’Imagerie et de Biophysique Cellulaire et Tissulaire de Nancy (UMR CNRS 7563 et IFR CNRS 111) afin d’identifier les éléments fluorescents constitutifs de nos échantillons (collagène, élastine) susceptibles d’être excités entre 380 et 420 nm par le spectrofluorimètre fibré existant et utilisé pour nos manipulations.

Une excitation à 800 nm en mode biphotonique, correspondant à 400 nm en mode monophotonique, révèle l’autofluorescence de ces constituants. La figure 4.6 montre respectivement les images et le spectre d’émission d’autofluorescence du réseau d’élastine et de collagène d’une coupe radiale d’artère fraîche.

A cette longueur d’onde d’excitation, les constituants du réseau d’élastine et de collagène émettent un signal d’autofluorescence exploitable. Sur le spectre de fluorescence recueilli, nous observons notamment un pic d’amplitude à 550 nm. Ces résultats confortent le choix de la bande de longueur d’onde d’excitation du spectrofluorimètre portable (400 - 420 nm).

4.2.4 Calibrage, traitements et analyse statistique

4.2.4.1 Dispositif d’autofluorescence

Les photons d’autofluorescence émis par le tissu sous excitation monochromatique sont recueillis par une fibre optique et envoyés vers le spectromètre USB2000 couplé à un logiciel d’acquisition et de traitement des spectres.

Quatre traitements différents sont réalisés sur les spectres « bruts » :

1. une **correction des spectres en longueurs d’onde et en intensité**. Avant de pouvoir nous servir du spectromètre USB2000 d’Ocean Optics, il a tout d’abord été nécessaire d’en connaître certaines caractéristiques : justesse des longueurs d’onde, niveau de la réponse et de la sensibilité du capteur CCD. Dans le cadre du développement du spectrofluorimètre portable, pour obtenir des résultats cohérents et aussi proches que possible de notre référence, en l’occurrence le spectromètre CP200 de Jobin-Yvon, deux protocoles majeurs ont

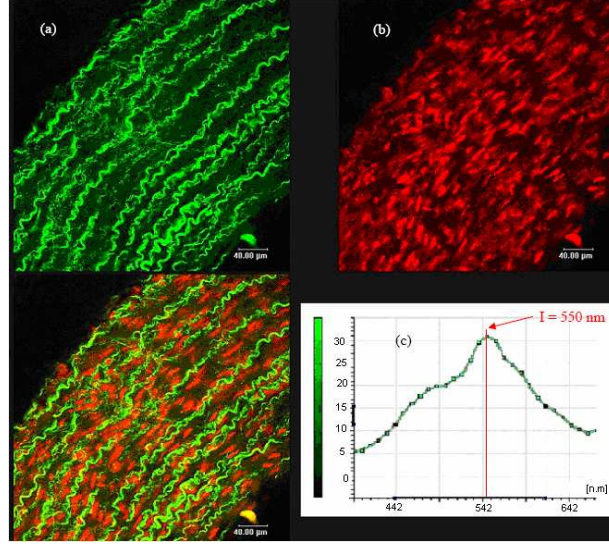


FIG. 4.6 – Réseau d'élastine/collagène en microscopie multiphotonique et noyaux cellulaires. (a) Autofluorescence (réseaux) en vert ; (b) Noyaux cellulaires (Bromure d'Ethidium) en rouge ; (c) Spectre d'émission d'autofluorescence en mode multiphotons d'une artère fraîche.

été mis en place pour vérifier et corriger les deux critères cités plus haut. Dans un premier temps, nous avons analysé la linéarité des pas en longueurs d'onde, puis recherché une méthode de correction de la sensibilité du capteur. Cette première étude nous a permis de constater que l'USB2000 était non linéarisé en longueurs d'onde et en intensité.

Pour assigner à chaque pixel du capteur CCD du spectromètre USB2000 la valeur de la longueur d'onde de la raie qui excite le pixel considéré, le moyen utilisé consiste en l'application d'une méthode mathématique, basée sur un polynôme d'ordre 3 :

$$\lambda = a \times X^3 + b \times X^2 + c \times X + d \quad (4.10)$$

avec λ la longueur d'onde (nm), a le premier coefficient de correction (0,79), b le second coefficient ($-4,51 \cdot 10^{-5} \dots$), c le troisième coefficient (0), d la longueur d'onde constante de départ (278,39) et X le numéro d'ordre de chaque pixel (0 à 2047).

Cette relation mathématique nous a été donnée par le constructeur. Pour l'obtenir, le constructeur a recueilli, avec le spectromètre, le spectre d'une lampe de calibration, dont la valeur de chaque raie est connue avec précision. Il a ensuite réalisé un calcul d'interpolation qui permet de déduire l'équation polynomiale ainsi que chaque coefficient de l'expression (4.10).

Dans un second temps, fort de ces renseignements, nous avons pu réaliser des acquisitions avec le spectromètre USB2000. Cependant, en comparant les spectres obtenus à ceux délivrés par le spectromètre CP200, nous avons pu constater un décalage en longueurs d'onde, ou « shift » (environ 10 nm vers la droite), sur chacun des spectres de l'USB2000. Considérant que le décalage et la non-conformité des spectres recueillis, par-rapport à ceux de notre référence, n'étaient pas dus à une inexactitude de calcul des pas du spectromètre USB2000, nous nous sommes alors penchés sur le deuxième paramètre, à savoir la sensibilité du capteur CCD contenu dans le spectromètre USB2000. Après avoir acquis le spectre de la lampe Deutérium-Halogène simultanément avec les deux spectromètres, CP200 et USB2000, nous avons pu les comparer et déterminer les facteurs de correction qui permettront de faire coïncider la sensibilité du spectromètre USB2000 à celle du spectromètre CP200 et ainsi

corriger en intensité le spectre obtenu.

2. un **lissage polynomial** : nous utilisons un filtrage numérique des spectres selon l'algorithme de Savitzky-Golay par convolution (degré du polynôme : 3, largeur du filtre : largeur du spectrofluorimètre de référence). Ce lissage permet d'éliminer certains artefacts ponctuels.
3. une **normalisation en « pic »** : méthode permettant de ramener l'intensité lumineuse maximale (pic) des spectres d'auto fluorescence à une valeur unitaire. Le facteur multiplicateur « a » trouvé pour chaque courbe est appliqué ensuite aux intensités du spectre entier entre 480 et 810 nm de sorte que : $I_{norm-p}(\lambda_i) = I(\lambda_i)/a$ avec $a = \max(I(\lambda_i))$. Nous obtenons donc des spectres d'auto fluorescence de valeurs d'intensité normalisées entre 0 et 1.
4. une **normalisation en « surface »** [Tsai *et al.*, 2003] : cette deuxième méthode consiste à ramener l'aire sous la courbe d'intensité spectrale (entre 480 et 810 nm par exemple) à une valeur unitaire :

$$I_{norm-s}(\lambda_i) = I(\lambda_i)/b \quad \text{avec} \quad b = \Delta\lambda \sum_{i=1}^N I(\lambda_i) \quad (4.11)$$

N correspond au nombre total de valeurs de longueurs d'onde échantillonnées et $\Delta\lambda$ au pas en longueur d'onde (identique sur toute la bande et égal à 0,5 nm).

Tous les spectres ainsi normalisés auront la même surface et les comparaisons s'effectueront alors sur les changements de forme ou d'allure des tracés.

4.2.4.2 Dispositif de diffusion élastique

Un logiciel d'acquisition et de traitement des données est utilisé pour recueillir et sauvegarder les données spectrales. Comme pour chaque acquisition, cinq spectres sont acquis pour chaque déformation et pour chaque canal. Nous filtrons ces spectres pour enlever le bruit et nous en faisons la moyenne. Ensuite, nous calculons la réflectance en divisant les spectres par le spectre acquis du Téflon, choisi comme étalon [A'Amar and Bigio, 2006].

4.2.4.3 Analyse statistique des données

Avant de faire des tests paramétriques, nous nous assurons que la distribution des échantillons est compatible avec l'hypothèse de distribution gaussienne de la variable (test de normalité).

Nous employons un test statistique de Pearson afin de rechercher des corrélations entre les deux variables : contraintes/déformations mécaniques et spectres optiques (diffusion élastique et fluorescence).

Nous calculons les intégrales sous la courbe des rhéogrammes et nous les comparons pour un type donné d'anneaux, pour des déformations identiques ou différentes et pour des artères fraîches et cryoconservées.

Des tests T de Student-Fisher, pour des échantillons non appariés, sont utilisés pour indiquer s'il existe des différences significatives entre les résultats mécaniques d'une part et spectroscopiques

d'autre part obtenus pour des segments artériels frais et cryoconservés, avec des contraintes identiques [Legras, 2002]. Une probabilité p inférieure à 5% est considérée comme indiquant une différence statistiquement significative. Pour faire ce test, nous calculons l'intégrale sous la courbe des rhéogrammes pour chaque échantillon et nous comparons les moyennes des intégrales [Laurent *et al.*, 1994].

Nous utilisons également le test de l'analyse de la variance ANOVA (« ANalysis Of the VAriance »). L'analyse de la variance n'est pas une méthode qui permet d'étudier les différences de variances entre populations, mais une méthode pour étudier les différences significatives ou non de moyenne entre populations. Ce test permet d'observer non seulement des différences entre des échantillons artériels frais et cryoconservés mais aussi des différences notables au niveau des contraintes pour chaque déformation appliquée, pour un même échantillon.

4.2.5 Conditionnement des échantillons biologiques et protocole

4.2.5.1 Prélèvements

Les échantillons biologiques utilisés lors des expérimentations ont été prélevés gracieusement au laboratoire de Chirurgie Expérimentale de la Faculté de Médecine de Nancy, sur de jeunes porcs (20 à 30 kg, 4 à 6 mois), préalablement anesthésiés puis euthanasiés par injection létale d'une solution de chlorure de potassium (KCl). Tous les animaux de cette étude ont été traités suivant la législation et la réglementation européenne relative à l'expérimentation animale.

Les artères prélevées sont immédiatement placées dans des tubes contenant un milieu de culture M199 avec antibiotiques (pénicilline, streptomycine) et antifongique (fongizone). Les tubes sont ensuite entreposés en chambre froide (4°C) jusqu'à l'utilisation des échantillons pour les tests mécano-optiques qui sont effectués dans les 48 heures et un mois après les prélèvements, respectivement pour les artères fraîches et cryoconservées.

Les expériences sont réalisées sur deux populations d'artères : des artères fraîches et des artères cryoconservées. Chaque segment de carotide est coupé en deux parties de longueur équivalente dont une est immédiatement cryoconservée et l'autre immédiatement utilisée pour les tests. Dans chaque demi-segment, quatre anneaux de 4 mm de longueur sont découpés.

4.2.5.2 Cryoconservation, décongélation

Pour la cryoconservation, un milieu de congélation, calqué sur les protocoles des Banques de Tissus [Rosset *et al.*, 1996] et adapté à nos besoins, est préparé selon la composition suivante :

- 70% de milieu de culture M199 et antibiotiques,
- 20% de sérum de veau fœtal,
- 10% de cryoprotecteur : Diméthyl Sulfoxyde (DMSO).

Les segments artériels sont glissés dans des cryotubes placés sur lit de glace et remplis avec 1,5 mL du milieu de congélation, l'ensemble étant placé en chambre froide pendant 30 minutes. Le contenu des cryotubes est homogénéisé trois fois pendant cette période afin que le cryoprotecteur pénètre les tissus. Puis les cryotubes sont placés dans un congélateur à -80°C pendant 12 heures. Enfin, les échantillons sont plongés dans de l'azote liquide (-150°C) pendant un mois. Un protocole classique de descente en température est utilisé.

La décongélation des échantillons cryoconservés est réalisée en plaçant les cryotubes au bain marie (37°C). Dès que la glace commence à fondre, les échantillons sont lavés plusieurs fois dans un milieu de culture (M199 et antibiotiques, 37°C) et dans de l'eau physiologique (NaCl

0,9%), afin d'éliminer toute trace de DMSO et de sérum de veau fœtal. Les échantillons issus de cryoconservation peuvent alors être utilisés pour les tests mécano-optiques réalisés un mois après le prélèvement.

4.2.5.3 Tests mécaniques et spectrométries

La longueur, le diamètre externe et l'épaisseur de chaque segment artériel sont systématiquement mesurés avant leur disposition sur le banc de test et avant le début des mesures. Sa conformation permet d'effectuer des essais uni-axiaux en imposant uniquement des déformations circonférentielles à l'anneau artériel étudié. A partir de la valeur de l'état initial x_0 précédemment obtenue, nous pouvons définir des échelons d'allongements, c'est-à-dire de déformations (de 0 à 50 ou 70% par pas de 5 ou 10%).

Au début des tests, l'anneau artériel est preconditionné à une déformation constante de 10% pendant trois minutes pour atténuer les phénomènes de relaxation de l'échantillon. De même, à chaque nouvelle déformation appliquée, une période d'une minute est laissée à l'éprouvette pour adapter les contraintes et limiter l'effet viscoélastique avant le début des relevés.

Simultanément aux mesures d'allongement et de force mécanique, nous amenons les fibres optiques de diffusion élastique et de fluorescence au contact de la surface de l'éprouvette et nous recueillons quinze spectres en autofluorescence et dix spectres en diffusion élastique ; ce qui nous permet d'obtenir des spectres moyens, pour chaque déformation, afin d'atténuer l'influence d'éventuels parasites ou artefacts. L'ensemble des manipulations pour un anneau artériel (preconditionnement, mise en place sur le banc de test, mesures mécaniques, spectroscopiques ...) dure entre 1h et 1h30.

4.2.5.4 Coupes histologiques

Des coupes histologiques de seize anneaux frais et seize anneaux cryoconservés, réalisées au service d'Anatomie Pathologique du Centre Alexis Vautrin par le Docteur Leroux et ses collaborateurs, fournissent une mesure précise de l'épaisseur des différentes couches ainsi qu'une observation des dégradations éventuellement visibles subies par les anneaux cryoconservés. Ces mesures serviront notamment pour le paramétrage du modèle de simulation.

Pour l'observation générale des parois artérielles, les préparations sont traitées par des colorations HES (Hématoxyline, Eosine, Safran) [Gournier *et al.*, 1993] [Rosset *et al.*, 1996] [Lehalle *et al.*, 1997]. Des marquages ont également été réalisés pour une observation plus spécifique des fibres élastiques endothéliales et des muscles lisses (Weigert, CD 31, CD 34 et Actine).

4.2.6 Simulation, paramétrage

Les trajectoires des photons sont simulées dans trois couches parallèles correspondant à l'adventice, à la média et à l'intima du tissu artériel.

Chaque couche est décrite par les paramètres suivants (Fig. 4.7) : n^i , μ_a^i , μ_s^i , g^i correspondent respectivement à l'indice de réfraction, aux coefficients d'absorption et de diffusion et au facteur d'anisotropie pour l'adventice ($i = A$), la media ($i = M$) et l'intima ($i = I$), dont les valeurs initiales sont extraites des valeurs disponibles de la littérature ou interpolées. L'indice de réfraction du milieu ambiant au-dessus du tissu $n_1 = 1$ est celui de l'air ; le milieu se trouvant en-dessous du tissu correspond à une solution isotonique de NaCl, avec $n_2 = 1,33$.

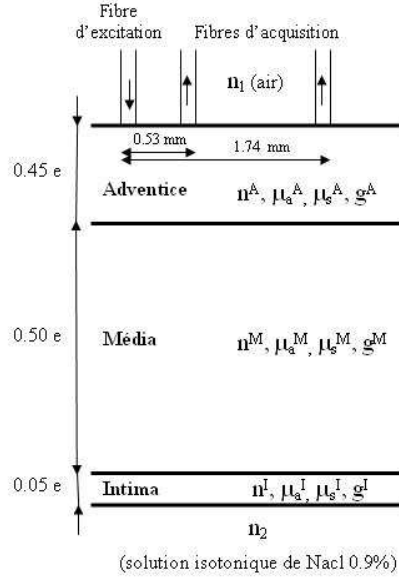


FIG. 4.7 – Représentation schématique du modèle tri-couche utilisé pour simuler le transport de la lumière dans le tissu artériel. e représente l'épaisseur totale de l'artère, n^i , μ_a^i , μ_s^i , g^i correspondent respectivement à l'indice de réfraction, aux coefficients d'absorption et de diffusion et au facteur d'anisotropie pour l'adventice ($i = A$), la média ($i = M$) et l'intima ($i = I$). n_1 et n_2 sont les indices de réfraction des milieux environnants, c'est-à-dire l'air ($n_1 = 1$) la solution isotonique de NaCl ($n_2 = 1,33$). Les mesures des épaisseurs e des trois couches artérielles sont déterminées à partir des coupes histologiques et des images réalisées.

Les valeurs des autres paramètres de configuration du programme de simulation sont la géométrie des fibres d'excitation et de réception (diamètre $\phi = 200 \mu\text{m}$; distances entre les fibres d'excitation et de réception : 0,53 et 1,74 mm), la (ou les) source(s) lumineuse(s) utilisée(s) pendant l'expérimentation (diode laser et DELs), la plage de longueur d'onde et le pas en longueur d'onde. Le nombre de photons utilisé dépend des simulations réalisées (cf. paragraphe 4.3.4).

Pour chaque simulation et pour chaque anneau artériel, les valeurs des épaisseurs des trois couches artérielles du modèle de simulation sont déterminées à partir des coupes histologiques et des images réalisées.

4.3 Résultats et Discussion

4.3.1 Données histologiques

La figure 4.8 présente deux images typiques réalisées en microscopie de transmission de coupes transversales d'artères carotides de porcs fraîches (a) et cryoconservées (b). Le marquage par coloration de Weigert révèle les fibres de collagène et d'élastine.

Nous observons que les fibres élastiques de la média semblent plus repliées et sinueuses pour les échantillons frais. En effet, sur l'image de l'échantillon cryoconservé, les fibres semblent plus lâches et de forme plus linéaire. La matrice extracellulaire, elle aussi, semble être plus lâche et moins dense pour l'échantillon cryoconservé. Ces données sont en accord avec des résultats d'études histologiques menées sur des artères cryoconservées par d'autres équipes [Louagie *et al.*, 1990]. Ces observations, sur un plan purement histologique, laissent déjà prévoir une différence

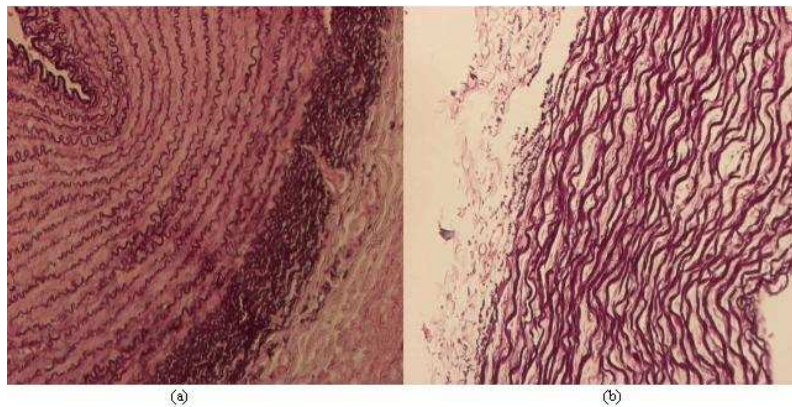


FIG. 4.8 – Exemples de coloration Weigert de coupes histologiques (a) d'artères fraîches (grossissement x4), (b) d'artères cryoconservées (grossissement x10).

possible dans le comportement mécano-optique d'échantillons frais et d'échantillons cryoconservés.

Le tableau 4.1 précise les valeurs minimales, maximales et moyennes des épaisseurs et des longueurs des échantillons artériels.

TAB. 4.1 – Valeurs des épaisseurs et des longueurs minimales, maximales et moyennes des échantillons artériels frais/cryoconservés ($n = 16$).

	Min	Max	Moyenne
Épaisseurs (mm)	0,8/0,6	1,6/1,6	1/1
Longueurs (mm)	3,7/3,2	5,6/6,7	4,6/4,4

4.3.2 Résultats mécaniques

La figure 4.9 représente les courbes moyennes ($n_{\text{frais}} = 16$, $n_{\text{cryoconservé}} = 16$) de la contrainte en fonction de la déformation, pour les anneaux frais et pour les anneaux cryoconservés. Nous observons que les rhéogrammes sont de type non linéaires, en grandes déformations de la paroi artérielle. Les deux courbes sont différenciées mais elles suivent une loi de variation comparable. La cryoconservation entraîne l'augmentation des contraintes subies par l'échantillon, quelle que soit la déformation exercée.

Le test d'ANOVA (deux facteurs avec répétition d'expériences) confirme qu'il existe une différence significative entre les rhéogrammes des artères fraîches et cryoconservées (valeur du paramètre calculé F_{calc} supérieure à la valeur critique de F), ainsi que des différences notables au niveau des contraintes pour chaque déformation appliquée (TAB. 4.2).

Le test de Student-Fisher indique s'il existe des différences significatives entre les rhéogrammes obtenus pour les segments d'artères fraîches et cryoconservées intra et inter-cochons. Une probabilité $p < 5\%$ (risque de 5%) signifie qu'il y a une différence significative. Nous observons (TAB. 4.3) qu'il n'y a pas de différence significative entre les artères fraîches d'une même

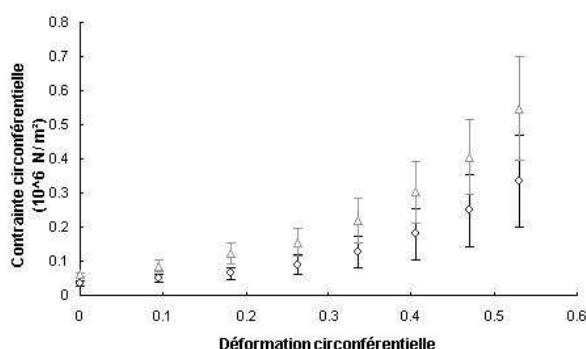


FIG. 4.9 – Rhéogrammes moyens pour tous les échantillons. Les ronds correspondent aux échantillons frais et les triangles aux échantillons cryoconservés. Les valeurs moyennes sont données avec $\pm$ SD (écart-type de chaque population à partir de la population entière donnée en argument).

TAB. 4.2 – Test statistique : Anova.

Sources de variations	F_{calc}	Valeurs critiques de F	Indice de significativité ¹
Frais / Cryoconservé	10,1	3,9	DS (*)
Contraintes / Déformations	38,7	2,1	DS (**)

¹ Indice de significativité pour le test statistique ANOVA : les codes habituels sont un point lorsque $p < 0,1$, une astérisque lorsque $p < 0,05$, deux astérisques lorsque $p < 0,01$ et trois astérisques lorsque $p < 0,001$.

population ou de populations différentes et entre les artères cryoconservées d'une même population ou de populations différentes. En revanche, il existe une différence significative entre les échantillons frais et cryoconservés.

TAB. 4.3 – Test T de Student-Fisher : seuil de risque 0,05/0,01 et n le nombre d'artères.

	T_{calc}	T	
Intra cochon : artères fraîches (cochon 1, n=6)	1,1	2,8/4,6	NS ²
Intra cochon : artères fraîches (cochon 2, n=6)	2,2	2,8/4,6	NS
Intra cochon : artères cryoconservées (cochon 1, n=6)	2,4	2,8/4,6	NS
Intra cochon : artères cryoconservées (cochon 2, n=6)	0,7	2,8/4,6	NS
Inter cochons (n=12) : artères fraîches	0,1	2,2	NS
Inter cochons (n=12) : artères cryoconservées	0,3	2,2/3,2	NS
Inter cochons : artères fraîches et cryoconservées (n=24)	3,5	2,1/2,8	DS ³

Le module d'élasticité incrémental calculé à partir des valeurs de contraintes/déformations est représenté Fig. 4.10. Nous notons que le module élastique incrémental pour les échantillons

²NS : H_0 acceptée (H_0 : hypothèse nulle).

³DS : Différence significative, H_0 rejetée : $p < 0,05$.

cryoconservés est supérieur à celui des échantillons frais. Il existe une différence significative entre les propriétés mécaniques des tissus vasculaires frais et cryoconservés. D'autres études montrent également des différences significatives des lois de comportement entre les tissus artériels frais et cryoconservés [Blondel *et al.*, 2000].

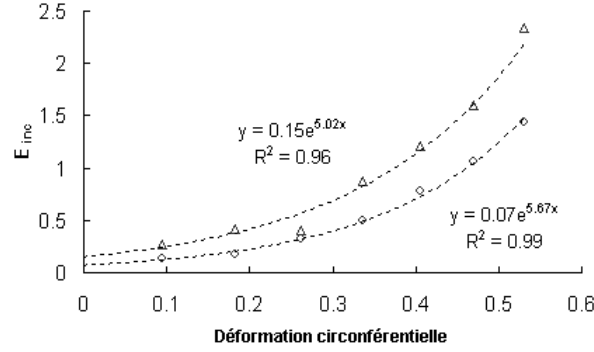


FIG. 4.10 – Modules d'élasticité incrémentaux. Les ronds correspondent aux échantillons frais et les triangles aux échantillons cryoconservés.

Nous pouvons noter que dans le cas de tests sur des segments artériels entiers plutôt que sur des anneaux, les valeurs des contraintes circonférentielles et des modules élastiques incrémentaux sont plus importantes pour les artères fraîches. Cette contradiction apparente s'explique notamment par la différence entre ces deux types de tests et leurs modèles biomécaniques associés : configuration tridimensionnelle (dilatation complète pour les segments entiers) d'un côté et configuration uniaxiale (uniquement étirement circulaire pour les anneaux) de l'autre. Par ailleurs, les études [Cox, 1983] [Blondel *et al.*, 2001] montrent que les valeurs de contraintes sont plus élevées, à déformations identiques, pour les tests mécaniques sur des anneaux que sur des segments artériels. Pour les anneaux artériels, les valeurs de contraintes de la littérature sont du même ordre de grandeur que nos résultats obtenus ($\sigma_{\theta\theta} \approx 0,15 \times 10^6 N/m^2$ pour $\epsilon_{\theta\theta} \approx 0,3$).

En rapprochant les résultats mécaniques des observations histologiques, nous pouvons déduire que les modifications architecturales et structurales des fibres pariétales réduisent en effet le caractère élastique de la paroi artérielle et tendent ainsi à rendre sa structure annulaire plus rigide.

4.3.3 Résultats spectrométriques

4.3.3.1 Autofluorescence

Les spectres de fluorescence sont obtenus pour chaque nouvelle déformation imposée à l'échantillon artériel, sous excitation à longueur d'onde centrale de 410 nm avec une largeur à mi-hauteur ou FWHM (« full width half maximum ») de 10 à 20 nm. Nous avons donc cherché à représenter de façon simple les variations spectrales en fonction de la déformation circonférentielle appliquée. Deux approches sont possibles : une normalisation par rapport au pic d'autofluorescence et une normalisation en surface.

Les figures 4.11(a) et 4.11(b) représentent respectivement un exemple typique de spectres normalisés d'autofluorescence en pic à 520 nm et en surface dans la bande 480 - 810 nm, pour

une déformation de 30%, pour des anneaux artériels avant et après cryoconservation.

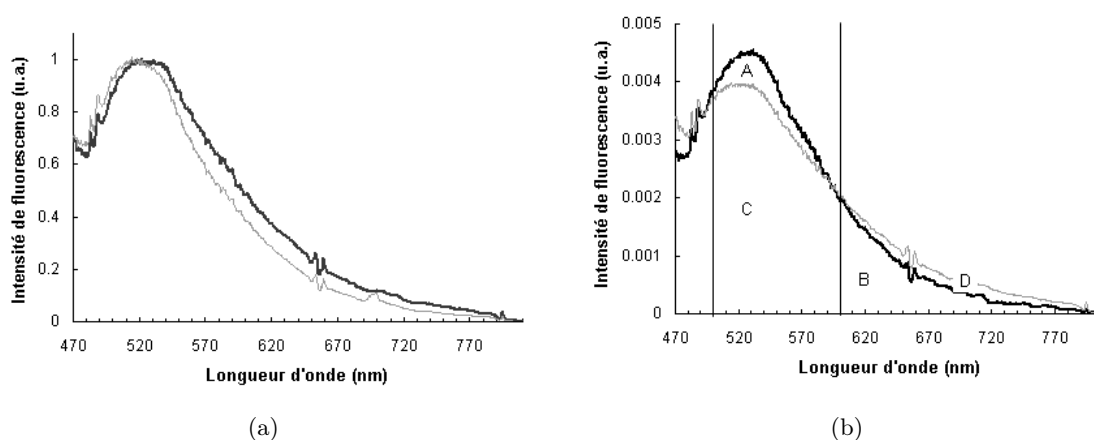


FIG. 4.11 – Exemple de spectres moyens d'autofluorescence normalisés pour une déformation de 30% (a) en pic à 520 nm, (b) en surface entre 480 et 810 nm. A, B, C et D correspondent respectivement aux aires sous la courbe des échantillons frais entre 500 - 600 nm (A) et 600 - 810 nm (B) et des échantillons cryoconservés (C et D) entre les mêmes bornes. La ligne noire correspond aux échantillons frais et la ligne grise aux échantillons cryoconservés.

Un décalage des spectres des échantillons frais et cryoconservés est visible : la valeur du pic pour les échantillons frais se trouve vers 535 nm alors que celui des échantillons cryoconservés est légèrement décalé vers la gauche (520 nm). Nous observons des variations des amplitudes spectrales selon le type d'échantillon (frais ou cryoconservé).

Sur la figure 4.11(b), la première région (A, C) comprise entre 480 et 600 nm est une plage d'autofluorescence délimitée par, d'un côté le creux entre l'excitation et l'autofluorescence, et de l'autre par le point d'intersection des courbes des échantillons frais et cryoconservés. Elle contient également le pic d'autofluorescence (525 nm) des anneaux artériels. La seconde région (B, D) comprise entre 600 et 810 nm correspond à la fin de l'autofluorescence.

Pour chaque déformation circonférentielle appliquée, nous calculons l'aire sous les spectres pour chaque type d'échantillons (frais et cryoconservés) - Fig. 4.11(a), normalisés par rapport au pic d'autofluorescence) - et les rapports des aires sous la courbe des spectres normalisés en surface - Fig. 4.11(b), mesure relative de A/B et de C/D - afin d'obtenir un paramètre simple traduisant les variations d'amplitude spectrale. Nous représentons ensuite sur un graphique ces résultats en fonction de la déformation. Nous obtenons deux séries de points (pour les échantillons frais et les échantillons cryoconservés) en fonction de la déformation (Fig. 4.12(a) et 4.12(b)). Une droite de régression linéaire (en pointillé) est calculée pour chaque série de points, afin de comparer l'évolution de la déformation avec les rapports entre les échantillons frais et les échantillons cryoconservés.

La figure 4.12(a) montre une différence d'intensité globale d'autofluorescence (aire sous les spectres) entre les deux types d'échantillons : le spectre des échantillons cryoconservés est significativement au-dessus de celui des anneaux artériels frais. Nous observons par ailleurs que plus la déformation appliquée augmente, plus l'intensité globale d'autofluorescence a tendance à diminuer, avec des valeurs de pente très proches pour les deux types d'artères. Cette différence d'intensité globale d'autofluorescence pourrait s'expliquer par les différences structurales relevées

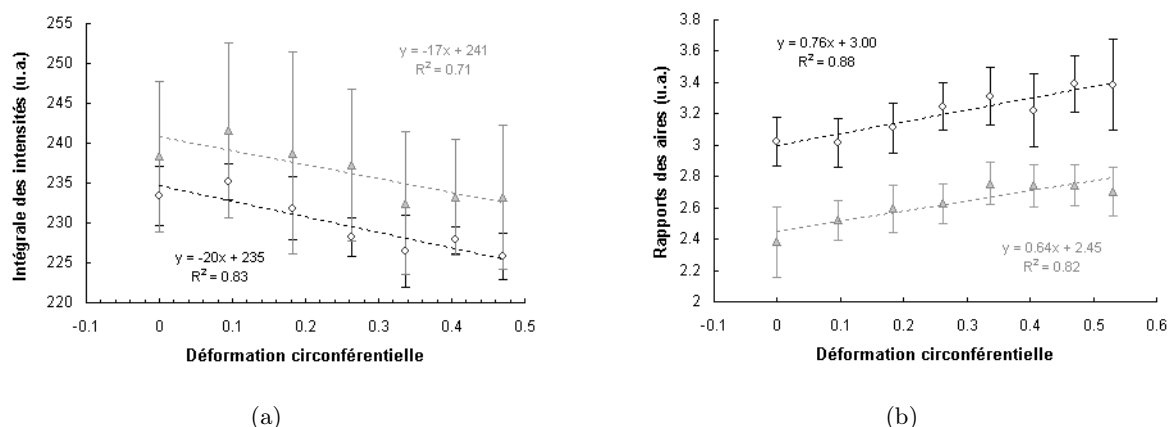


FIG. 4.12 – (a) Aires spectrales en fonction de la déformation appliquée. Les ronds et les triangles correspondent respectivement aux anneaux frais et cryoconservés, (b) Rapports des aires sous les courbes d'intensité spectrale de fluorescence (moyennes sur l'ensemble des échantillons) $\pm$ SD. Les rapports A/B et C/D représentent respectivement les anneaux frais (ronds) et les anneaux cryoconservés (triangles). Les lignes en pointillé correspondent à des droites de régression linéaire.

lors de l'expertise des données histologiques (paragraphe 4.3.1).

Sur la figure 4.12(b), nous observons que les valeurs des rapports des aires A/B (échantillons frais) et C/D (échantillons cryoconservés) augmentent en même temps que la déformation circonférentielle. Ces résultats traduisent le fait que l'intensité globale dans la région spectrale 480 - 600 nm a tendance à « diminuer » et celle dans la région 600 - 800 nm à « augmenter » avec la déformation.

Cette représentation est meilleure que celle de la figure 4.12(a) car tout en faisant apparaître les variations spectrales en fonction de la déformation imposée, elle permet d'augmenter la discrimination des deux types d'échantillons (déviations standards plus faibles).

Nous constatons que les valeurs des rapports d'aires sont significativement plus élevées pour les anneaux frais, et ce, quelle que soit la déformation appliquée. En revanche, les variations relatives des rapports d'aires pour un même type d'échantillon (traduites par la pente des courbes) ne permettent pas de distinguer de façon significative un comportement mécanique différent entre les anneaux frais et les anneaux cryoconservés.

Une analyse de la variance (TAB. 4.4) est effectuée sur les rapports des aires des artères fraîches et cryoconservées, ainsi que sur les déformations. Ce test statistique révèle une différence significative ($p < 0,05$) entre les échantillons frais et cryoconservés. Ceci indique qu'il est possible, pour une déformation donnée, de différencier un anneau artériel frais d'un anneau cryoconservé à partir de leurs spectres d'autofluorescence, quel que soit l'allongement mécanique.

TAB. 4.4 – Test statistique : Anova - Fluorescence, $p < 0,05$.

Sources de variations	F_{calc}	Valeurs critiques de F	Indice de significativité
Frais / Cryoconservé	442	5,6	DS
Déformation	12,1	3,8	DS

TAB. 4.5 – Test T de Student-Fisher (seuil de risque : 0,05).

	T_{calc}	T	
Inter cochons : artères fraîches (n=16)	1,1	2,1	NS
Inter cochons : artères cryoconservées (n=16)	3,4	2,1	DS
Inter cochons : artères fraîches et cryoconservées (n=32)	4,5	2,04	DS

4.3.3.2 Diffusion Élastique

La figure 4.13 représente un exemple de spectres de diffusion élastique collectés pour un segment d'artère, à trois déformations différentes (0% de sa longueur initiale, 30% et 60%) et pour les canaux 1 et 2 du capteur de diffusion élastique (respectivement 0,53 et 1,74 mm entre la fibre d'excitation et la fibre de réception).

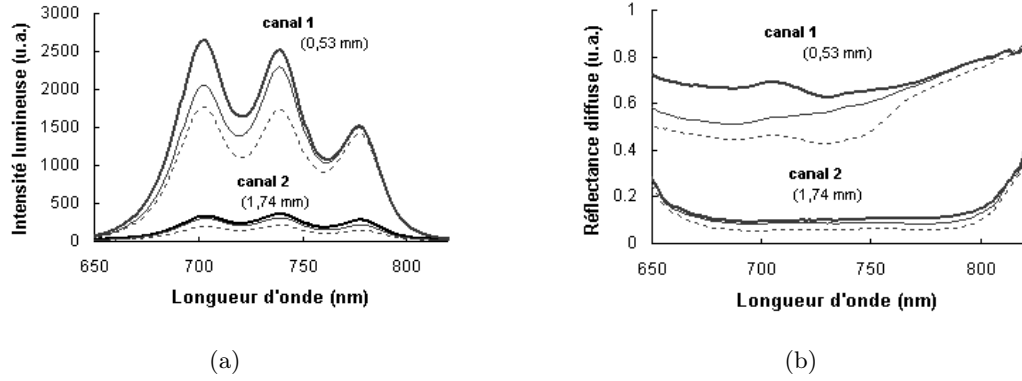


FIG. 4.13 – Exemple de (a) spectres bruts de diffusion élastique, (b) spectres de réflectance diffuse correspondant acquis à 2 distances entre les fibres d'excitation-émission (canal 1 : 0,53 mm, canal 2 : 1,74 mm) pour 3 déformations d'une artère cryoconservée (anneau artériel n°13) : 0% (trait épais), 15% (trait fin) et 30% (trait en pointillé).

Nous observons une modification plus ou moins importante de l'amplitude de l'intensité de lumière en fonction de la contrainte appliquée selon la longueur d'onde et plus nettement visible pour le canal 1. Plus la déformation augmente, plus l'intensité lumineuse globale diminue. L'intensité lumineuse reste constante pour le canal 2 et diminue pour le canal 1. Les photons du canal 2 parcourent un chemin plus grand entre les fibres excitatrices du canal 2 et la fibre de réception, ce qui entraîne une plus grande perte d'énergie (absorption, réfraction, transmission). Cela se traduit par une intensité globale plus faible du deuxième groupe de spectres (canal 2).

Afin de rechercher les corrélations existantes entre les variations d'amplitude spectrale et les valeurs de déformation, nous calculons l'aire sous la courbe pour chaque spectre et pour chaque déformation imposée. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 4.14.

Nous constatons que l'intensité lumineuse est plus forte pour les échantillons cryoconservés que pour les échantillons frais.

Nous comparons ces résultats à l'aide des tests statistiques des TAB. 4.6 et TAB. 4.7.

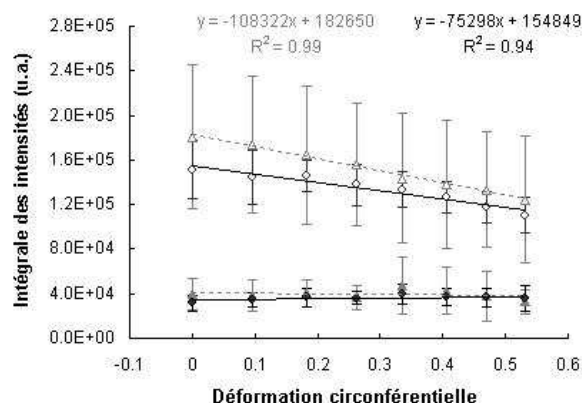


FIG. 4.14 – Aires sous les courbes d'intensité spectrale de diffusion élastique en fonction de la déformation appliquée (moyenne sur l'ensemble des échantillons) $\pm$ SD, pour le canal 1 (ronds ou triangles vides) et pour le canal 2 (ronds ou triangles pleins). Les ronds et les triangles correspondent respectivement aux anneaux frais et cryoconservés.

TAB. 4.6 – Test statistique : Anova, $p < 0,05$.

	Sources de variations	F_{calc}	Valeurs critiques de F	Indice de significativité
Canal 1	Frais / Cryoconservé	50,4	5,6	DS
	Contrainte	21,9	3,8	DS
Canal 2	Frais / Cryoconservé	7,6	5,6	DS
	Contrainte	2,4	3,8	NS

TAB. 4.7 – Test T de Student-Fisher (seuil de risque : 0,05).

		T_{calc}	T	
Canal 1	Intra cochon : artères fraîches (n=8)	0,1	2,4	NS
	Intra cochon : artères cryoconservées (n=8)	1,3	2,4	NS
	Inter cochons : artères fraîches et cryoconservées (n=16)	2,6	2,1	DS
Canal 2	Intra cochon : artères fraîches (n=8)	1,0	2,4	NS
	Intra cochon : artères cryoconservées (n=8)	0,04	2,4	NS
	Inter cochons : artères fraîches et cryoconservées (n=16)	0,7	2,1	NS

Sur le graphique 4.13, nous observons une diminution significative des valeurs d'intensité pour le canal 1 (0,53 mm de distance) vérifiée par un test Anova ($p < 0,05$: TAB. 4.6) . Par ailleurs, un décalage significatif peut également être noté entre les points des échantillons frais et ceux des échantillons cryoconservés (test Anova, $p < 0,05$: TAB. 4.6).

Les spectres de diffusion élastique résultant du premier canal d'excitation semblent ainsi pouvoir constituer des indicateurs des différences de comportement optique liées à l'état de déformation mécanique des échantillons testés. Les variations d'intensité de spectres de diffusion élastique

sont bien corrélées aussi bien avec les modifications d'organisation structurale dues à l'élongation, qu'avec les propriétés mécaniques des artères.

L'intensité lumineuse correspondant aux spectres issus du canal 2 varie très peu, que ce soit pour les anneaux frais ou pour les anneaux cryoconservés. Par ailleurs, pour ce canal, les points correspondant à l'aire sous la courbe pour les échantillons frais et cryoconservés sont presque identiques (Fig. 4.14). Le test de Student confirme ces résultats, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différence significative entre les anneaux frais et les anneaux cryoconservés quand nous mesurons la réflectance diffuse à une distance de 1,74 mm.

Le fait que le rayonnement diffusé parcourt une plus grande distance entre la fibres excitatrice et les fibres réceptrices pourrait contribuer à expliquer ces deux phénomènes. Ceci induirait ainsi un signal à détecter trop faible pour observer de véritables variations d'intensité entre anneaux frais et cryoconservés d'une part et pour différentes déformations d'autre part.

4.3.4 Simulations

4.3.4.1 Simulations réalisées avec les paramètres optiques tirés de la littérature

Pour la simulation, nous avons d'abord utilisé une combinaison de valeurs tirées de la littérature [Cheong *et al.*, 1990] [Muller and Roggan, 1995]). Le tableau (TAB. 4.8) répertorie les valeurs des paramètres optiques de l'intima, de la média et de l'adventice. Les valeurs des indices de réfraction se trouvent en annexe B, TAB. B.2).

TAB. 4.8 – Paramètres optiques du tissu artériel tirés de la littérature et implémentés dans nos simulations (Ref. 1 : [Cheong *et al.*, 1990], 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
	1 064	2,3	165	0,97	2
Media	476	7,3	410	0,89	1
	580	4,8	331	0,90	1
	600	2,5	323	0,89	1
	633	2,3	310	0,90	1
	1 064	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
	1 064	2	484	0,97	2

Compte tenu du fait que les valeurs peu nombreuses disponibles dans la littérature ne concernent que quelques longueurs d'onde particulières (5 valeurs connues pour l'intima, la média et l'adventice), pour travailler sur une large bande spectrale (entre 600 et 800 nm), nous avons interpolé les valeurs correspondantes aux autres longueurs d'onde (20 valeurs, une valeur tous les 10 nm). Dix millions de photons ont été lancés pour chaque simulation soit cinq cent mille photons par longueur d'onde.

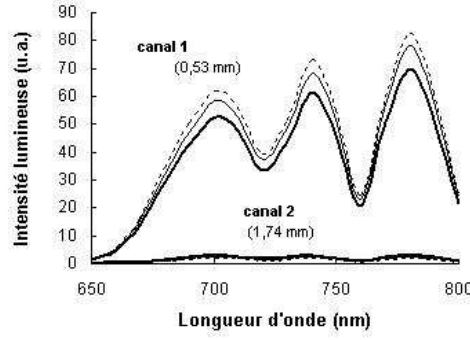


FIG. 4.15 – Spectres de diffusion élastique simulés.

Lorsque nous utilisons les valeurs des paramètres tirées de la littérature (TAB. 4.8 et annexe TAB. B.2) et lorsque nous comparons les figures 4.13(a) et 4.15, nous notons que nous obtenons les mêmes variations pour le canal 2 : l'intensité globale des spectres diminue lorsque la déformation augmente. En revanche, les variations sont opposées pour le canal 1. En effet, la propagation de la lumière est influencée par les propriétés optiques fondamentales et macroscopiques, en particulier par les coefficients d'absorption μ_a et de diffusion μ_s , l'indice de réfraction n et le facteur d'anisotropie g .

En observant plus précisément les paramètres optiques, notamment μ_s à 1064 nm, nous remarquons que μ_s diminue entre 400 et 633 nm et augmente considérablement à 1024 nm. Notre interpolation entre 633 et 800 nm prend en compte la dernière valeur à 1064 nm : cela affecte les résultats des simulations réalisées. Par ailleurs, les paramètres optiques tirés de la littérature n'ont pas été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales.

4.3.4.2 Simulations réalisées avec nos paramètres optiques

« Optimisation » des paramètres optiques :

Les observations mentionnées ci-dessus nous ont conduit à rechercher une « optimisation » des valeurs des paramètres optiques μ_a , μ_s et g pour nos expériences. Nous avons décidé de garder les valeurs de n comme présentées dans la littérature (l'influence de ce paramètre est limitée). Nous avons recherché les valeurs de chaque paramètre optique pour une longueur d'onde donnée, qui réduisent au minimum la fonction coût définie à une longueur d'onde λ par :

$$Error(p) = \sum_{i=1}^n |S_m(\lambda) - S(\lambda, p)| \quad (4.12)$$

avec $S_m(\lambda)$ le spectre de réflectance mesuré et $S(\lambda, p)$ le spectre de réflectance diffuse simulé et p le vecteur des paramètres à optimiser $p = [\mu_a^M, \mu_a^A, \mu_a^I, \mu_s^M, \mu_s^A, \mu_s^I, g^M, g^A, g^I]^T$.

Comme le gradient de la fonction exacte à optimiser représentant la propagation des interactions lumière-tissu ne peut pas être estimé en un temps court puisque nous ne disposons pas d'une expression analytique de la fonction, des méthodes d'optimisation n'utilisant pas de dérivée doivent être utilisées (méthodes de degré zéro ou méthodes sans dérivées). L'avantage principal de ces méthodes sans dérivées est qu'il n'est pas nécessaire de calculer la dérivée de la fonction à optimiser et que nous parvenons à des valeurs optimales dans un temps raisonnable (en terme de méthode).

Un exemple de ces méthodes est l'algorithme d'optimisation du *simplexe de Nelder-Mead*, qui utilise un ensemble d'évaluations de la fonction à optimiser pour changer à chaque itération un des paramètres. Le simplexe est très précis pour des conditions initiales proches de la solution. Dans cette méthode, le simplexe est un polyèdre contenant $N + 1$ sommets dans un espace à N dimension(s), N étant la taille du vecteur paramètre p à optimiser et les valeurs de la fonction $f(p_i)$ définissant les sommets ($i \in [0, N]$). Par exemple, si la fonction à optimiser a deux paramètres, alors le simplexe est un triangle [Esteco, 2007].

Dans notre cas, les paramètres à optimiser étant au nombre de 9 (μ_a , μ_s et g pour les trois couches), le simplexe est alors un tétraèdre.

Le point de départ de l'algorithme est un simplexe dont les sommets définissent les valeurs initiales des paramètres à optimiser. D'abord la fonction est évaluée à chaque sommet pour identifier le sommet avec la valeur de $f(p)$ la plus grande. En général, les premiers pas de la méthode vont déplacer le point dont la valeur $f(p)$ est la plus grande vers le côté opposé du simplexe. Ces changements de sommets sont appelés des « réflexions ». Mais, si la forme de l'espace de recherche le permet, la méthode va effectuer des « expansions » du simplexe pour faire des déplacements plus grands. Lorsque le simplexe atteint une zone de forme convexe (pour une minimisation), la méthode va effectuer des « contractions » du simplexe dans la direction transversale pour essayer de continuer la descente. Un critère d'arrêt communément utilisé est la taille du simplexe : lorsqu'elle est plus petite qu'un seuil établi, la méthode s'arrête. Le choix de la symétrie (« réflexions », « expansions », « contractions ») est effectué selon les valeurs de f_p .

Les figures 4.16 montrent les variations des coefficients d'absorption, de diffusion et du facteur d'anisotropie en fonction de la déformation appliquée pour la média, l'adventice et l'intima. Les valeurs minimisant notre fonction d'erreur (équation 4.12) sont présentées pour $\lambda = 700, 740, 780$ nm pour trois contraintes différentes.

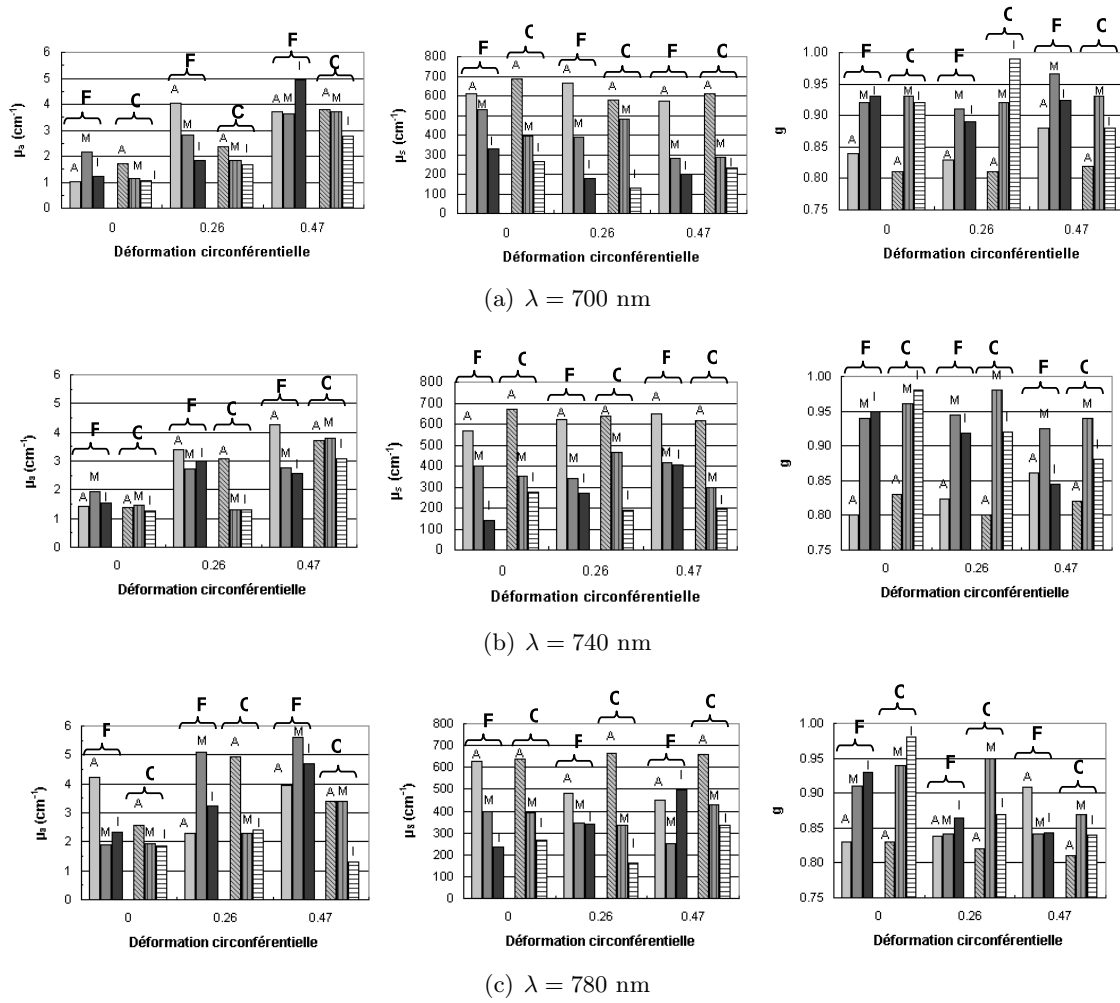


FIG. 4.16 – Valeurs des coefficients d'absorption (μ_a), de diffusion (μ_s) et du facteur d'anisotropie (g) pour la média (M), l'adventice (A) et l'intima (I) à 3 déformations différentes pour un anneau artériel frais (F) et cryoconservé (C), pour 3 longueurs d'onde différentes : (a) $\lambda = 700$ nm, (b) $\lambda = 740$ nm, (c) $\lambda = 780$ nm.

En comparant TAB. 4.8 avec ceux de la figure 4.16, nous remarquons que les paramètres optiques trouvés sont sensiblement du même ordre de grandeur que ceux tirés de la littérature, aux longueurs d'onde considérée. Quand la déformation augmente, μ_a augmente dans la média, alors que dans l'adventice, μ_a augmente et μ_s reste constant (environ 5% de variation maximum). Les résultats semblent indiquer qu'en moyenne, la média/l'adventice est moins/plus absorbant pour les artères cryoconservées, quelque soit la longueur d'onde considérée et inversement pour les artères fraîches pour $\lambda = 700, 740$ nm. Globalement, nous constatons que les coefficients d'absorption et de diffusion sont légèrement plus importants, quelque soient les longueurs d'onde et les déformations appliquées, pour les artères fraîches que pour les artères cryoconservées.

Comme les valeurs de la littérature TAB. 4.8, le facteur d'anisotropie est plus faible pour l'adventice que pour la média et l'intima, que ce soient pour les artères fraîches ou cryoconservées. Par ailleurs, le facteur d'anisotropie est légèrement plus important pour la média et l'intima des artères cryoconservées que pour ceux des artères fraîches.

Simulation en réflectance diffuse avec les paramètres trouvés :

Nous simulons les spectres de réflectance diffuse pour l'anneau artériel cryoconservé n°13 (Fig. 4.17).

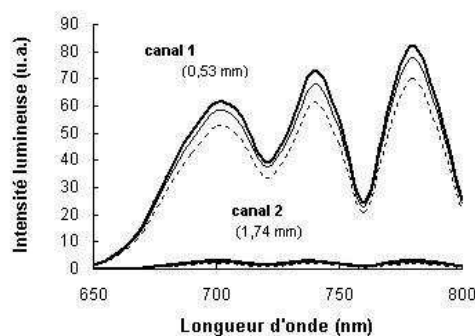


FIG. 4.17 – Spectres de diffusion élastique simulés (anneau artériel n°13), avec nos propres paramètres optiques, pour 3 déformations d'une artère cryoconservée : 0% (trait épais), 15% (trait fin) et 30% (trait en pointillé) à 2 distances entre les fibres d'excitation-émission (canal 1 : 0,53 mm, canal 2 : 1,74 mm). Durée de simulation ≈ 52 min).

Pour vérifier s'il existe des différences entre les artères fraîches et les artères cryoconservées, nous utilisons un test T de Student (TAB. 4.9).

TAB. 4.9 – Test T de Student sur les résultats simulés (canal 1 : 0,53 mm).

	T_{calc}	T	
Intra cochon : frais (n=4)	1,4	2,4	NS
Intra cochon : cryopreserved (n=4)	1	2,4	NS
Intra frais et cryoconservés (n=8)	2,3	2,1	DS

Nous notons que l'intensité globale des spectres expérimentaux et simulés diminue au fur et à mesure que la déformation augmente. Par ailleurs, ces variations sont moins marquées pour le canal 2 que pour le canal 1. Cependant, un plus important niveau d'intensité lumineuse peut être observé sur les spectres simulés dans la gamme de longueurs d'onde rouge.

Simulation en autofluorescence :

Pour la simulation en fluorescence, le spectre d'absorption du fluorophore est choisi égal à 1 à 410 nm et à 0 aux autres longueurs d'onde. Le spectre d'émission correspond à celui relevé en mode bi-photonique.

Pour comparer les spectres expérimentaux et simulés, nous calculons la valeur moyenne des différences normalisées :

$$Erreur_{moyenne} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{y_2(\lambda_i) - y_1(\lambda_i)}{y_2(\lambda_i)} \right| \quad (4.13)$$

avec N le nombre total des valeurs échantillonnées en longueurs d'onde, $y_1(\lambda_i)$ et $y_2(\lambda_i)$ représentent respectivement les spectres simulés et expérimentaux.

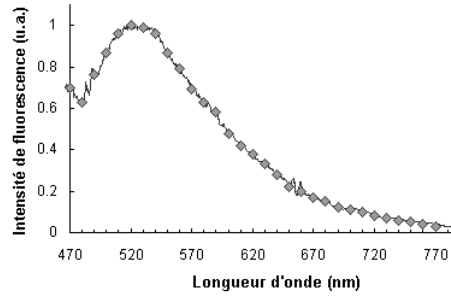


FIG. 4.18 – Spectres d'auto fluorescence mesuré et simulé avec nos propres paramètres optiques pour un anneau artériel frais ($Erreur_{moyenne}$: 3%). Durée de simulation $\approx$ 46 min).

Nous constatons que les spectres simulés sont bien corrélés aux spectres expérimentaux avec une erreur moyenne entre les deux spectres inférieure à 3%.

4.4 Conclusions et Perspectives

En résumé, les résultats obtenus sont originaux et montrent une complémentarité des deux mesures optiques :

- les caractéristiques mécaniques sont non linéaires en grandes déformations,
- les rhéogrammes diffèrent selon qu'il s'agisse d'échantillons frais ou d'échantillons cryoconservés,
- les spectres de diffusion élastique montrent qu'il existe une corrélation avec les valeurs de déformation,
- les spectres d'auto fluorescence permettent de discriminer les tissus entre eux : frais - cryoconservés.

Sur le plan instrumental, nous avons réalisé un banc de test mécanique permettant d'imposer différentes déformations uni-axiales à des anneaux artériels. Cet appareillage simple mais fiable délivre des informations sur l'état de contrainte en grandes déformations des échantillons testés et l'introduction de deux méthodes de spectrométrie (fluorescence et diffusion élastique) permet, en parallèle, l'analyse des interactions de la lumière avec les tissus sous contrainte. Il serait intéressant de pouvoir intégrer les appareils de spectrométrie sur un banc de test tridimensionnel

plus complexe permettant l'étude de segments artériels entiers, afin de se rapprocher davantage des conditions naturelles *in vivo*. Il serait aussi intéressant de valider notre technique d'analyse « mécano-optique » par des essais effectués sur des artères humaines.

Sur le plan de la corrélation des données mécaniques et optiques, les opérations mathématiques simples réalisées sur les spectres d'autofluorescence et de diffusion élastique recueillis mettent en lumière des différences significatives entre artères fraîches et cryoconservées. Par ailleurs, les variations de la déformation appliquée se traduisent, elles aussi, par des modifications d'intensité et d'allure des tracés spectraux.

Sur le plan de la modélisation, nous avons validé l'algorithme de simulation des interactions lumière-tissus développé et montrer qu'il était très important de connaître les véritables coefficients optiques du tissu considéré.

Avec les deux techniques de spectrométrie utilisées (autofluorescence et diffusion élastique), nous avons pu montrer que l'intensité des spectres recueillis était toujours plus importante pour les échantillons cryoconservés. Le fait que la cryoconservation affecte l'organisation histologique de la paroi artérielle (Fig. 4.8(b)), en la rendant plus « lâche », pourrait expliquer d'une part l'atténuation du phénomène d'absorption lumineuse et d'autre part, l'excitation plus efficace des éléments fluorescents et des centres diffuseurs de lumière. Les spectres d'intensité lumineuse permettent donc de discriminer efficacement les anneaux artériels frais des anneaux cryoconservés. Les variations spectrales observées entre différents niveaux de déformation peuvent s'expliquer par le fait que les fibres s'allongent au fur et à mesure de la déformation. La rétrodiffusion de la lumière traversant la profondeur du tissu sondé s'en trouverait donc augmentée, au détriment du signal (spectres d'autofluorescence et de diffusion élastique) recueilli. Par ailleurs, l'allongement des éprouvettes tendrait à diminuer le nombre de fluorophores et de centres diffuseurs « recrutés » dans le « champ de vision » des fibres optiques, ce qui renforcerait la diminution de l'intensité des données spectrales.

L'innovation apportée par l'association de deux techniques de spectrométrie à un banc de test mécanique ouvre la voie à la détermination des propriétés rhéologiques de tissus biologiques sans avoir nécessairement recours à des installations lourdes. Cette nouvelle approche est intéressante dans le sens où elle pourrait permettre, à terme, le développement d'un appareil souple et facilement utilisable pour des tests pré- et per-implantatoires, sans contact et atraumatiques, pour l'évaluation de la compatibilité mécanique d'un greffon artériel à réimplanter avec le site anatomique receveur.

Étude sur tumeurs de vessie de rats *in vivo*

C E chapitre présente notre seconde étude expérimentale. Après avoir déterminé les critères de choix d'un modèle animal adapté aux besoins des tests *in vivo* envisagés, nous détaillons le protocole mis en place sur un modèle de tumeur orthotopique instillée dans la vessie de rat, modèle décrit dans diverses études et mis en place au Centre Alexis Vautrin. L'analyse des résultats obtenus en spectroscopies de fluorescence et de diffusion élastique à treize distances différentes permet de caractériser la sensibilité et/ou la spécificité de la méthode pour distinguer les tissus sains, les tissus inflammatoires et les tissus tumoraux. Les objectifs de cette étude sont double. Il s'agit d'une part, de tester le système de spectroscopie bimodale mis en place au laboratoire et d'autre part, de déterminer si la combinaison des mesures en réflectance diffuse et en autofluorescence permet d'améliorer la sensibilité et la spécificité de détection des lésions tumorales dans la vessie.

5.1 Recherche d'un modèle animal et tumoral adapté

5.1.1 Pré-étude pour un modèle de tumeur spontanée

Parallèlement aux travaux de développement de l'instrumentation et aux expérimentations sur les artères, nous avons recherché des modèles de tumeur *in vivo* chez l'animal présentant des lésions à différents stades d'évolution et autorisant par ailleurs l'accès aux sites de mesure à l'aide de fibres optiques (localisation et repérage spatiaux). Et cela, dans l'objectif de déterminer les critères de choix d'un modèle animal adapté aux besoins des essais envisagés, à savoir permettre une étude diagnostique et réaliser des tests de détection aux phases les plus précoces de progression du cancer.

Selon les études décrites dans la littérature, un modèle animal bien adapté au suivi possible de la formation des cancers de la peau est celui du développement de tumeurs de peau UV-induit chez les souris albinos, sans poils [Van den Akker *et al.*, 2000] [Juzenas *et al.*, 2002] [Sokolov *et al.*, 2002] [Davidson *et al.*, 2004]. Les tumeurs de peau chez l'homme pouvant être dues à l'exposition au rayonnement UV du soleil, ce modèle correspondrait donc à un cas réaliste d'apparition de cancers de peau.

Notre choix initial s'est donc porté sur un modèle de tumeur cutanée. Il est facile d'accès

pour les expériences et il autorise un suivi possible de la formation des cancers de la peau.

Au Centre Alexis Vautrin, [Padilla Ybarra, 1999] avait mis en place un protocole de tumorigénèse chimique chez la souris sans poil (SKH-1, Charles River), protocole qui a permis de suivre, pendant 21 semaines, la transformation d'un tissu sain en tissu pathologique par spectroscopie de fluorescence induite par lumière UV (350 nm). Des modifications spectrales importantes apparaissent, dans 78% des cas, une semaine avant la détection visuelle du papillome. La longueur d'onde d'excitation choisie a permis de mettre en évidence, d'une part, la modification de la structure spectrale dans la gamme 400-450 nm correspondant au collagène, à l'élastine et au NADH au cours des étapes de développement tumoral et d'autre part, l'apparition d'un pic dans la zone du spectre correspondant aux porphyrines endogènes (vers 630 nm). En revanche, cette longueur d'onde d'excitation n'est peut-être pas la mieux adaptée pour explorer toutes les couches de la structure cutanée - compte tenu de sa faible profondeur de pénétration -.

En 1983, [De Gruijl *et al.*, 1983] ont montré les relations existant entre l'énergie radiante délivrée et le taux d'apparition tumorale (durée avant l'apparition de la première tumeur). Les irradiations et les mesures sont soit bi-, soit le plus souvent tri-hebdomadaires jusqu'à l'apparition visuelle ou palpable des lésions, à partir de $1,5 \text{ J/cm}^2$ [Bair III *et al.*, 2002] [Davidson *et al.*, 2004]. La formation tumorale dépend de deux facteurs principaux : la qualité de l'irradiation (c'est-à-dire la longueur d'onde d'excitation, notion de spectre d'action) et du régime d'exposition (distribution spatio-temporelle de l'exposition) [De Gruijl *et al.*, 1983].

[Liu *et al.*, 2004] mentionnent l'apparition de kératoses actiniques (tumeurs de diamètre inférieur à 4 mm) et de carcinomes spino-cellulaires invasifs (tumeurs de diamètre supérieur à 4 mm) respectivement en 12 et 16 semaines, à raison de 91 mJ/cm^2 d'UVB et de 52 mJ/cm^2 d'UVA, 5 fois par semaine.

[Saul *et al.*, 2005] montrent qu'après irradiation de souris par UVB trois fois par semaine pendant 10 semaines, à raison de 224 mJ/cm^2 par séance, le temps médian d'apparition de la première tumeur est de 15 à 17 semaines.

L'approche établie pour les tumeurs de peau UV-induit est le point de départ de notre réflexion pour des travaux subséquents en cours.

5.1.2 Modèle actuellement en place au laboratoire

Compte tenu de divers paramètres (nécessité d'établir totalement le modèle, temps anticipé d'apparition des tumeurs et temps théorique disponible pour notre thèse), nous avons décidé de travailler sur un modèle déjà disponible au Centre Alexis Vautrin, à savoir un modèle de tumeur de vessie de rats [El Kathib, 2005]. Il s'agit d'un modèle de tumeur orthotopique instillée dans la vessie de rat, modèle simulant la maladie dans son comportement comme dans sa composition histologique. Ce modèle consiste à réaliser un pré-traitement (acide) sur l'épithélium de la vessie du rat et à administrer de façon globale des cellules tumorales. Il permet d'obtenir des lésions de taille variable, entre trois et quinze jours.

5.2 Matériels et Méthodes

5.2.1 Banc de test

Nous utilisons le dispositif expérimental développé au cours de cette thèse (section 2.3). En résumé, il comprend deux sources lumineuses (une diode laser à 410 nm pour l'excitation en fluorescence et une lampe deutérium-tungstène halogène pour l'illumination en diffusion élastique), un spectrographe imageant et une sonde à fibres optiques composé de 13 fibres en entrée à différentes distances entre la fibre d'illumination et les fibres d'acquisition (Fig. 5.1). Nous avons choisi des distances réparties entre 271 et 1542 μm (271, 340, 528, 599, 785, 834, 1002, 1036, 1076, 1187, 1296, 1442 et 1542 μm) afin d'étudier leur influence sur l'efficacité de détection des lésions cancéreuses.

L'utilisation d'une excitation à 410 nm pour la fluorescence permet d'avoir une profondeur de pénétration dans le tissu plus importante qu'à une excitation à 350 nm, comme utilisée dans les premiers travaux du laboratoire. L'utilisation de cette longueur d'onde permet de récupérer l'émission de fluorescence des flavines et des porphyrines endogènes. Mais, nous perdons la modification de la structure spectrale dans la gamme 400-450 nm correspondant au collagène, à l'élastine et au NADH, visible avec une excitation UV à 350 nm. La baisse du NADH a d'ailleurs été étudiée par plusieurs auteurs, en utilisant différentes techniques [Beuthan *et al.*, 1998] [Pogue *et al.*, 2001].

Nous mesurons les intensités spectrales en diffusion élastique (temps d'acquisition : 50 ms) et en autofluorescence (temps d'acquisition : 2000 ms) des tissus, via la sonde multi-fibres en contact avec les tissus de la vessie ouverte.

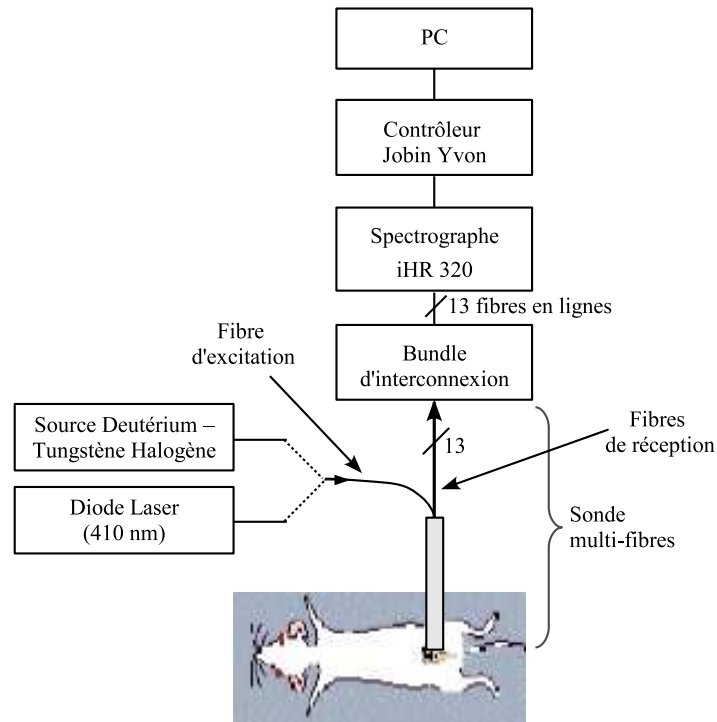


FIG. 5.1 – Représentation schématique du dispositif de mesure.

5.2.2 Protocole expérimental

Le protocole expérimental (préparation des cellules tumorales, induction tumorale des vessies de rat et chirurgie) nous a été transféré, sur la base du mémoire de thèse de [El Kathib, 2005], par Saoussen Berrahmoune que nous remercions.

5.2.2.1 Préparation des cellules tumorales

La lignée cellulaire utilisée, nommée AY27 (Animal, Yang, 27 repiquages avant sa forme finale), fournie par les Dr Selman et Hampton (Medical College of Ohio, Toledo, USA) et conservée au CAV dans l'azote liquide, vient d'un carcinome transitionnel de vessie de rat Fischer 344, obtenu après induction tumorale chimique au FANFT¹³ (N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]-formamide).

La culture de ces cellules tumorales est réalisée à 37°C en monocouche dans des boîtes stériles T-175 (175 cm², bouchon ventilé avec filtre de 0,2 µm, BD Biosciences). Nous ajoutons un soluté contenant 500 mL de milieu RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen, UK), 50 mL de sérum de veau fœtal (soit 10% du volume total de RPMI), 5 mL d'antibiotiques (streptomycine et pénicilline) et 5 mL de L-Glutamine (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Ces cellules sont maintenues dans un incubateur dont l'atmosphère contient 5% de CO₂.

Au cours de chaque passage, le milieu de culture est vidé et la boîte nettoyée avec 10 mL de PBS pour neutraliser le milieu restant. Après quelques secondes, le PBS est retiré de la boîte. Les cellules sont alors décollées à l'aide de 2 mL de trypsine¹⁴-EDTA, appliquée sur la surface où se situe le tapis cellulaire. Une fois la trypsine déposée, la boîte est stockée pendant dix minutes dans l'incubateur, à 37°C. La trypsine restante est alors jetée et les boîtes secouées afin de décoller les cellules. 10 mL de milieu sont injectés pour désactiver les effets de la trypsine. Ces 10 mL de milieu sont ensuite recueillis et passés à la centrifugeuse pendant cinq minutes à 1 500 tours/min. Après centrifugation, le milieu est jeté et remplacé et les cellules comptées à l'aide d'une cellule de Thoma (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) et d'un ajout de bleu de Trypan pour repérer les cellules mortes (test d'exclusion au bleu de trypan : 0,5 mL de suspension cellulaire et 0,5 mL de bleu de trypan). Enfin, les cellules sont déposées dans les nouvelles boîtes jusqu'à l'obtention d'une concentration de 10⁶ cellules par mL (Fig. 5.2). La sélection de la concentration dépend du temps disponible pour faire les mesures. Si nous souhaitons obtenir une confluence cellulaire au bout de six ou sept jours, nous disposons 10⁴ cellules par mL. Si nous souhaitons augmenter la durée de culture, il suffit de mettre moins de cellules.

La suspension cellulaire est directement utilisée pour l'instillation de la vessie. Pour une implantation orthotopique, 4.10⁶ cellules dans 1 mL sont instillées dans la vessie.

5.2.2.2 Animaux

Les rats utilisés pour développer ce modèle tumoral sont des rats femelles Fischer 344 (Harlan, France). L'étude porte sur 42 rats (femelles) âgés de 6 semaines et pesant entre 115 et 150 g. Ils sont placés par groupe de quatre par cage, dans l'animalerie conventionnelle (Faculté de Médecine, Nancy), à une température de 22°C ± 2°C avec un cycle jour/nuit de 12 heures ; ils reçoivent un régime alimentaire standard et de l'eau à volonté, conformément aux lignes

¹³Initiateur de tumeur dérivé de nitrofuranne efficace. Il produit des tumeurs de vessie chez tous les animaux étudiés et est mutagénique à beaucoup de bactéries.

¹⁴Enzyme digestive du suc pancréatique qui a pour but de digérer les protéines.

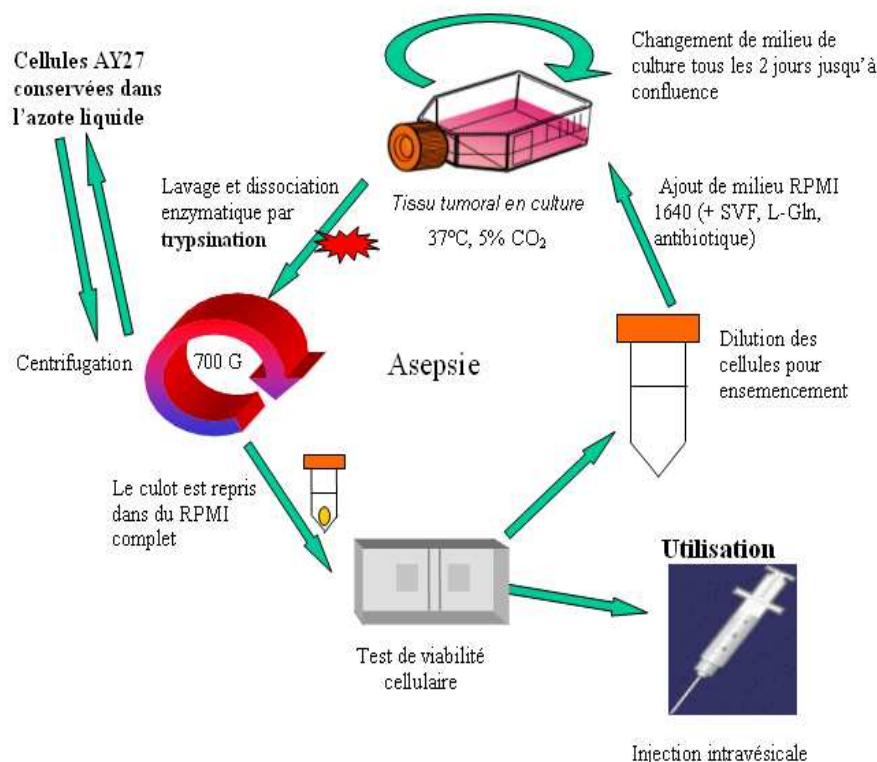


FIG. 5.2 – Schéma de principe du protocole de mise en culture des cellules tumorales AY27. Les cellules sont préalablement stockées et congelées dans l'azote liquide. Après centrifugation, le culot est repris dans du milieu RPMI 1640 et sert pour l'ensemencement.

directrices institutionnelles et nationales.

Les rats sont répartis en trois groupes différents selon le temps d'incubation entre l'administration des cellules tumorales et les mesures spectroscopiques [Péry *et al.*, 2006b] :

- 1 rat sain sans instillation ; 10 rats instillés, 3 rats instillés seulement avec HCl/NaOH et PBS. L'incubation avant les mesures est de 3 jours,
- 1 rat sain sans instillation ; 10 rats instillés, 3 rats instillés seulement avec HCl/NaOH et PBS. L'incubation avant les mesures est de 7 jours,
- 1 rat sain sans instillation ; 10 rats instillés, 3 rats instillés seulement avec HCl/NaOH et PBS. L'incubation avant les mesures est de 14 jours.

Chaque groupe de mesure est donc composé de : 10 rats instillés, 3 rats instillés uniquement avec HCL/NaOH et 1 rat sain, qui sert de référence négative.

5.2.2.3 Induction tumorale des vessies de rat

Nous utilisons une méthode d'instillation de tumeur de vessie qualifiée de globale [El Kathib, 2005]. Elle nécessite l'utilisation d'un fil guide, de cathéters, d'une couverture chauffante et de diverses solutions : une solution d'Acide Chlorhydrique (HCl) 0,1 N (500 μ L), une solution d'Hydroxyde de Sodium (NaOH) diluée à 0,1 N (500 μ L) et une suspension de cellules tumorales (1 mL).

Le fil guide a pour but de faciliter l'insertion des cathéters dans la vessie. Ces derniers permettent d'injecter les liquides dans la vessie et la couverture chauffante garde la température corporelle du rat dans une plage acceptable afin d'éviter toute hypothermie.

Une fois le matériel préparé, nous pesons les rats pour déterminer la dose d'anesthésiant à administrer : le calcul des doses est très important, une erreur pouvant provoquer l'arrêt cardiaque. L'anesthésiant utilisé, injecté en intrapéritoine, est du pentobarbital sodique (Sanofi, France), prescrit à raison de 45 mg/kg et concentré à 5,47 g/100 mL.

Une fois endormi, le rat est placé en décubitus dorsal sur la couverture chauffante et sa vessie est cathétérisée par voie intra-veineuse (IV) avec un cathéter 16G (diamètre : 1,70 mm, longueur : 51 mm ; Terumo, Surflo). Un fil guide est inséré dans son urètre jusqu'à atteindre la vessie puis le cathéter est installé en se servant du fil guide. Le cathéter en place, nous injectons les différents liquides cités précédemment. Au préalable, pour éviter toute dilution des solutions, la vessie est vidée de son urine, par pression sur le bas ventre du rat. Dès que cette opération est terminée, nous passons à l'étape suivante : *l'implantation des cellules tumorales*.

Le conditionnement de l'épithélium de la vessie est réalisé par instillation intravésicale : nous utilisons une solution d'HCl pour endommager la partie interne de la vessie, afin de faciliter l'accrochage des cellules tumorales (les cellules épithéliales saines de la paroi interne de la vessie empêcheraient la fixation des cellules AY27). La solution est introduite pendant 15 secondes dans la vessie du rat mais pour éviter de trop grosses lésions, l'acide est ensuite neutralisé avec un bain de NaOH pendant 15 secondes. La vessie est alors vidée, lavée plusieurs fois avec du PBS puis une fois avec 0,5 mL de suspension cellulaire. 0,5 mL de la solution tumorale sont alors instillés dans la vessie pendant 1 heure, le temps que les cellules se fixent aux parois vésicales. A la fin des manipulations, la vessie est vidée, le cathéter est enlevé et les rats sont remis dans une cage sans litière jusqu'à ce que les effets de l'anesthésiant se dissipent. Enfin, ils réintègrent leur cage d'origine, sont conduits à l'animalerie, où est établi un relevé de leur poids pour contrôler le développement tumoral.

5.2.2.4 Chirurgie et Mesures

Nous procédons à une laparotomie. Chaque animal est anesthésié avec une dose de Pentobarbital 50% plus forte que pour l'instillation. L'animal est opéré pour que nous puissions accéder à la vessie et procéder aux mesures *in vivo* (rat vivant et vessie irriguée en sang). L'abdomen de l'animal est donc sectionné afin de dégager une zone de travail suffisamment grande, pour visualiser correctement la vessie : la coupe s'étend du diaphragme au méat urinaire. Une fois dégagée, la vessie est stabilisée puis ouverte pour permettre d'insérer le capteur à fibres optiques et relever les spectres des différents sites sains et tumoraux. Trois spectres sont acquis pour chaque site pour éviter toute erreur de manipulation et pour disposer de suffisamment de données sans avoir à sacrifier d'autres animaux.

Les expériences spectroscopiques sont réalisées 3, 7 et 14 jours après la date d'instillation tumorale (implantation théorique). Nous définissons trois sites de mesures (Fig. 5.3) : le premier en haut à gauche de la vessie, le second en haut à droite de la vessie et le dernier se situe en bas, près de l'urètre.

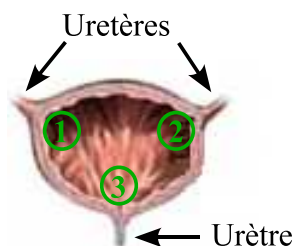


FIG. 5.3 – Sites des mesures spectroscopiques.

Une fois les spectres enregistrés, nous marquons la zone testée et prélevons la vessie avant de procéder à l'analyse histologique des coupes paraffinées sans perdre la visualisation de la zone mesurée. Plusieurs solutions ont été envisagées : aiguille surmontée d'une boule de couleur, carbonisation locale du tissu... Finalement, nous avons utilisé de l'encre de chine verte, bleue et noire. L'avantage de ce produit est qu'il reste fixé sur le tissu lorsqu'il est plongé dans le fixateur.

5.2.2.5 Étude histologique

Après les mesures spectroscopiques, chaque animal est euthanasié par injection d'une dose mortelle de pentobarbital sodique dans le cœur. La vessie est extraite pour prélèvements histologiques. Le rat mort est recousu et placé dans un compartiment de stockage avant évacuation vers un circuit réglementaire d'élimination des déchets (incinération).

L'échantillon de vessie est conservé dans une boîte remplie de formaldéhyde (CH_2O) avant d'être placé dans de la paraffine et coloré avec Hematoxyline - Eosine (HE) par le service d'Anatomie Pathologique du Centre Alexis Vautrin. La confection des coupes de $5\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur est réalisée avec un microtome (Microm Heidelberg HM350, Allemagne).

Des clichés de ces lames sont réalisés au microscope binoculaire du Centre Alexis Vautrin (Microscope Olympus). La classification histologique, réalisée par le docteur Marie-Ange D'Hallewin, urologue, est effectuée en tenant compte des sites de mesure.

Nous obtenons trois classes principales : sites sains (89 sites), inflammatoires (11 sites) et tumoraux (19 sites). Une autre catégorie de sites classés hémorragiques ou œdèmes est relevée (6 sites). 18 tissus supposés sains, 1 tissu supposé inflammatoire et 1 tissu supposé tumeur invasive n'ont pas été utilisés pour l'expertise, en raison de l'incertitude de leur classement.

Ainsi, pour l'expertise, nous disposons de 71 sites classés sains, 10 sites classés inflammatoires et 18 sites classés tumoraux. Les sites sains peuvent être divisés en deux sous-classes : tissus sains avec épithélium (53 sites) ou sans épithélium (18 sites) ; les sites tumoraux en trois sous-classes : tumeurs superficielles (3 sites), sub-épithéliales (11 sites) et invasives (4 sites).

5.2.3 Traitements et analyses des données

5.2.3.1 Pré-traitements des spectres d'autofluorescence et de diffusion élastique

Pour chaque site - chaque endroit mesuré du tissu - trois spectres d'autofluorescence et trois spectres de diffusion élastique sont mesurés. Nous filtrons ces spectres pour réduire le bruit de « hautes fréquences » et nous en effectuons la moyenne. Après réalisation d'une normalisation à partir des spectres acquis sur le Téflon, nous remarquons que l'intensité lumineuse est différente pour les treize distances de mesure. Nous calculons alors des coefficients de correction, différents selon la distance choisie entre la fibre d'excitation et la fibre de réception, coefficients qui sont ensuite appliqués aux spectres d'autofluorescence et de diffusion élastique.

A partir des spectres de diffusion élastique, nous calculons les spectres de réflectance diffuse en divisant les spectres de diffusion élastique par le spectre acquis sur le Téflon.

Que ce soit pour les spectres d'autofluorescence ou pour les spectres de réflectance diffuse, les différents traitements réalisés sont détaillés dans les paragraphes 5.3.3.1 et 5.3.3.2 et seuls quelques résultats sont développés.

5.2.3.2 Modélisation et calcul des spectres de fluorescence intrinsèque

Nous utilisons une approximation de premier ordre, proposée par [De Veld, 2005], pour obtenir les spectres d'autofluorescence intrinsèque en divisant les spectres d'autofluorescence par les spectres de réflectance diffuse colocalisés spatialement et élevés à une puissance $k(\lambda)$. Pour la diffusion de la lumière, la réflectance diffuse totale $R_d(\lambda)$ est exprimée comme une fraction du flux incident et est liée au coefficient d'absorption $\mu_a(\lambda)$:

$$R_d(\lambda) = e^{-\mu_a(\lambda)l_r} \quad (5.1)$$

l_r désigne le libre-parcours moyen des photons de réflectance diffuse (indice r) dans le tissu. Toutes ces variables sont dépendantes de la longueur d'onde. L'autofluorescence enregistrée peut s'écrire $F_a(\lambda)$ s'écrit de la même façon :

$$F_a(\lambda) = e^{-\mu_a(\lambda)l_f} F_i(\lambda) \quad (5.2)$$

avec $F_i(\lambda)$ la fluorescence intrinsèque des fluorophores et l_f le libre-parcours moyen d'autofluorescence dans le tissu. Dans un modèle simple avec une distribution homogène des diffuseurs et des fluorophores, le coefficient d'absorption est considéré comme constant quel que soit l'endroit dans le tissu et dépend seulement de la longueur d'onde des photons.

Pour une longueur d'onde donnée, il existe une différence entre les libre-parcours moyens de réflectance diffuse et de fluorescence. Nous pouvons alors écrire $l_f = k(\lambda) l_r$ avec $k(\lambda)$, coefficient de proportionnalité, en principe inférieur à 1 et dépendant du tissu considéré. Ainsi, en combinant les équations (5.1) et (5.2), nous obtenons :

$$F_i(\lambda) = \frac{F_a(\lambda)}{e^{-\mu_a(\lambda)l_f}} = \frac{F_a(\lambda)}{R_d(\lambda)^{k(\lambda)}} \quad (5.3)$$

Nous faisons l'hypothèse simplificative dans la suite de cette étude que $k(\lambda)$ est indépendant de la longueur d'onde. Compte tenu des résultats qui montrent de faibles creux/pics d'absorption du sang dans la bande 500-700 nm. La valeur de k cherchée est telle que les variations spectrales dues au coefficient d'absorption du sang, qui apparaissent autour de 545 et 575 nm, sont aussi

réduites que possible dans les spectres d'autofluorescence intrinsèque. L'obtention d'une valeur optimisée de k a été réalisée en minimisant la surface d'un triangle dont les sommets sont les intensités aux longueurs d'onde 563, 582 et 604 nm (algorithme de Levenberg-Marquardt). Ces points sont choisis empiriquement après visualisation des spectres résultants. En effet, nous avons constaté qu'inclure le pic d'absorption du sang à 545 nm dans l'algorithme donnait un résultat moins satisfaisant : les pics d'absorption étaient trop prononcés dans les spectres de fluorescence intrinsèque. D'autres modèles d'obtention des spectres de fluorescence intrinsèque, plus longs à mettre en œuvre, existent [Muller *et al.*, 2001] [Diamond *et al.*, 2003] : ils prennent en compte la géométrie de la sonde, la dispersion et requièrent des mesures sur des fantômes de tissu.

5.2.3.3 Analyse des données

Analyse statistique : Avant d'effectuer des tests paramétriques, nous nous assurons que la distribution des échantillons est compatible avec l'hypothèse de distribution gaussienne de la variable (test de normalité : test du χ^2).

Des tests T de Student-Fisher, pour des échantillons non appariés, sont utilisés pour indiquer s'il existe des différences significatives entre les tissus sains, les tissus inflammatoires et les tissus tumoraux. Une probabilité p inférieure à 5% est considérée comme indiquant une différence statistiquement significative. Ces tests sont appliqués aux différents paramètres caractéristiques calculés à partir des spectres et qui sont présentés plus loin (section 5.3).

Classification à partir des caractéristiques spectrales : A ce stade de notre réflexion, nous nous proposons d'aborder succinctement l'analyse des signaux d'autofluorescence, de réflectance diffuse et de fluorescence intrinsèque dans un espace multidimensionnel.

La classification histologique étant connue, l'objectif final est de comparer les résultats de la classification histologique avec ceux de la classification « spectroscopique ». Le but final est de fournir une valeur de la sensibilité et de la spécificité caractérisant l'efficacité globale de la méthode de détection développée.

Dans ce cadre, les données expérimentales (intensités spectrales d'autofluorescence et de réflectance diffuse) sont considérées comme des entités (échantillons ou sites tissulaires) décrites par des variables explicatives, variables desquelles on extrait des aires sous la courbe, des ratios d'intensité, des pentes... (cf. partie 5.3). La représentation d'une entité est un point dans l'espace engendré par les variables explicatives qui constituent ses axes. Les caractéristiques de cet espace dépendent des variables explicatives utilisées, de leur nombre (qui détermine la dimension de l'espace), de leurs valeurs (qui servent à calculer la distance entre deux points) et des relations entre elles (variables corrélées ou non corrélées) [Ranta, 2003].

La construction d'un espace de représentation pertinent revient à rechercher les caractéristiques utiles à partir du jeu de caractéristiques ou à éliminer la redondance et les variables « nuisibles ». Cela implique deux étapes [Saporta, 1990] [Escofier and Pagès, 2002] :

1. l'extraction des caractéristiques : nous créons de nouvelles variables explicatives non-corrélées et cherchons à garder un maximum de variance dans l'ensemble des points à classer. La méthode classique est l'analyse en composantes principales (ACP) qui redéfinit les axes de l'espace de classification comme des combinaisons linéaires des anciennes

caractéristiques, tout en assurant l'orthogonalité et les directions privilégiées qui maximisent la variance [Morgenthaler, 2001]. Un avantage important de l'ACP est la possibilité de réduire le nombre de variables explicatives et donc la dimension de l'espace de travail. Son principal inconvénient réside dans le risque de manque de signification « physique » des nouvelles variables explicatives,

2. la sélection des caractéristiques : elle implique, comme son nom l'indique, le choix de variables explicatives utiles et pertinentes.

Dans notre cas, le choix initial des variables explicatives porte sur des caractéristiques d'intérêts particuliers, « plus ou moins empiriques », calculées à partir des spectres obtenus.

Nous utilisons une méthode de classification non supervisée hiérarchique pour différencier les classes [Lebart *et al.*, 2002]. La classification non supervisée vise à déterminer des classes (groupes) d'éléments homogènes et bien séparés à partir d'un ensemble global. Cette méthode fournit un ensemble de partitions en classes de moins en moins fines obtenues par regroupements successifs de parties. Le résultat d'une classification hiérarchique se représente graphiquement par un dendrogramme ou arbre de classification. Les points situés aux extrémités des branches du dendrogramme représentent les éléments à classer ; la hauteur de la branche qui les relie est donnée par la distance entre ces points. Ce dendrogramme est obtenu dans la plupart des méthodes de manière ascendante : les individus proches sont regroupés en classes, qui sont à leur tour regroupées en « supra-classes » jusqu'à l'obtention d'une classe unique contenant tous les points.

Pour associer les classes proches en « supra-classes », différentes distances D_{ij} entre deux classes i, j (avec x_i et x_j des points appartenant respectivement aux classes i et j) peuvent être calculées telles que [Saporta, 1990] :

- la distance moyenne. Elle calcule la distance entre deux classes comme la moyenne des distances point par point :

$$D_{ij,moy} = \frac{1}{n_i n_j} \sum_{i,j} d(x_i, x_j) \quad (5.4)$$

avec n_i et n_j le nombre total de points dans les classes i et j .

- la distance du plus proche voisin. Elle considère que la distance entre deux classes est donnée par la distance minimale qui les sépare (celle entre les deux points les plus proches appartenant à chacune des classes) :

$$D_{ij,min} = \min_{i,j} d(x_i, x_j) \quad (5.5)$$

- la distance du plus éloigné voisin. Elle considère que la distance entre deux classes est donnée par la distance entre les deux points les plus éloignés appartenant chacun à une des classes :

$$D_{ij,max} = \max_{i,j} d(x_i, x_j) \quad (5.6)$$

- la distance des barycentres. Elle calcule la distance entre deux classes comme la distance entre les barycentres :

$$D_{ij,\mu} = d(\mu_i, \mu_j) \quad (5.7)$$

- la distance de Ward. Cette dernière propose l'association des classes qui diminue le moins possible l'inertie interclasse¹⁵ :

$$D_{ij,Ward} = \frac{n_i n_j}{n_i + n_j} D_{ij,\mu}^2 \quad (5.8)$$

[Saporta, 1990] recommande l'utilisation de la distance de Ward lorsque l'espace de travail est muni d'une métrique euclidienne.

Pour cette raison, nous utilisons la distance de Ward dans nos travaux.

5.2.3.4 Synthèse des traitements des données

La figure 5.4 représente l'ensemble des traitements réalisés sur les spectres d'autofluorescence et de réflectance diffuse.

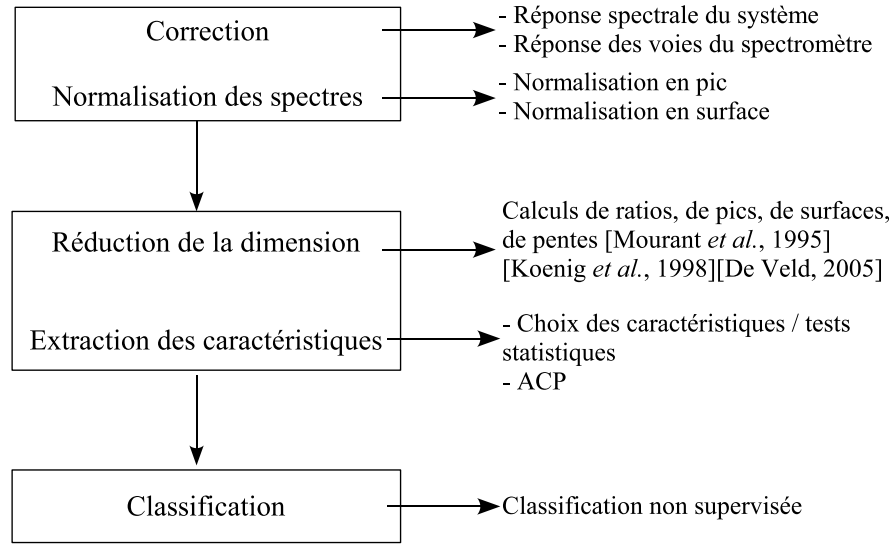


FIG. 5.4 – Schéma récapitulant les traitements réalisés.

5.3 Résultats et Discussion

5.3.1 Culture cellulaire et induction tumorale

Les cellules AY-27 repiquées à raison de 10^4 cellules par mL arrivent à confluence au bout de six ou sept jours. Après trypsination et centrifugation, le test de viabilité cellulaire est réalisé et nous dénombrons de 3 à 5.10^6 cellules/ml selon les boîtes de culture.

Le taux de tumeurs induites (incidence tumorale) est de 100%, révélant que toutes les inductions tumorales ont abouti à un cancer de la vessie chez les rats. Nous avons d'ailleurs remarqué que tous les rats montraient une importante diminution du poids après induction tumorale, suivie quelques jours plus tard d'une reprise de poids, conséquence probable d'une forme d'adaptation. L'analyse microscopique confirme la présence de cancers de vessie chez les rats, dont le temps

¹⁵L'inertie interclasse se définit comme la variance des barycentres, chaque barycentre ayant un poids égal à l'effectif de la classe correspondante.

d'incubation est de 14 jours et révèle que les tumeurs sont bien identifiables par leur aspect irrégulier.

5.3.2 Étude histologique

La figure 5.5 montre des exemples typiques de coupes histologiques de tissus sains, inflammatoires et tumoraux (tumeur invasive). Les résultats montrent que la taille de la tumeur n'est pas directement en relation avec la durée d'incubation : des variations peuvent être observées aussi bien dans la taille de la tumeur qu'au niveau du degré d'infiltration et de la desquamation de l'épithélium. En fait, les tumeurs ne se développent pas de la même façon selon la localisation sur le tissu ou la proximité des vaisseaux sanguins. Par ailleurs, un conditionnement global et une instillation globale conduisent à une localisation aléatoire des tumeurs.

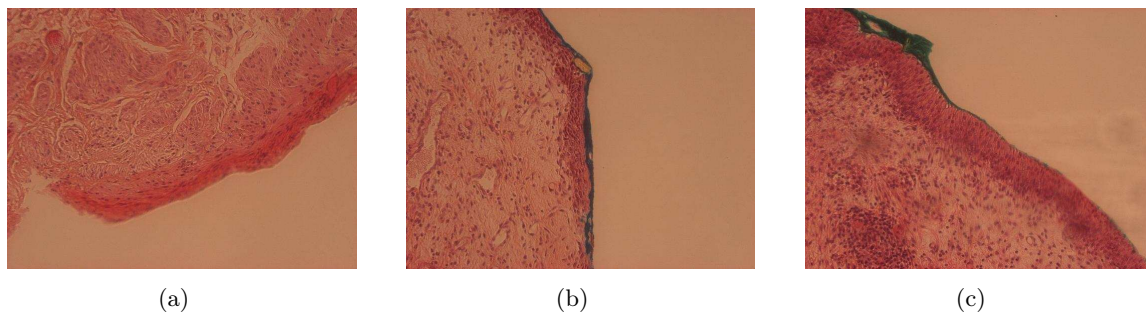


FIG. 5.5 – Exemples d'images de coupes histologiques (grossissement x10) (a) tissu normal, (b) tissu inflammatoire, (c) tissu tumoral.

5.3.3 Résultats spectrométriques

Par souci de lisibilité des graphiques, pour comparer les résultats obtenus à partir des tissus sains, inflammatoires et tumoraux, seuls les spectres correspondant à la fibre d'acquisition la plus proche de la fibre d'illumination sont représentés (distance : $271\text{ }\mu\text{m}$). Les mêmes observations et analyses sont effectuées pour chacune des douze autres voies d'acquisition. Après regroupement des spectres en fonction du classement histologique des coupes, nous comparons statistiquement les spectres afin d'observer s'il existe des différences significatives entre ces groupes sur la base d'indices particuliers que nous précisons par la suite. Seuls quelques-uns des résultats des nombreux tests statistiques réalisés sont présentés dans ces travaux.

5.3.3.1 Autofluorescence

En LIFS (« Light Induced Fluorescence Spectroscopy »), les critères de discrimination sont basés sur les changements de caractéristiques d'autofluorescence entre le tissu pathologique et le tissu sain. Deux causes principales modifient les spectres : la différence des propriétés optiques des tissus, en raison de la spécificité de leur structure et la différence de concentration des fluorophores endogènes (flavines, porphyrines, élastine, collagène).

Comme nous l'avons noté dans le chapitre 1, la LIFS a été appliquée par plusieurs équipes dans le but de détecter des tumeurs malignes superficielles. La plupart de ces équipes ont travaillé avec une longueur d'onde d'excitation située dans la région bleue du spectre électromagnétique. Cette excitation permet de récupérer le spectre de fluorescence des fluorophores endogènes au-delà de

450 nm. La différence de concentration des fluorophores entre tumeurs et tissus normaux adjacents s'exprime par une différence spectrale dans le rouge capable de discriminer les tumeurs ; cependant, l'identification des états pré-cancéreux reste délicate.

Dans cette étude, en excitant à 410 nm, nous pouvons récupérer l'émission de fluorescence des flavines, des porphyrines endogènes, de l'élastine, du collagène et du NaDH.

Les figures 5.6(a) et 5.6(b) représentent un exemple de spectres d'auto fluorescence corrigés et filtrés pour des tissus classés sains, inflammatoires et tumoraux pour la plus faible distance entre les fibres d'excitation et d'émission (distance : 271 μm).

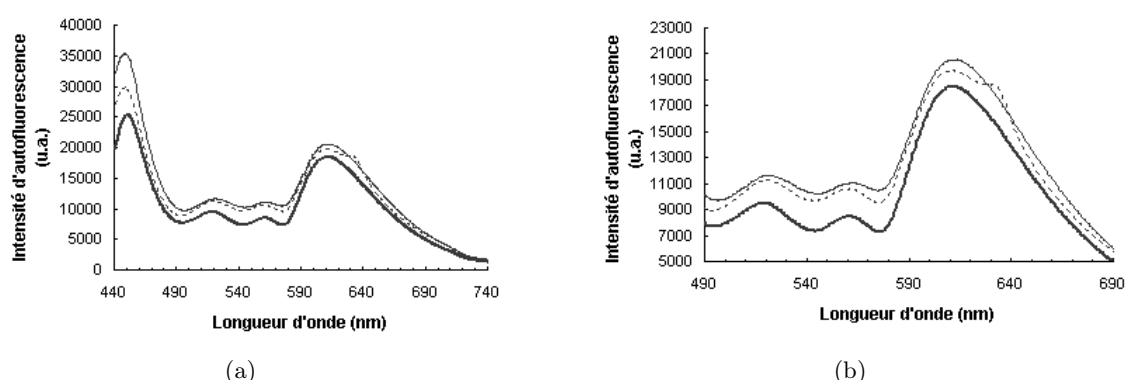


FIG. 5.6 – (a) Exemples de spectres d'auto fluorescence pour des tissus classés sains (trait épais noir), inflammatoires (trait en pointillé) et tumoraux (trait fin noir) pour une distance inter-fibres de 271 μm , (b) Zoom sur la bande de longueurs d'onde : 490 - 690 nm.

Sur les figures 5.6, nous observons deux maxima secondaires, un maxima primaire et les vallées montrent l'absorption de l'hémoglobine. Ceci peut être dû au fait que le NaDH augmente, ce qui masque l'influence du collagène.

Nous remarquons également une variation de l'amplitude du spectre d'intensité d'auto fluorescence en fonction du type de tissu considéré. Contrairement à ce qui est observé en clinique humaine, les tissus classés tumoraux possèdent globalement un niveau d'intensité d'auto fluorescence plus élevé que les tissus classés sains. Ceci peut être dû à la nature du modèle biologique utilisé et/ou à la procédure expérimentale. Dans notre laboratoire, des travaux antérieurs réalisés sur le même modèle animal de tumeur de vessie de rat ont montré des résultats similaires [Padilla Ybarra, 1999].

Les figures 5.7 présentent l'auto fluorescence mesurée *in vivo* sur une muqueuse de vessie humaine saine, inflammatoire et tumorale, avec deux longueurs d'onde d'excitation différentes (337 et 480 nm) [Anidjar *et al.*, 1998]. Contrairement à ce que nous obtenons avec le modèle animal, les tissus tumoraux possèdent un niveau d'intensité d'auto fluorescence plus faible que les tissus inflammatoires, ayant eux-mêmes un niveau d'intensité d'auto fluorescence plus faible que les tissus sains. Par ailleurs, les signaux d'auto fluorescence sont plus faibles avec la longueur d'onde d'excitation à 480 nm. Enfin, nous ne constatons pas de décroissance de fluorescence attribuée à l'absorption par l'hémoglobine dans la gamme 525 - 575 nm. Une hypothèse peut alors être avancée : en clinique humaine, les tests sont réalisés à l'intérieur même de la vessie ; dans notre protocole, la vessie est ouverte et il se peut qu'une infime couche d'hémoglobine soit présente,

d'où les creux obtenus à 540 et 575 nm. Cette hypothèse pourra peut-être être validée avec les spectres de fluorescence intrinsèque calculés.

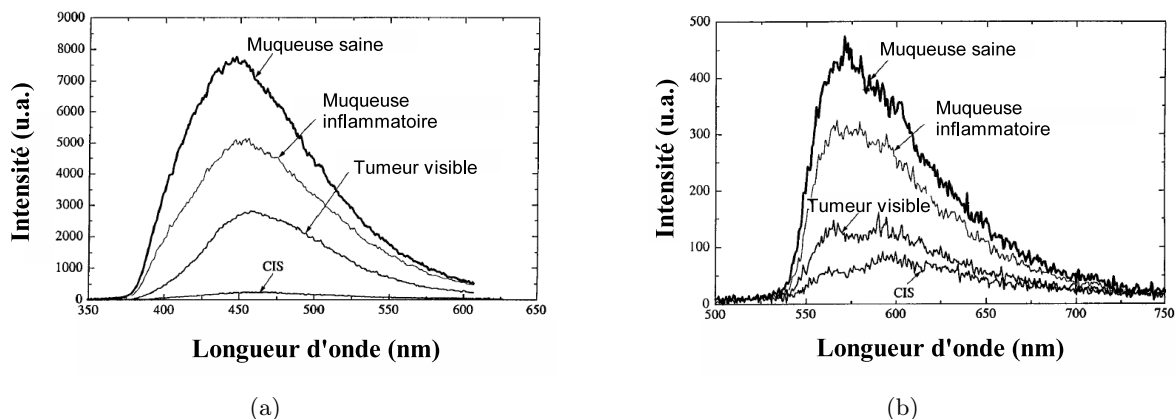


FIG. 5.7 – Autofluorescence mesurée *in vivo* sur une muqueuse de vessie humaine saine, inflammatoire et tumorale (modifié de [Anidjar *et al.*, 1998]) (a) avec une longueur d'onde d'excitation à 337 nm, (b) avec une longueur d'onde d'excitation à 480 nm.

Un test de Student-Fisher pour des échantillons non appariés réalisé sur l'aire totale sous la courbe entre 430 et 750 nm donne des différences significatives entre tissus sains et tissus tumoraux, entre tissus sains et tumeurs sub-épithéliales, enfin entre tissus inflammatoires et tissus tumoraux. En revanche, les paramètres calculés ne permettent pas de discriminer de façon significative les tissus sains des tissus inflammatoires et les tissus inflammatoires des tissus tumoraux ($p < 0,05$: TAB. 5.1).

TAB. 5.1 – Test T de Student-Fisher effectué sur les données d'aire totale sous la courbe des spectres d'auto-fluorescence entre 440 et 740 nm (seuil de risque 0,05). DS : différence significative, NS : différence non significative.

	T_{calc}	T	
Tissus sains vs inflammatoires (n=81)	1,7	2	NS
Tissus sains vs tumoraux (n=89)	2,6	2	DS
Tissus inflammatoires vs tumoraux (n=28)	0,2	2,1	NS
Tissus sains vs tumeurs sub-épithéliales (n=82)	2,5	2	DS

Lorsque nous observons plus précisément les courbes 5.6(a), nous remarquons une décroissance de fluorescence attribuée à l'absorption par l'hémoglobine dans la gamme 525 - 575 nm.

Lorsque nous observons les creux à 540 et 575 nm qui correspondent aux pics d'absorption de l'oxyhémoglobine HbO_2 , nous remarquons que les bosses entre 490 nm et 590 nm présentent une amplitude systématiquement plus faible pour les spectres des tissus tumoraux (Fig. 5.6(b)). Ce résultat peut également être dû à la nature du modèle de tumeur utilisé et à l'épaisseur de la paroi vésicale. L'épaisseur normale de la vessie dans les conditions de l'expérimentation (après remplissage avec de l'eau physiologique) mesure de 100 à 300 μm . En cas de tumeur de 2 semaines, l'épaisseur est d'environ 500 à 800 μm . En effet, une grande partie de la lumière est transmise par

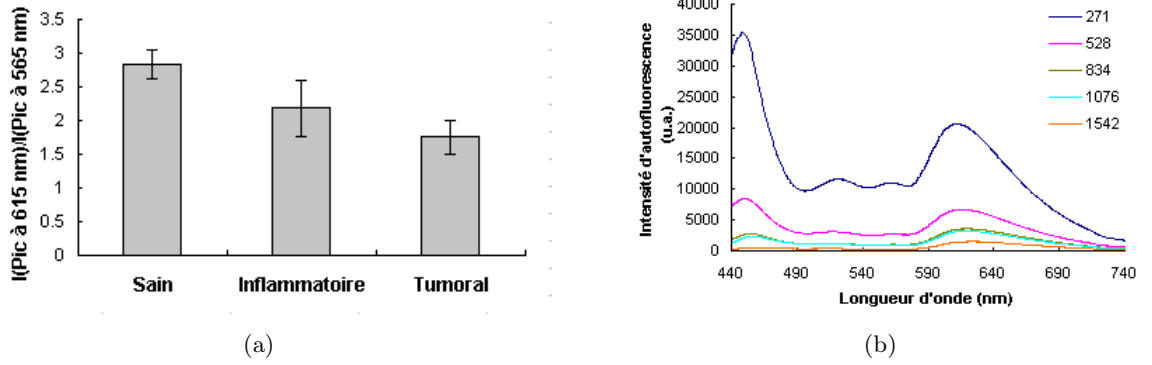


FIG. 5.8 – (a) Histogrammes représentant le rapport des pics d'intensité d'auto fluorescence à 615 et 565 nm $R_{I_{615}/I_{565}}$ pour la fibre d'acquisition la plus proche de la fibre d'illumination (271 μm , $p < 0,05$), (b) Exemple de spectres d'auto fluorescence d'un tissu tumoral pour cinq distances (μm) entre les fibres d'illumination et d'acquisition.

la vessie saine ; l'émission de fluorescence captée n'est due qu'à la faible proportion de lumière absorbée. En revanche, la tumeur transmet peu de lumière parce qu'elle est plus épaisse et la quantité de lumière absorbée est exploitée essentiellement pour générer l'émission de fluorescence.

Pour vérifier statistiquement l'observation selon laquelle l'amplitude des bosses entre 490 et 590 nm est plus faible pour les spectres des tissus tumoraux, nous calculons le rapport entre les intensités d'auto fluorescence à 615 et 520 nm $R_{I_{615}/I_{520}}$ et le rapport entre les intensités d'auto fluorescence à 615 et 565 nm $R_{I_{615}/I_{565}}$. De fait, des différences significatives sont notées entre tissus sains et tissus tumoraux sur les histogrammes représentant ces rapports (Fig. 5.8(a) : $p < 0,05$). La figure 5.8(b) représente un exemple de spectres d'auto fluorescence corrigés et filtrés d'un tissu classé tumoral pour cinq distances entre les fibres d'illumination et d'acquisition (271, 528, 834, 1076 et 1542 μm). Nous observons par exemple que le niveau d'intensité d'auto fluorescence décroît rapidement avec les plus grandes distances. En se basant sur l'amplitude des spectres et sur les tests statistiques, la plus courte distance semble être la meilleure des cinq distances pour observer des différences significatives entre les tissus, résultat auquel nous pouvons nous attendre compte tenu du profil de diffusion de la lumière dans la vessie.

5.3.3.2 Réflectance Diffuse

La figure 5.9(a) représente un exemple de spectres de réflectance diffuse pour des tissus classés sains, inflammatoires et tumoraux acquis avec la fibre la plus proche de la fibre d'excitation (distance : 271 μm). La figure 5.9(b) représente un exemple de spectres de réflectance diffuse d'un tissu classé tumoral pour cinq distances entre les fibres d'illumination et d'acquisition (271, 528, 834, 1076 et 1542 μm). Ces spectres ont été filtrés, avec un filtre polynômiale (Savitzky-Golay) d'abord globalement (entre 440 et 800 nm, degré du polynôme d'interpolation choisi : 15) pour réduire le bruit puis localement entre 650 et 660 nm pour éliminer le pic de la source d'excitation (degré du polynôme d'interpolation choisi : 25). Les parasites entre 760 et 800 nm proviennent du spectromètre.

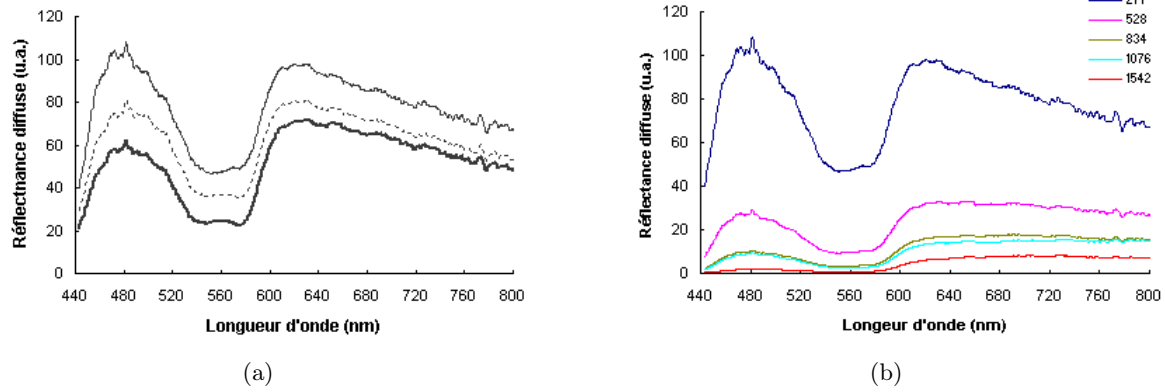


FIG. 5.9 – Exemples de spectres filtrés de réflectance diffuse (a) pour des tissus classés sains (trait épais), inflammatoires (trait en pointillé) et tumoraux (trait fin) pour une distance inter-fibres de 271 μm , (b) pour un tissu classé tumoral pour cinq distances entre les fibres d'illumination et d'acquisition.

Nous observons que l'allure globale des spectres semble identique quel que soit le tissu considéré (Fig. 5.9(a)). L'intensité de réflectance diffuse est globalement plus faible pour le site sain que pour le site inflammatoire, laquelle est plus faible que l'intensité de réflectance diffuse pour le site tumoral. Par ailleurs, nous constatons que les pics d'absorption sont moins prononcés pour les tissus tumoraux que pour les tissus sains.

Sur la figure 5.9(b), un niveau d'intensité de réflectance diffuse plus important peut être observé pour la plus courte distance. La plus courte distance semble donc être la distance optimale pour observer des différences significatives entre les tissus.

A partir de l'observation précise de ces spectres de réflectance diffuse, nous proposons de calculer quelques indices simples qui nous semblent pouvoir fournir des informations utiles à la différenciation des trois classes de tissus (sains, inflammatoires et tumoraux). Il s'agit par exemple des aires partielles sous la courbe entre 440 et 560 nm $A_{440-560}$ et totale entre 440 et 800 nm $A_{440-800}$, du rapport entre la valeur du pic à 480 nm et l'aire sous la courbe $R_{I_{480}}/A_{440-800}$ et enfin, du rapport entre la valeur du pic à 740 nm (creux de l'hémoglobine) et l'aire sous la courbe $R_{I_{740}}/A_{440-800}$. Nous notons des différences significatives entre d'une part les tissus sains et les tissus tumoraux et d'autre part entre les tissus sains et les tissus inflammatoires (tests statistiques de Student-Fisher avec un seuil de risque 0,05). En revanche, les paramètres calculés ne permettent pas de discriminer de façon significative les tissus tumoraux des tissus inflammatoires.

En outre, [Mourant *et al.*, 1995] montrent qu'il existe des pentes caractéristiques sur les spectres de diffusion élastique pour différents tissus dans des bandes spectrales spécifiques.

Nous avons donc également calculé différentes pentes sur les spectres de réflectance diffuse : pente entre 440 et 470 nm, entre 590 et 615 nm et entre 650 et 750 nm.

Les pentes calculées entre 440 et 470 nm et représentées soit par des points, soit par des boîtes à moustaches (Fig. 5.10) semblent être les plus représentatives des tissus considérés. Les boîtes à moustaches permettent de résumer quelques caractéristiques de position des valeurs des pentes (médiane, quartile, minimum et maximum). Nos résultats confirment donc l'existence de pentes caractéristiques sur les spectres de réflectance diffuse dans une bande de longueur d'onde spécifique, entre 440 et 470 nm.

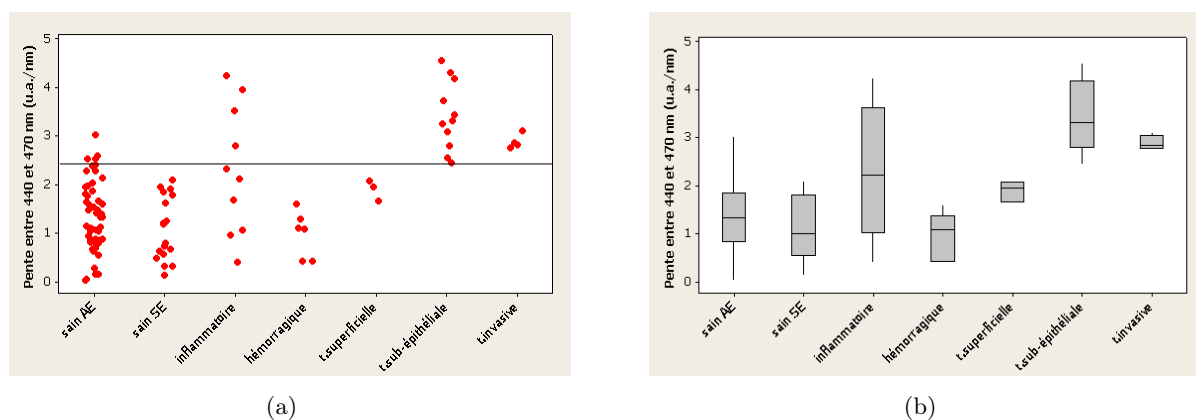


FIG. 5.10 – (a) Valeurs des pentes des spectres mesurés de réflectance diffuse entre 440 et 470 nm, pour tous les sites classés sains, inflammatoires, hémorragiques et tumoraux (distance : 271 μm), (b) Boîtes à moustaches représentant également les pentes.

En effet, nous observons des différences entre les tissus sains et les tissus tumoraux : une valeur de pente en-dessous de 2,5 u.a./nm correspond à un site supposé sain et une valeur de pente supérieure correspond à un site supposé tumoral. Seules trois valeurs de sites supposés tumoraux se situent en-dessous de cette valeur « seuil ». Bien que ces sites aient été classés en « tumeurs superficielles », l'urologue, qui a effectué l'ensemble de la classification histologique, n'a pas pu dire avec précision à quelle classe le site mesuré correspondait. Il subsiste donc un doute quant à ces trois points ; ces trois points vont donc être écartés des analyses qui suivent (calcul des spectres de fluorescence intrinsèque et classification des données). Il a également été très difficile de définir avec précision sur les coupes histologiques le caractère inflammatoire de certains sites. En effet, la majeure partie des sites classés inflammatoires correspondent au groupe de rats dont la mesure a été réalisée trois jours après l'instillation. Ainsi, l'épithélium de la vessie n'a peut-être pas eu le temps de se « cicatriser », d'où la difficulté supplémentaire de l'expertise histologique.

Le tableau 5.2 présente les résultats de tests statistiques T de Student-Fisher effectués sur les valeurs des pentes entre 440 et 470 nm (seuil de risque 0,05).

TAB. 5.2 – Exemple de résultats de tests T de Student-Fisher effectués sur les valeurs des pentes entre 440 et 470 nm (seuil de risque 0,05). DS : différence significative, NS : différence non significative.

	T_{calc}	T	
Tissus sains vs inflammatoires (n=81)	3,7	2	DS
Tissus sains vs tumoraux (n=89)	9,2	2	DS
Tissus inflammatoires vs tumoraux (n=28)	1,8	2,1	NS

Nous notons également des différences significatives entre d'une part les tissus sains et les tissus tumoraux et d'autre part entre les tissus sains et les tissus inflammatoires.

5.3.3.3 Fluorescence intrinsèque

La figure 5.11 représente un exemple de spectres de fluorescence intrinsèque calculés, pour des tissus classés sains, inflammatoires et tumoraux. Ces spectres sont normalisés par rapport au pic maximal du spectre du tissu sain.

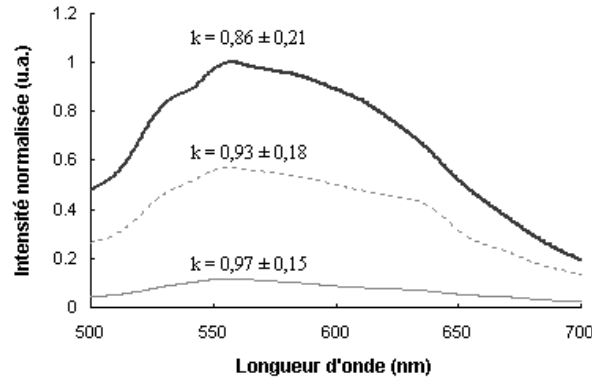


FIG. 5.11 – Exemples de spectres de fluorescence intrinsèque calculés pour des tissus classés sains (trait épais), inflammatoires (trait en pointillé) et tumoraux (trait fin) et valeurs de k optimisées correspondante, pour une distance inter-fibres de $271 \mu\text{m}$.

Après avoir minimisé l'influence de l'absorption du sang, nous observons une différence d'intensité en comparant les spectres de fluorescence intrinsèque (Fig. 5.11) et les spectres d'auto-fluorescence non corrigés (Fig. 5.6). Par ailleurs, les pics sont plus prononcés sur les tissus sains que sur les tissus tumoraux, ceci étant dû à l'influence de l'hémoglobine.

L'intensité lumineuse de fluorescence intrinsèque est plus faible pour les tissus tumoraux que pour les tissus inflammatoires, laquelle est plus faible que pour les tissus sains. Ceci est probablement associée à une moindre concentration des fluorophores et/ou à la présence d'une couche superficielle épaissie, éventuellement plus absorbante. Les spectres de fluorescence intrinsèque de notre modèle sont donc mieux corrélés, que les spectres d'auto fluorescence de la vessie humaine (Fig. 5.7). Les résultats sont donc conformes aux mesures *in vivo* sur les patients.

Nous avons ensuite calculé et comparé différents paramètres par des tests statistiques : valeur du coefficient k , valeur maximale des pics (longueur d'onde et amplitude) et aire sous la courbe entre 500 et 700 nm. Comme noté précédemment, nous obtenons des différences significatives entre tissus sains et tissus tumoraux, entre tissus inflammatoires et tissus tumoraux, enfin entre tissus sains et tissus inflammatoires (TAB. 5.3).

TAB. 5.3 – Test T de Student-Fisher effectué sur les données d’aire totale sous la courbe des spectres de fluorescence intrinsèque entre 500 et 700 nm (seuil de risque 0,05). DS : différence significative.

	T_{calc}	T	
Tissus sains vs inflammatoires (n=81)	2,1	2	DS
Tissus sains vs tumoraux (n=89)	3,2	2	DS
Tissus inflammatoires vs tumoraux (n=28)	2,4	2,1	DS

Le tableau 5.4 présente les valeurs de k optimisées pour les tissus classés sains, inflammatoires et tumoraux pour deux distances inter-fibres (271 et 528 μm).

TAB. 5.4 – Valeurs de k optimisées pour deux distances inter-fibres.

k	271 μm	528 μm
Tissus classés sains	$0,86 \pm 0,21$	$0,66 \pm 0,17$
Tissus classés inflammatoires	$0,93 \pm 0,18$	$0,90 \pm 0,11$
Tissus classés tumoraux	$0,97 \pm 0,15$	$0,96 \pm 0,09$

Pour la distance inter-fibres de 271 μm , les valeurs de k sont de 0,86 pour les tissus classés sains et de 0,97 pour les tissus tumoraux. Tout se passe comme si les photons de fluorescence, dans un tissu tumoral, parcouraient un chemin relativement plus long, ce qui est cohérent avec un épaississement de la paroi. La même remarque peut être faite pour la distance inter-fibres de 528 μm .

5.3.4 Choix des variables explicatives pour la classification des données

Nous avons testé les résultats de la classification sur la base de deux ensembles différents de variables explicatives et ce, pour 71 sites classés sains, 10 sites classés inflammatoires et 18 sites classés tumoraux, lors de l’expertise histologique.

La première option regroupe toutes les valeurs caractéristiques calculées à partir des spectres (soit 15 paramètres) :

- d’auto fluorescence : $A_{440-740}$, pics à 520 et à 615 nm, $R_{I_{615}/I_{520}}$, $R_{I_{615}/I_{565}}$,
- de réflectance diffuse : $A_{440-800}$, $A_{440-560}$, pics à 480, 556 et 738 nm, $R_{I_{738}/I_{480}}$, $R_{I_{556}/I_{480}}$, pentes entre 440 et 470 nm,
- de fluorescence intrinsèque : k , $A_{500-700}$.

La seconde option se compose uniquement de certains de ces paramètres considérés comme les plus « discriminants » lors des tests statistiques réalisés - soit 5 paramètres - (Fig. 5.12) :

- en auto fluorescence : $A_{440-740}$ et $R_{I_{615}/I_{565}}$,
- en réflectance diffuse : pentes entre 440 et 470 nm, $A_{440-560}$,
- en fluorescence intrinsèque : $A_{500-700}$.

Sur la figure 5.12, nous choisissons un seuil afin d’obtenir trois groupes distincts (sains, inflammatoires et tumoraux).

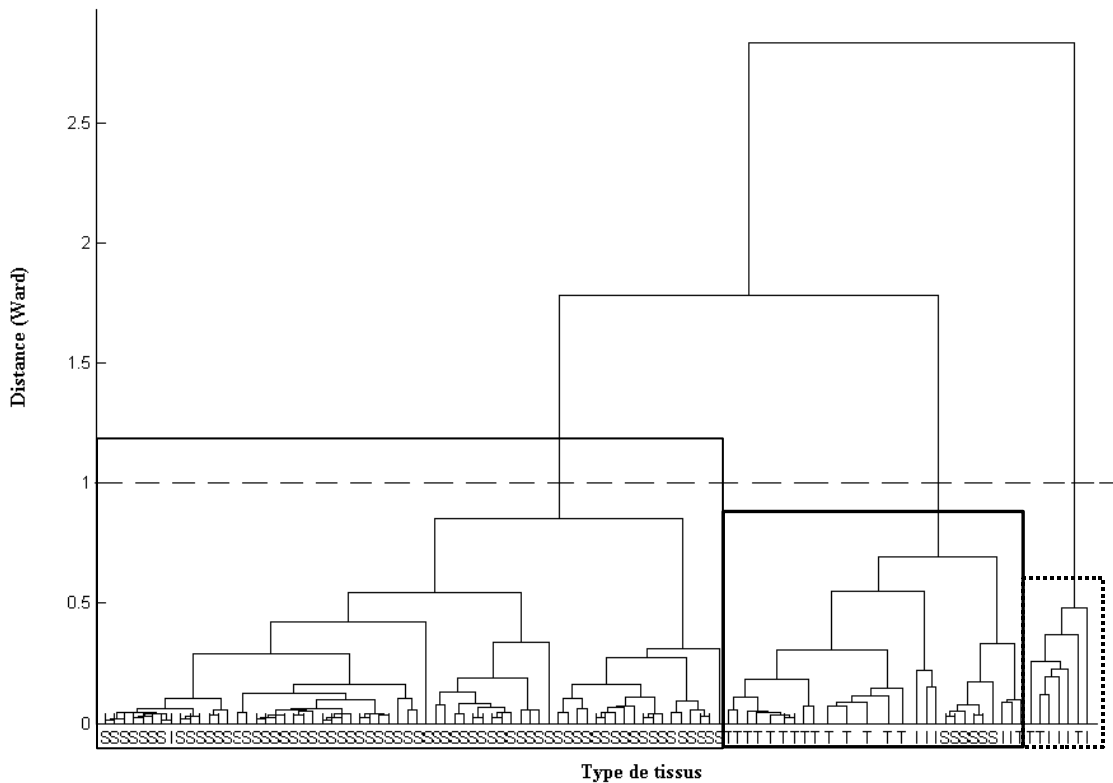


FIG. 5.12 – Exemple de dendrogrammes pour la plus petite distance entre la fibre d’excitation et les fibres d’émission (distance : $271 \mu\text{m}$) avec les valeurs explicatives considérées comme discriminantes. La ligne en pointillé représente le seuil de découpage du dendrogramme choisi et les groupes des tissus sains (ligne fine noire), inflammatoires (pointillé) et tumoraux (ligne épaisse noire).

Nous constatons, comme dans la section 5.3.3.2, que les trois tissus classés tumoraux par histologie (« tumeurs superficielles ») se trouvent dans le groupe des tissus inflammatoires après classification des données.

Par ailleurs, six tissus classés sains après histologie se situent dans le groupe des tissus tumoraux après classification. Après vérification des résultats de la classification histologique, il s’avère que l’histopathologiste avait hésité à classer ces tissus en tissus sains ou en tissus pré-cancéreux. Il subsiste donc un doute quant à ces six échantillons de tissus.

Comparons maintenant les résultats en terme de sensibilité, de spécificité, de valeurs prédictives positives et négatives pour les deux ensembles de variables explicatives choisis à partir des dendrogrammes réalisés.

A partir de ces données, la sensibilité (Se), la spécificité (Sp), les valeurs prédictives positive (V_{pp}) et négative (V_{pn}) sont calculées telles que (section 1.1.2.3) :

$$\left\{ \begin{array}{l} Se = \frac{\text{Nombre de sites pathologiques détectés (bien classés) par spectroscopie}}{\text{Nombre total de sites pathologiques établi par histologie}} \\ Sp = \frac{\text{Nombre de sites sains détectés par spectroscopie}}{\text{Nombre total de sites sains établi par histologie}} \\ V_{pp} = \frac{\text{Nombre de sites pathologiques détectés (bien classés) par spectroscopie}}{\text{Nombre de sites pathologiques bien classés et de sites sains mal classés par spectroscopie}} \\ V_{pn} = \frac{\text{Nombre de sites sains détectés par spectroscopie}}{\text{Nombre de sites sains bien classés et de sites pathologiques mal classés par spectroscopie}} \end{array} \right. \quad (5.9)$$

Les tableaux 5.5 et 5.6 exposent les valeurs des sensibilités, des spécificités et les valeurs prédictives positive et négative obtenues pour deux distances inter-fibre en considérant :

- uniquement les paramètres de réflectance diffuse,
- uniquement les paramètres d'autofluorescence,
- les paramètres combinés de réflectance diffuse, les paramètres d'autofluorescence et les paramètres de la fluorescence intrinsèque avec les deux ensembles de valeurs explicatives,
- tous les paramètres calculés en réflectance diffuse, autofluorescence et fluorescence intrinsèque et en utilisant l'analyse en composantes principales (ACP).

TAB. 5.5 – Valeurs de la sensibilité et de la spécificité calculées à partir de la classification des données.

	Se (%)	Sp (%)	Se (%)	Sp (%)
Distance inter-fibres	271 μm		528 μm	
Paramètres de réflectance diffuse	67	89	61	86
Paramètres d'autofluorescence	72	89	67	86
Tous paramètres confondus : Première option	78	90	72	87
Tous paramètres confondus : Deuxième option	83	91	78	89
ACP (3 ^{eres} composantes)	89	93	83	90

En combinant l'autofluorescence, la réflectance diffuse et la fluorescence intrinsèque, nous observons une amélioration de la spécificité et surtout de la sensibilité de la méthode. Nous constatons également que si nous prenons les valeurs explicatives choisies à partir des tests statistiques réalisés, les valeurs de la spécificité et de la sensibilité augmentent, valeurs elles-mêmes augmentées lorsque nous utilisons l'analyse en composantes principales.

Nous avons des valeurs prédictives positives inférieures à 80% à cause des trop nombreux sites sains mal classés et des valeurs prédictives négatives supérieures à 95% du fait que la plupart des sites tumoraux sont bien classés. Ceci est dû en partie à la difficulté pour l'histopathologiste de classer certains tissus en tissus sains, inflammatoires ou tumoraux.

TAB. 5.6 – Valeurs prédictives positive et négative calculées à partir de la classification des données.

	V_{pp} (%)	V_{pn} (%)	V_{pp} (%)	V_{pn} (%)
Distance inter-fibres	271 μm		528 μm	
Paramètres de réflectance diffuse	60	91	52	90
Paramètres d'autofluorescence	62	93	54	91
Tous paramètres confondus : Première option	67	94	59	92
Tous paramètres confondus : Deuxième option	71	96	64	94
ACP (3 ^{eres} composantes)	76	97	68	95

D'autres équipes de recherche ont testé les techniques de spectroscopie de réflectance diffuse ou d'autofluorescence sur la vessie humaine (section 1.3.5).

En diffusion élastique, [Mourant *et al.*, 1995] annoncent une sensibilité de 100% et une spécificité de 96% pour la détection de carcinomes de vessie humaine, en analysant les pentes des spectres de réflectance diffuse entre 330 et 370 nm (mesures effectuées sur 10 patients).

Après avoir analysé 26 spectres de vessie humaine, [Koenig *et al.*, 1998a] obtiennent une sensibilité de 91% et une spécificité de 60% en réflectance diffuse (400 - 700 nm). [Koenig *et al.*, 1998b] valident l'utilisation de la spectroscopie d'autofluorescence pour la détection de tumeurs de vessie humaine (excitation à 337 nm). Après calcul du rapport d'intensité $R_{I_{385}/I_{455}}$, ils trouvent une sensibilité de 97% et une spécificité de 98% (75 patients).

Ces résultats de sensibilité et de spécificité, puisque calculés sur un modèle de tumeur de vessie humaine, sont à prendre à titre indicatif. Nous pouvons en conclure qu'en combinant les spectroscopies d'autofluorescence (excitation à 410 nm) et de réflectance diffuse (440 - 800 nm), nous obtenons une sensibilité identique et une spécificité meilleure que celles obtenues par [Koenig *et al.*, 1998a].

Il serait sans doute intéressant de poursuivre ces travaux d'une part, en choisissant automatiquement le seuil de découpage du dendogramme (calcul des coefficients de corrélation cophénétique et d'inconsistance) [Morgenthaler, 2001] et d'autre part, en construisant un algorithme de classification « itératif », qui permettrait un choix optimal (sélection automatique) des valeurs explicatives les plus discriminantes (analyse en composantes principales sur tous les paramètres caractéristiques des spectres).

5.4 Conclusion et Perspectives

Les résultats obtenus montrent que les variations des intensités spectrales de réflectance diffuse sont corrélées avec les modifications structurelles. Quant aux spectres d'autofluorescence, ils sont corrélés avec les changements anatomo-histopathologiques. Une différence significative est démontrée en réflectance diffuse et/ou en autofluorescence et/ou en fluorescence intrinsèque entre tissus sains et tissus inflammatoires, entre tissus sains et tissus tumoraux enfin, entre tissus inflammatoires et tissus tumoraux. Les résultats de la classification non supervisée réalisée montrent que la combinaison de différentes approches spectroscopiques augmente la fiabilité du diagnostic.

Nous pouvons donc conclure que la détection des lésions inflammatoires et cancéreuses dans la vessie est plus efficace en combinant plusieurs spectroscopies, puisque la fiabilité du diagnostic est accrue.

Par ailleurs, si le modèle de tumeur de vessie de rat utilisé dans cette étude produit efficacement et rapidement des tumeurs multiples, il ne dépend pas complètement de la période d'incubation entre l'instillation des cellules tumorales et les mesures spectroscopiques. Plus encore, il ne permet pas une localisation précise des tumeurs. Il serait donc intéressant de poursuivre ces travaux par une étude expérimentale spectroscopique d'une part, sur un modèle animal avec une instillation tumorale permettant une maîtrise de la localisation (conditionnement global de la vessie et instillation focale des cellules tumorales), modèle existant aujourd'hui au Centre Alexis Vautrin. D'autre part, il s'agirait de travailler sur un modèle animal permettant une croissance plus « progressive » des tumeurs (tumeurs pré-cancéreuses et cancéreuses précoces).

Enfin, il serait aussi particulièrement judicieux de regarder l'influence des distances de la sonde à fibres optiques, de tester plusieurs méthodes de classification et de développer un algorithme automatique de classification non supervisée, consistant à initialiser l'ensemble des points en classes sous-optimales et à éliminer les points aberrants. Cet algorithme pourrait être optimisé en fusionnant les classes proches, en réalisant une analyse discriminante et en éliminant les points aberrants une fois l'optimisation réalisée.

Conclusion générale et Perspectives

Les méthodes de spectroscopie tissulaire se sont largement développées depuis une vingtaine d'années. Plusieurs équipes de recherche ont montré leur efficacité dans la détection de modifications pathologiques des tissus biologiques : ces méthodes peuvent ainsi constituer, pour les cliniciens, un outil complémentaire lors du diagnostic *in vivo*. Depuis moins de 10 ans, quelques travaux se sont orientés vers des approches spectroscopiques multi-modalités combinant différents principes photophysiques (autofluorescence, diffusion simple et multiple) dans l'objectif d'obtenir des informations plus précises en raison de leur complémentarité et de leur colocalisation spatiale.

L'analyse des données bibliographiques exposées dans le premier chapitre du mémoire, associée à la prise en compte des moyens disponibles et des résultats des travaux précédemment obtenus au laboratoire, nous ont permis de définir le cadre applicatif de nos travaux, la problématique scientifique de notre étude et ses objectifs opérationnels liés à l'instrumentation, à la modélisation des interactions lumière-tissus, à la validation et à l'analyse des données expérimentales.

Une première étude expérimentale a été conduite en début de thèse sur des échantillons annulaires d'artères fraîches et cryoconservées *ex vivo* à l'aide des outils alors disponibles au laboratoire, à savoir un spectrofluorimètre et une maquette de diffusion élastique (chapitre 4). Le recueil de données expérimentales sur des tissus biologiques de structure déformable avait un double objectif. D'une part, il s'agissait de rechercher des corrélations éventuelles de leurs comportements rhéologiques avec des variations d'amplitude et/ou d'allure spectrales des intensités de lumière rétro-diffusée. D'autre part, il s'agissait de caractériser les instruments existant en condition de mesures pour définir les principaux éléments du cahier des charges du système à développer. Les mesures mécaniques confirment qu'il existe une différence statistiquement significative entre les propriétés mécaniques des anneaux testés avant et après cryoconservation. En diffusion élastique, nos résultats montrent que plus la déformation augmente, plus la réflectance diminue globalement. Les résultats spectraux obtenus sont corrélés aussi bien avec les changements histologiques qu'avec les propriétés mécaniques des artères : les variations spectrales évoluent en fonction de la déformation. Le calcul de différents ratios de surfaces sous les courbes de réflectance diffuse montre que ces paramètres varient en fonction de la déformation appliquée aux échantillons et donc en lien avec la réorganisation dynamique des éléments constitutifs de la paroi artérielle. En autofluorescence, après normalisation des spectres, le calcul de plusieurs rapports d'intensité à des longueurs d'onde particulières permet, au contraire, de discriminer de façon significative les tissus frais des tissus issus de cryoconservation, confirmant ainsi la complémentarité des deux modalités de mesure.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication en revue internationale, 3 communications en congrès internationaux (dont 1 présentation orale) et 2 communications en congrès nationaux à comité de lecture. Un second article en revue internationale est en soumission.

À partir de la mise en œuvre et de l'évaluation expérimentale des deux systèmes instrumentaux disponibles (spectrofluorimètre et maquette de diffusion élastique), nous avons défini les caractéristiques métrologiques et techniques d'une instrumentation unique de spectroscopie bimodale adaptée à l'étude finale *in vivo* prévue. Après avoir envisagé et testé différentes solutions technologiques, le système finalement mis en place se compose principalement : d'une sonde de 37 fibres optiques, de deux sources CW de lumière large-bande (400 - 800 nm) et « monochromatique » (410 nm) et d'un spectrographe imageant configuré pour l'acquisition simultanée de 13 spectres à différentes distances sur le tissu (résolution spatiale). Les points forts de notre système résident dans la modularité des combinaisons géométriques entre les fibres d'excitation/réception (distances, positions) et dans l'acquisition simultanée des spectres (chapitre 2).

Compte tenu de la complexité structurelle des tissus biologiques (milieux turbides, anisotropes, multicouches) et des contraintes géométriques liées aux mesures (faibles distances entre fibres d'excitation et d'émission), les simulations statistiques de propagation de photons (Monte Carlo) sont les plus couramment utilisées - du fait de leur souplesse de paramétrage - pour caractériser les propriétés optiques des tissus biologiques à l'échelle macroscopique. Nous avons donc développé, à partir des programmes existant dans la littérature, un algorithme de simulation des interactions lumière-tissus, adapté à nos besoins et à notre configuration expérimentale (chapitre 3). Cet algorithme prenait en compte initialement l'absorption et la diffusion multiple. Nous l'avons complété par l'implémentation d'une solution algorithmique originale de simulation de fluorescence multiple tenant compte des spectres complets d'absorption et d'émission de plusieurs fluorophores et de leurs interactions potentielles. Nous avons validé l'ensemble de l'algorithme sur des fantômes en solution, mono et multicouches et sur les données de notre étude *ex vivo*. Les résultats des simulations effectuées pour les anneaux artériels ont permis de caractériser les variations des coefficients optiques en fonction des déformations. Ils montrent aussi l'importance de connaître les véritables paramètres optiques du tissu testé et ce, afin d'obtenir une bonne corrélation avec les résultats expérimentaux.

Ces résultats ont fait l'objet de 3 communications en congrès international (dont 1 présentation orale), 3 communications en congrès national à comité de lecture et 2 présentations orales à l'Institut Élie Cartan. Un article en revue internationale est en soumission.

Après avoir défini les critères de choix d'un modèle tumoral sur l'animal présentant différentes phases de progression de cancer et compte tenu du temps imparti et des moyens disponibles au laboratoire, notre seconde étude expérimentale (chapitre 5) a été conduite sur un modèle préclinique de tumeur orthotopique instillée dans la vessie de rat, modèle décrit dans diverses études et mis en place au Centre Alexis Vautrin. L'analyse des coupes histologiques réalisée par le médecin urologue a permis de fournir une classification en trois catégories principales : tissus sains, inflammatoires et cancéreux. Les spectres d'autofluorescence recueillis montrent la présence de différentes contributions de fluorophores endogènes. En comparant les spectres d'autofluorescence, plusieurs différences apparaissent dont la plus caractéristique est la présence plus marquée des bosses à environ 520 nm et à 560 nm sur les spectres des tissus sains par rapport aux autres types de tissus. Nous observons une nette diminution du pic à 560 nm entre les spectres des tissus sains et tumoraux, correspondant au pic d'absorption d'HbO₂ (effet de l'absorption par HbO₂ augmentée dans le tissu tumoral). Cette tendance est confirmée pour tous les spectres. Les spectres d'autofluorescence montrent des différences significatives entre tissus sains et tissus tumoraux. En revanche, les mesures ne permettent pas de discriminer de façon significative les tissus sains des tissus inflammatoires. Les spectres de réflectance diffuse montrent des différences significatives entre tissus sains et tissus tumoraux et entre tissus sains et tissus inflammatoires

dans certains cas notamment sur la base de longueurs d'onde particulières et de distances particulières entre les fibres d'excitation et d'émission. Les spectres de fluorescence intrinsèque permettent également de discriminer les tissus sains des tissus tumoraux et les tissus inflammatoires des tissus tumoraux. Par ailleurs, les tests statistiques effectués sur les différents paramètres caractéristiques calculés (rapport d'intensité, aires sous la courbe, valeurs d'intensité obtenues pour des longueurs d'onde spécifiques...) en réflectance, autofluorescence globale et fluorescence intrinsèque montrent la complémentarité des deux modalités de mesure. Une classification non supervisée à partir des caractéristiques choisies permet de quantifier les valeurs de la spécificité et de la sensibilité de notre méthode; elle montre également que la combinaison de différentes approches spectroscopiques augmente la fiabilité du diagnostic.

Ces résultats ont fait l'objet d'une présentation orale en congrès international et 1 communication en congrès national. Un article en revue internationale est en préparation.

En ce qui concerne l'*instrumentation*, des travaux sont en cours pour faire évoluer le dispositif existant vers un système programmable-automatique d'excitation multiple d'autofluorescence et de diffusion élastique. Une réflexion est également engagée pour coupler une troisième modalité (spectroscopie Raman) sur la base de travaux expérimentaux également en cours, en collaboration étroite avec le BioMoCeTi.

En ce qui concerne la *simulation*, le principal inconvénient reste le temps de simulation. Pour le réduire, il serait intéressant d'envisager de travailler avec des systèmes de type architecture parallèle ou de poursuivre la recherche d'une modélisation statistique optimisée (en collaboration avec l'Institut Élie Cartan). La caractérisation spatiale des propriétés optiques des tissus biologiques *in vivo* est également un enjeu pour pouvoir disposer de modèles plus fiables utiles au diagnostic. La résolution du problème inverse associée à cette identification expérimentale des coefficients optiques fait actuellement l'objet de travaux de plusieurs équipes de recherche. Il serait donc judicieux de poursuivre nos travaux également dans cette direction.

En ce qui concerne l'*étude vasculaire ex vivo*, il serait pertinent de mesurer l'autofluorescence à des longueurs d'onde inférieures à 390 nm, correspondant au pic d'excitation des protéines, qui sont particulièrement importantes pour l'étude des propriétés mécaniques. Le système actuellement mis en place au laboratoire permet de le faire.

En ce qui concerne l'*étude expérimentale sur les tumeurs de vessie de rats*, il serait intéressant de poursuivre ces travaux par une étude expérimentale spectroscopique sur un modèle animal avec une instillation tumorale permettant une maîtrise plus fine de la localisation (conditionnement global de la vessie et instillation focale des cellules tumorales). Il serait sans doute utile également de travailler sur un modèle animal permettant des tests de détection aux phases les plus précoces de développement du cancer (tumeurs pré-cancéreuses et cancéreuses précoces) et de pouvoir s'orienter ensuite vers des études cliniques. Enfin, il serait intéressant de regarder l'influence des distances de la sonde à fibres optiques.

Comme nous l'avons précisé dans le chapitre 5, le domaine de la classification est très vaste et le nombre de méthodes développées très important. Il serait pertinent de tester plusieurs de ces méthodes sur l'ensemble de nos données pour augmenter encore la sensibilité et la spécificité de la méthode. Il serait également pertinent de développer un algorithme automatique et itératif de classification non supervisée, consistant à initialiser l'ensemble des points en classes sous-optimales et à éliminer les points aberrants.

Bibliographie

- [A’Amar and Bigio, 2006] 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.
- [A’Amar, 1997] O. A’Amar. *Spectroscopie tissulaire in vivo de l’autofluorescence et de la fluorescence induite : instrumentation, analyse et modélisation*. PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, 1997.
- [Abbaci, 2003] M. Abbaci. Méthode de caractérisation de la distribution de photosensibilisants chez les patients traités par Thérapie Photodynamique. Technical report, Université Henry Poincaré, Nancy I, 2003.
- [Adé-Damilano, 2006a] M. Adé-Damilano. *Architecture du rein et les voies excrétrices de l’urine*, chapter 2, pages 5–8. Département de Médecine, Université de Fribourg, 2006.
- [Adé-Damilano, 2006b] M. Adé-Damilano. *Les voies excrétrices de l’urine*, chapter 7, pages 29–34. Département de Médecine, Université de Fribourg, 2006.
- [Alberts *et al.*, 2005] 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.
- [Alexandrakis *et al.*, 2001] G. Alexandrakis, D. Busch, and G. Faris. Determination of the optical properties of two-layer turbid media by use a frequency-domain hybrid Monte Carlo diffusion model. *Applied Optics*, 40(22) :3810–3821, 2001.
- [Amling, 2001] C.L. Amling. Diagnosis and management of superficial bladder cancer. *Current Problems in Cancer*, 25(4) :219–278, 2001.
- [Andersson-Engels and Wilson, 1992] S. Andersson-Engels and B.C. Wilson. *In vivo* fluorescence in clinical oncology : fundamental and practical issues. *Journal of Cell Pharmacology*, 3 :66–79, 1992.
- [Anidjar *et al.*, 1998] M. Anidjar, O. Cussenot, S. Avrillier, D. Etti, P. Teillac, and A. Le Duc. The role of laser-induced autofluorescence spectroscopy in bladder tumor detection : dependance on the excitation wavelength. *Annals New York Academy of Sciences*, pages 130–142, 1998.
- [Anikijenko *et al.*, 2001] P. Anikijenko, L.T. Vo, E.R. Murr, J. Carrasco, W.J. McLaren, Q. Chen, S.G. Thomas, P.M. Delaney, and R.G. King. *In vivo* detection of small subsurface melanomas in athymic mice using noninvasive fiber optic confocal imaging. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(6) :1442–1448, 2001.
- [Attinger, 1968] F.M.L. Attinger. Two-dimensional *in vitro* studies of femoral arterial walls of the dog. *Circulation Research*, 22 :829–840, 1968.
- [Audebert, 2005] A. Audebert. Kyste ovarien endométriosique, 2005.

- [Backman *et al.*, 2000] 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. Badi-zadegan, 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.
- [Badawi, 2000] A.F. Badawi. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in human bladder cancer associated with schistosomiasis. *International Journal of Cancer*, 86(4) :598–600, 2000.
- [Bair III *et al.*, 2002] W.B. Bair III, N. Hart, J. Einspahr, G. Liu, Z. Dong, D. Alberts, and G.T. Bowden. Inhibitory Effects of Sodium Salicylate and Acetylsalicylic Acid on UVB-induced Mouse Skin Carcinogenesis. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 11 :1645–1652, 2002.
- [Barabillat *et al.*, 1999] J. Barabillat, D. Bougeard, G. Buntinx, M. Dealye, P. Dhamelin-court, and F. Fillaux. *Spectrométrie Raman*, volume Dossier P2865. 1999.
- [Barbosa *et al.*, 2002] C.J. Barbosa, F.H. Vaillancourt, L.D. Eltis, M.W. Blades, and R.F.B. Turner. The power distribution advantage of fiber-optic coupled ultraviolet resonance Raman spectroscopy for bioanalytical and biomedical applications. *Journal of Raman Spectroscopy*, 33 :503–510, 2002.
- [Berger, 2006] F. Berger. Tumeurs épithéliales malpighiennes, 2006.
- [Beuthan *et al.*, 1998] J. Beuthan, O. Minet, and G. Müller. Optical Biopsy of Cytokeratin and NADH in the Tumor Border Zone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 838 :150–170, 1998.
- [Bevilacqua and Depeursinge, 1999] F. Bevilacqua and C. Depeursinge. Monte Carlo study of diffuse reflectance at source detector separations close to one transport mean free path. *Journal of the Optical Society of America. Part A, Optics and Image Science*, 16(12) :2935–2945, 1999.
- [Bia *et al.*, 2006] D. Bia, F. Pessana, R. Armentano, H. Perez, S. Graf, Y. Zocalo, M. Saldyas N. Perez, O. Alvarez, W. Silva, D. Machin, P. Sueta, S. Ferrin, M. Acosta, and I. Alvarez. Cryo-preservation procedure does not modify human carotid homografts mechanical properties : an isobaric and dynamic analysis. *Cell and Tissue Banking*, 7 :183–194, 2006.
- [Bigio and Mourant, 1997] 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.
- [Bigio *et al.*, 2000] I.J. Bigio, S.G. Bown, G. Briggs, C. Kelley, S. Lakhani, D. Pickard, P.M. Ripley, and I.G. Rose. Diagnosis of breast cancer using elastic-scattering spectroscopy : preliminary clinical results. *Journal of Biomedical Optics*, 5(2) :221–228, 2000.
- [Blondel *et al.*, 2000] 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.
- [Blondel *et al.*, 2001] W.C.P.M. Blondel, J. Didelon, G. Maurice, X. Wang, and J.F. Stoltz. Investigation of 3-D mechanical properties of blood vessels using a new *in vitro* tests system : results on sheep common carotid arteries. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 48(4) :442–451, 2001.
- [Boas *et al.*, 2002] D.A. Boas, J.P. Culver, J.J. Scott, and A.K. Dunn. Three dimensional Monte Carlo code for photon migration through complex heterogeneous media including the adult human head. *Optics Express*, 10(3) :159–170, 2002.

-
- [Bobin *et al.*, 1998] J.Y. Bobin, M. Clavel, and J.P. Gérard. *Dépistage, chapitre rédigé par C. Lasset*, chapter 6. Collège de cancérologie de l'université de Lyon I, 1998.
- [Bohorfoush, 2000] A.G. Bohorfoush. New diagnostic methods for esophageal carcinoma. *Recent Results in Cancer Research*, 155 :55–62, 2000.
- [Bohren and Huffman, 2004] C.F. Bohren and D.R. Huffman. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. Wiley-Vch, 2004.
- [Bourg-Heckly *et al.*, 2000] G. Bourg-Heckly, J. Blais, J.J. Padilla, O. Bourdon, J. Etienne, and F. Guillemin. Endoscopic UV-induced autofluorescence spectroscopy of the oesophagus : tissue characterization and potential for early cancer diagnosis. *Endoscopy*, 32(10) :756–765, 2000.
- [Breslin *et al.*, 2004] 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.
- [Brewer *et al.*, 2001] 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.
- [Brizemur, 2006] P. Brizemur. La lumière et les ombres. <http://physique.paris.iufm.fr/lumiere/>, 2006. IUFM de Paris - Collège de Sciences Physique.
- [Bruhat, 1992] G. Bruhat. *Cours de physique générale*. Masson, 6^{ème} édition, 1992.
- [Brun, 2005] G. Brun. *Phénomènes de diffusion de la lumière*, chapter Photoniques numéro 18, pages 47–52. 2005.
- [Canpolat and Mourant, 2000a] M. Canpolat and J. Mourant. High-angle scattering events strongly affect light collection in clinically relevant measurements geometries for light transport through tissue. *Physics in Medicine and Biology*, 45(5) :1127–1140, 2000.
- [Canpolat and Mourant, 2000b] M. Canpolat and J.R. Mourant. Monitoring Photosensitizer Concentration by use of a Fiber-Optic Probe with a Small Source Detector Separation. *Applied Optics*, 39(34) :6508–6514, 2000.
- [Carew *et al.*, 1968] T.E. Carew, R.N. Vaishnav, and D.J. Patel. Compressibility of the arterial wall. *Circulation Research*, 23(1) :61–68, 1968.
- [Caspers *et al.*, 1998] P. Caspers, G. Lucassen, R. Wolthuis, H. Bruining, and G. Puppels. *In vitro* and *in vivo* Raman spectroscopy of human skin. *Biospectroscopy*, 4(5 Suppl) :S31–S39, 1998.
- [Chalau *et al.*, 2002] V. Chalau, J. Didelon, J.P. Istomin, M.P. Samtsov, E.S. Voropay, and F. Guillemin. Spatially Resolved Elastic Scattering Spectroscopy for Cancer Diagnostic. In IFMBE proceedings, editor, *Proc. Of the 2nd European Medical and Biological Engineering Conference EMBEC'02*, volume 3, pages 867–868, Vienna, 2002.
- [Chalau, 2004] V. Chalau. *Spectroscopie in vivo de diffusion élastique résolue dans l'espace en combinaison avec la spectroscopie de fluorescence : applications en cancérologie*. PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, 2004.
- [Chang *et al.*, 2002] S. Chang, M. Follen, M. Malpica, U. Utzinger, G. Staerckel, D. Cox, E. Atkinson, C. Macaulay, and R. Richards-Kortum. Optimal Excitation Wavelengths for Discrimination of Cervical Neoplasia. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 49(10) :1102–1111, 2002.
- [Chang *et al.*, 2004] 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.
- [Chang *et al.*, 2005] 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.
- [Cheng *et al.*, 1999] L. Cheng, J.C. Cheville, R.M. Neumann, B.C. Leibovich, K.S. Egan, B.E. Spotts, and D.G. Bostwick. Survival of patients with carcinoma *in situ* of the urinary bladder. *Cancer*, 85(2469-2474) :11, 1999.
- [Cheong *et al.*, 1990] W.F. Cheong, S.A. Prahl, and A.J. Welch. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 26(12) :2166–2185, 1990.
- [Choserot *et al.*, 2005] 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(3) :235–242, 2005.
- [Churmakov *et al.*, 2003] 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.
- [Cilesiz and Welch, 1994] 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.
- [Conrard and Goebel, 2003] F. Conrard and J.C. Goebel. Développement d’un spectrofluorimètre portable destiné à la clinique. Technical report, Université Henry Poincaré, Nancy I, 2003.
- [Conroy, 2006a] T. Conroy. Les facteurs de la cancérogénèse. Cours de Cancérologie, DCEM 2, 2006.
- [Conroy, 2006b] T. Conroy. Les mécanismes principaux de la cancérogénèse. Cours de Cancérologie, DCEM 2, 2006.
- [Contini *et al.*, 1997] D. Contini, F. Martelli, and G. Zaccanti. Photon migration through a turbid slab described by a model based on diffusion approximation. i. Theory. *Applied Optics*, 36 :4587–4599, 1997.
- [Cortat, 2004] F. Cortat. The Kubelka-Munk theory, applications and modifications, 2004.
- [Cox, 1975] R.H. Cox. Anisotropic properties of the canine carotid artery *in vitro*. *Journal of Biomechanics*, 8 :293–300, 1975.
- [Cox, 1983] R.H. Cox. Comparison of arterial wall mechanics using ring and cylindrical segments. *American Journal of Physiology*, 244 :H298–H303, 1983.
- [Crow *et al.*, 2003] P. Crow, N. Stone, C.A. Kendall, J.S. Uff, J.A. Farmer, H. Barr, and M.P. Wright. The use of Raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma *in vitro*. *British Journal of Cancer*, 89(1) :106–108, 2003.
- [DaCosta *et al.*, 2002] R.S. DaCosta, B.C. Wilson, and N.E. Marcon. New optical technologies for earlier endoscopic diagnosis of premalignant gastrointestinal lesions. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17(Suppl) :S85–104, 2002.
- [Dam *et al.*, 1998] J. Dam, P. Andersen, T. Dalgaard, and P. Fabricius. Determination of tissue optical properties from diffuse reflectance profiles by multivariate calibration. *Applied Optics*, 37(4) :772–778, 1998.

-
- [Dam *et al.*, 2000] J. Dam, T. Dalgaard, P. Fabricius, and S. Andersson-Engels. Multiple polynomial regression method for determination of biomedical optical properties from integrating sphere measurements. *Applied Optics*, 39(7) :1202–1209, 2000.
- [Dam *et al.*, 2001] J. Dam, C. Pedersen, T. Dalgaard, P. Fabricius, P. Aruna, and S. Andersson-Engel. Fiber-optic probe for noninvasive real-time determination of tissue optical properties at multiple wavelengths. *Applied Optics*, 40(7) :1155–1164, 2001.
- [Davidson *et al.*, 2004] T. Davidson, T. Kluz, F. Burns, T. Rossman, Q. Zhang, A. Uddin, A. Nadas, and M. Costa. Exposure to chromium (VI) in the drinking water increases susceptibility to UV-induced skin tumors in hairless mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196(3) :431–437, 2004.
- [Davin, 2004] J.L. Davin. Classification TNM 2002 des tumeurs génito-urinaires : Principes et Nouveautés. *Progrès en Urologie*, 14 :879–880, 2004.
- [De Gruijl *et al.*, 1983] F.R. De Gruijl, J.B. Van der Meer, and J.C. Van der Leun. Dose-time dependency of tumour formation by chronic UV exposure. *Photochemistry and Photobiology*, 37 :53–62, 1983.
- [de la Taille, 2001] A. de la Taille. *Cancer de la vessie*. Service d’Urologie, CHU Henri Mondor, Paris, 2001.
- [De Veld *et al.*, 2005] D.C.G. De Veld, M.J.H. Witjes, H.J.C.M. Sterenberg, and J.L.N. Roordenburg. The status of *in vivo* autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology : Review. *Oral Oncology*, 41(2) :117–31, 2005.
- [De Veld, 2005] D.C.G. De Veld. *Autofluorescence spectroscopy for the classification of oral lesions*. PhD thesis, University of Groningen, 2005.
- [Delahaye and Durand de Gevigney, 1999] F. Delahaye and G. Durand de Gevigney. *Valeur diagnostique d’un test*. Université de Lyon I, 1999. Polycopiés Santé.
- [Demiray, 1981] H. Demiray. Large deformation analysis of some soft biological tissues. *Journal of Biomechanical Engineering*, 103 :73–78, 1981.
- [D’Hallewin *et al.*, 2002] M. D’Hallewin, L. Bezdetnaya, and F. Guillemin. Fluorescence detection of bladder cancer : a review. *European Urology Editor*, 42 :417–425, 2002.
- [D’Hallewin *et al.*, 2005] M.A. D’Hallewin, S. El Khatib, A. Leroux, L. Bezdetnaya, and F. Guillemin. Endoscopic confocal fluorescence microscopy of normal and tumor bearing rat bladder. *Journal of Urology*, 174 :736–740, 2005.
- [DiagnoCure inc., 2006] DiagnoCure inc. Immunocyt/uCyt+. [http ://www.diagnocure.com/fr/produits-projets/cancer-vessie/immunocyt-ucyt+.php](http://www.diagnocure.com/fr/produits-projets/cancer-vessie/immunocyt-ucyt+.php), 2006.
- [Diamond *et al.*, 2003] K.R. Diamond, T.J. Farrell, and M.S. Patterson. Measurement of fluorophore concentrations and fluorescence quantum yield in tissue-simulating phantoms using three diffusion models of steady-state spatially resolved fluorescence. *Physics in Medicine and Biology*, 48 :4135–4149, 2003.
- [Dobrin, 1978] P.B. Dobrin. Mechanical properties of arteries. *Physiological Reviews*, 58(2) :397–460, 1978.
- [DREES, 2006] Direction de la recherche, des études, de l’évaluation et des statistiques DREES. L’état de santé de la population en France en 2006, 2006.
- [Drezek *et al.*, 2001] R. Drezek, K. Sokolov, 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*, 6(4) :385–396, 2001.
- [Durkin, 1995] A. Durkin. *Quantitative fluorescence spectroscopy of turbid samples*. PhD thesis, University of Texas at Austin, 1995.
- [Eggert and Blazek, 1987] H. Eggert and V. Blazek. Optical properties of human brain tissue, meninges, and brain tumors in the spectral range of 200 to 900 nm. *Neurosurgery*, 21(4) :459–464, 1987.
- [Eker *et al.*, 2001] C. Eker, R. Rydell, K. Svanberg, and S. Andersson-Engels. Multivariate analysis of laryngeal fluorescence spectra recorded *in vivo*. *Lasers in Surgery and Medicine*, 28(3) :259–266, 2001.
- [El Kathib, 2005] 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.
- [Elliott, 1993] R.S. Elliott. *Electromagnetics : History, Theory, and Applications*. IEEE Press, 1993.
- [Emmel, 2000] P. Emmel. Nouvelle formulation du modèle de Kubelka et Munk avec applications aux encres fluorescentes. In *Actes de l'Ecole de Printemps*, pages 87–96, 2000.
- [Enfield *et al.*, 2007] L.C. Enfield, A.P. Gibson, N.L. Everdell, D.T. Delpy, M. Schweiger, S.R. Arridge, C. Richardson, M. Keshtgar, M. Douek, and J.C. Hebden. Three-dimensional time-resolved optical mammography of the uncompressed breast. *Applied Optics*, 46(17) :3628–3638, 2007.
- [Escofier and Pagès, 2002] B. Escofier and J. Pagès. *Analyses factorielles simples et multiples*. Dunod, 3 edition, 2002.
- [Esteco, 2007] Esteco. ModeFRONTIER, 2007.
- [Evans *et al.*, 2006] J.A. Evans, J.M. Ponomeros, B.E. Bouma, J. Bressner, E.F. Halpern, M. Shishkov, G.Y. Lauwers, M. Mino-Kenudson, N.S. Nishioka, and G.J. Tearney. Optical coherence tomography to identify intramucosal carcinoma and high-grade dysplasia in Barrett’s esophagus. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(1) :38–43, 2006.
- [Farrar *et al.*, 1999] S. Farrar, C. Roberts, W. Johnston, and P. Weber. Optical properties of human trabecular meshwork in the visible and near-infrared region. *Lasers in Surgery and Medicine*, 25(4) :348–362, 1999.
- [Farrel *et al.*, 1992] T. Farrel, M. Patterson, and B. Wilson. A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical properties *in vivo*. *Medical Physics*, 19(4) :879–888, 1992.
- [Filippidis *et al.*, 2000] 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.
- [Flahaut, 2007] S. Flahaut. Liste d’indices de réfraction. Traduction du BlenderArt n° 7, 2007.
- [Flock *et al.*, 1989a] S.T. Flock, M.S. Patterson, B.C. Wilson, and D.R. Wyman. Monte Carlo modeling of light propagation in highly scattering tissues. I : Model predictions and comparison with diffusion theory. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 36(12) :1162–1168, 1989.
- [Flock *et al.*, 1989b] S.T. Flock, B.C. Wilson, and M.S. Patterson. Monte Carlo modeling of light propagation in highly scattering tissues. II : Comparison with measurements in phantoms. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 36(12) :1169–1173, 1989.

-
- [Flock *et al.*, 1992] 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.
- [FNCLCC, 1998] Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre Le Cancer FNCLCC. CIR-CAN, bases théoriques : dépistage, données méthodologiques, 1998.
- [FNCLCC, 2003] FNCLCC. Métaplasie. <http://www.fnclcc.fr>, 2003.
- [Fossa and Kaalhus, 1976] S.D. Fossa and O. Kaalhus. Nuclear size and chromatin concentration in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Beiträge zur Pathologie*, 157(2) :109–25, 1976.
- [Fung and Liu, 1993] Y.C. Fung and S.Q. Liu. Elementary mechanics of the endothelium of blood vessels. *Journal of Biomechanical Engineering*, 115(1) :1–12, 1993.
- [Gattegno and Chopin, 2001] B. Gattegno and D. Chopin. *Histoire naturelle*, volume 11(5), chapter 6, pages 963–990. Progrès en Urologie, 2001.
- [Ge *et al.*, 1998] Z. Ge, K.T. Schomacker, and N.S. Nishioka. Identification of Colonic Dysplasia and Neoplasia by Diffuse Reflectance Spectroscopy and Pattern Recognition Techniques. *Applied Spectroscopy*, 52(6) :833–839, 1998.
- [Genclis, 2007] Société Genclis. Genclis lève le voile sur l’infidélité des cellules tumorales. Lettre n°329 de Biotech Finances, 2007.
- [Georgakoudi and Van Dam, 2005] I. Georgakoudi and J. Van Dam. Characterization of Dysplastic Tissue Morphology and Biochemistry in Barrett’s Esophagus Using Diffuse Reflectance and Light Scattering Spectroscopy. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, 7(2) :100–105, 2005.
- [Georgakoudi *et al.*, 2001] 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.
- [Georgakoudi *et al.*, 2002] 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.
- [Giovannelli, 1955] R.G. Giovanelli. Reflection by Semi-infinite Diffusers. *Journal of Modern Optics*, 2(4) :153–162, 1955.
- [Girerd *et al.*, 1992] X. Girerd, J.J. Mourad, P. Boutouyrie, A. Benetos, S. Laurent, and M. Safar. Conséquences du vieillissement sur la fonction artérielle chez l’homme. *Presse Médicale*, 21 :1204–1209, 1992.
- [Giusto *et al.*, 2003] A. Giusto, R. Saija, M.A. Iat, P. Denti, F. Borghese, and O.I. Sindoni. Optical Properties of High-Density Dispersions of Particles : Application to Intralipid Solutions. *Applied Optics*, 42(21) :4375–4380, 2003.
- [Gélébart *et al.*, 1997] B. Gélébart, E. Tinet, J.M. Tualle, S. Avrillier, and J.P. Ollivie. Time- and space-resolved reflectance applied to the analysis of multi-layered turbid media. *Journal of Optics*, 28 :234–244, 1997.
- [Gniadecka *et al.*, 1997] M. Gniadecka, H. Wulf, O. Nielsen, D. Christensen, and J. Hercogova. Distinctive abnormalities in benign and malignant skin lesions : studies by Raman spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology*, 66(4) :418–423, 1997.

- [Génie des Procédés, 1998] Génie des Procédés. Techniques spectrométriques : spectroscopie Raman. Technical report, Ecole des Mines de Saint-Etienne, 1998.
- [Goujon *et al.*, 2003] 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.
- [Gournier *et al.*, 1993] J.P. Gournier, M. Adham, J.P. Favre, M. Raba, B. Bancel, J.C. Lepetit, and X. Barral. Allogreffes artérielles cryopréservées : étude préliminaire. *Annales de chirurgie vasculaire*, 7(6) :503–511, 1993.
- [Grandidier and Morhain, 2004] V. Grandidier and F. Morhain. Spectrométrie de diffusion élastique : Etude de la distribution spatiale de la lumière provenant de différentes sources lumineuses et de sa focalisation dans une fibre optique. Technical report, Université Henry Poincaré, Nancy I, 2004.
- [Greene *et al.*, 2006] K.L. Greene, A. Berryand, and B.R. Konety. Diagnostic Utility of the Immunocyt/uCyt+ Test in Bladder Cancer. *Reviews in Urology*, 8(4) :190–197, 2006.
- [Groenhuis *et al.*, 1983a] R. Groenhuis, J. Ten Bosh, and H. Ferwerda. Scattering and absorption of turbid materials determined from reflection measurements. 2 : Measuring methods and calibration. *Applied Optics*, 22(16) :2463–2467, 1983.
- [Groenhuis *et al.*, 1983b] R. Groenhuis, H. Ferwerda, and J. Ten Bosh. Scattering and absorption of turbid materials determined from reflection measurements. 1 : Theory. *Applied Optics*, 22(16) :2456–2462, 1983.
- [Gurjar *et al.*, 2001] 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.
- [Hakumäki and Liimatainen, 2005] J.M. Hakumäki and T. Liimatainen. Molecular imaging of apoptosis in cancer. *European Journal of Radiology*, 56(2) :143–153, 2005.
- [Haringsma and Tytgat, 1999] J. Haringsma and G.N. Tytgat. Fluorescence and autofluorescence. *Baillière’s Best Practice and Research. Clinical Gastroenterology*, 13(1) :1–10, 1999.
- [Haussinger *et al.*, 2005] K. Haussinger, H. Becker, F. Stanzel, A. Kreuzer, B. Schmidt, J. Strausz, S. Cavaliere, F. Herth, M. Kohlhauff, K.M. Muller, R.M. Huber, U. Pichlmeier, and Ch.T. Bolliger. Autofluorescence bronchoscopy with white light bronchoscopy compared with white light bronchoscopy alone for the detection of precancerous lesions : a European randomised controlled multicentre trial. *Thorax*, 60(6) :496–503, 2005.
- [Hayakawa *et al.*, 2001] C. Hayakawa, S. Jerome, and F. Bevilacqua. Perturbation Monte Carlo methods to solve inverse photon migration problems in heterogeneous tissues. *Optics Letters*, 26(17) :1335–1337, 2001.
- [Heintzelman *et al.*, 2000] L.D. Heintzelman, U. Utzinger, H. Fuchs, A. Zuluaga, K. Gossage, A. Gillenwater, R. Jacob, B. Kemp, and R. Richards-Kortum. Optimal excitation wavelengths for *in vivo* detection of oral neoplasia using fluorescence spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology*, 72(1) :103–113, 2000.
- [Hendricks and Booth, 1985] J.S. Hendricks and T.E. Booth. MCNP variance reduction overview. *Lecture Notes in Physics*, 240 :83–92, 1985.
- [Heney *et al.*, 1983] N.M. Heney, S. Ahmed, M.J. Flanagan, W. Frable, M.P. Corder, M.D. Hafermann, and I.R. Hawkins. Superficial bladder cancer : progression and recurrence. *The Journal of Urology*, 130(6) :1083–1086, 1983.

-
- [Henye and Greenstein, 1941] L.C. Henye and J.L. Greenstein. Diffuse radiation in the galaxy. *Astrophysical Journal*, 93 :70–83, 1941.
- [Heron, 1997] J.F. Heron. Cancérologie fondamentale, 1997.
- [Heron, 2003] J.F. Heron. Dépistage du cancer, 2003.
- [Hicks, 1975] R.M. Hicks. The mammalian urinary bladder : an accommodating organ. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 50(2) :215–246, 1975.
- [Hourdakis and Perris, 1995] C.J. Hourdakis and A. Perris. A Monte Carlo estimation of tissue optical properties for use in laser dosimetry. *Physics in Medicine and Biology*, 40(3) :351–364, 1995.
- [Hüttenberger *et al.*, 2005] D. Hüttenberger, T. Gabrecht, G. Wagnières, B. Weber, A. Linder, H.G. Foth, and L. Freitag. Autofluorescence detection of tumors in the human lung - comparison between *in vivo* and *vitro* measurements. In *SPIE-ECBO European Conference on Biomedical Optics*, Munich, Allemagne, 2005.
- [Huh *et al.*, 2004] W.K. Huh, R.M. Cestero, F.A. Garcia, M.A. Gold, R.S. Guido, K. McIntyre-Seltman, D.M. Harper, L. Burke, S.T. Sum, R.F. Flewelling, and R.D. Alvarez. Optical detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia *in vivo* : Results of a 604-patient study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190(5) :1249–1257, 2004.
- [Hyde *et al.*, 2001] D.E. Hyde, T.J. Farrell, M.S. Patterson, and B.C. Wilson. A diffusion theory model of spatially resolved fluorescence from depth-dependent fluorophore concentrations. *Physics in Medicine and Biology*, 46(2) :369–383, 2001.
- [Irani, 2003] J. Irani. Epidémiologie du cancer de vessie. *Progrès en Urologie*, 13 :1207–1208, 2003.
- [Ishimaru, 1978] A. Ishimaru. *Wave propagation and scattering in random media*. IEEE Press Series on Electromagnetic Wave Theory, Academic Press, San Diego, 1978.
- [Jackson, 2001] J.D. Jackson. *Electrodynamique classique*. Dunod, 2001.
- [Jacques and Prah, 1998] S.L. Jacques and S.A Prah. *Tissue optics*, chapter Transport : Monte Carlo simulations. 1998.
- [Jacques, 1998] 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.
- [Jacques, 2005] S.L. Jacques. Short Course Notes : Tissue Optics. Spie Education Courses, 2005.
- [Jemal *et al.*, 2004] A. Jemal, R.C. Tiwari, T. Murray, A. Ghafoor, A. Samuels, E. Ward, E.J. Feuer, and M.J. Thun. Cancer Statistics. *CA : A Cancer Journal for Clinicians*, 54(1) :7–29, 2004.
- [Jichlinski *et al.*, 2003] P. Jichlinski, L. Guillou, S.J. Karlsen, P.U. Malmstrom, D. Jocham, B. Brennhovd, E. Johansson, T. Gartner, N. Lange, H. van den Bergh, and H.J. Leisinger. Hexyl aminolevulinate fluorescence cystoscopy : new diagnostic tool for photodiagnosis of superficial bladder cancer, a multicenter study. *Journal of Urology*, 170(1) :226–229, 2003.
- [Jost *et al.*, 1989] S.P. Jost, J.A. Gosling, and J.S. Dixon. The morphology of normal human bladder urothelium. *Journal of Anatomy*, 167 :103–115, 1989.
- [Juzenas *et al.*, 2002] P. Juzenas, S. Sharfaei, J. Moan, and R. Bissonnette. Protoporphyrin IX fluorescence kinetics in UV-induced tumours and normal skin of hairless mice after topical application of 5-aminolevulinic acid methyl ester. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B : Biology*, 67(1) :11–17, 2002.

- [Kak and Slaney, 1999] A.C. Kak and M. Slaney. *Principles of computerized tomographic imaging*. IEEE Press New York, 1999.
- [Kara *et al.*, 2004] 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.
- [Kienle and Patterson, 1997] A. Kienle and M.S. Patterson. Improved solutions of the steady-state and the time-resolved diffusion equations for reflectance from semi-infinite turbid media. *Journal of the Optical Society of America*, 14 :246–254, 1997.
- [Koenig *et al.*, 1998a] F. Koenig, R. Larne, H. Enquist, F.J. McGovern, K.T. Schomacker, N. Kollias, and T.F. Deutsch. Spectroscopic measurement of diffuse reflectance for enhanced detection of bladder carcinoma. *Journal of Urology*, 51(2) :342–345, 1998.
- [Koenig *et al.*, 1998b] 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.
- [Koss, 1979] L.G. Koss. Mapping of the urinary bladder : its impact on the concepts of bladder cancer. *Human Pathology*, 10(533-548) :5, 1979.
- [Kubelka and Munk, 1931] P. Kubelka and F. Munk. Ein beitrag zur optik der farbanstriche. *Zeitschrift fur Technische Physik*, 12 :593–601, 1931.
- [Kubelka, 1948] P. Kubelka. New contributions to the optics of intensely light-scattering materials. *Journal of the Optical Society of America*, 38 :448–457, 1948.
- [Kumar and Singh, 2003] D. Kumar and M. Singh. Characterization and Imaging of Compositional Variation in Tissues. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 50(8) :1012–1019, 2003.
- [Landais and Jais, 2002] P. Landais and J.P. Jais. Biostatistique clinique, épidémiologie et essais cliniques. Faculté de Médecine Necker, 2002.
- [Langerak *et al.*, 2001] S.E. Langerak, M. Groenink, E.E. van der Wall, C. Wassenaar, E. Vanbavel, M.C. van Baal, and J.A. Spaan. Impact of current cryopreservation procedures on mechanical and functional properties of human aortic homografts. *Transplant International*, 14 :248–255, 2001.
- [Lau *et al.*, 2003] D.P. Lau, Z. Huang, H. Lui, C.S. Man, K. Berean, M.D. Morrison, and H. Zeng. Raman spectroscopy for optical diagnosis in normal and cancerous tissue of the nasopharynx-preliminary findings. *Lasers in Surgery and Medicine*, 32(3) :210–214, 2003.
- [Laurent *et al.*, 1994] S. Laurent, X. Girerd, J.-J. Mourad, P. Lacolley, L. Beck, P. Boutouyrie, J.-P. Mignot, and M. Safar. Elastic Modulus of the Radial Artery Wall Material Is Not Increased in Patients With Essential Hypertension. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 14(7) :1223–1231, 1994.
- [Lebart *et al.*, 2002] L. Lebart, A. Morineau, and M. Piron. *Statistique exploratoire multidimensionnelle*. Dunod, 3 edition, 2002.
- [Legras, 2002] B. Legras. *Éléments de statistique*. Ellipses, 2002.
- [Lehalle *et al.*, 1997] B. Lehalle, C. Geschier, G. Fieve, and J.F. Stoltz. Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts. *Journal of Vascular Surgery*, 25 :751–752, 1997.
- [LightLab, 2007] LightLab. Optical Coherence Tomography. [http ://www.lightlabimaging.com/whyoct.html](http://www.lightlabimaging.com/whyoct.html), 2007.

-
- [Lin *et al.*, 2000] W.C. Lin, S.A. Toms, M. Motamedi, E.D. Jansen, and A. Mahadevan-Jansen. Brain tumor demarcation using optical spectroscopy ; an *in vitro* study. *Journal of Biomedical Optics*, 5(2) :214–220, 2000.
- [Lin *et al.*, 2001] 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.
- [Liou, 1973] K.N. Liou. A numerical Experiment on Chandrasekhar’s discrete-ordinate method for radiative transfer : Application to cloudy and hazy atmospheres. *Journal of the Atmospheric Sciences*, 30 :1303–1326, 1973.
- [Liu and Ramanujam, 2002] 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.
- [Liu *et al.*, 2003] 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.
- [Liu *et al.*, 2004] Y. Liu, G. Viau, and R. Bissonnette. Multiple Large-Surface Photodynamic Therapy Sessions with Topical or Systemic Aminolevulinic Acid and Blue Light in UV-exposed Hairless Mice. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 8(2) :131–139, 2004.
- [Liu, 1994] P. Liu. A new phase function approximating to Mie scattering for radiative transport equations. *Physics in Medicine and Biology*, 39 :1025–1036, 1994.
- [Lokeshwar and Soloway, 2001] V.B. Lokeshwar and M.S. Soloway. Current bladder tumor tests : does their projected utility fulfill clinical necessity? *Journal of Urology*, 165(4) :1067–1077, 2001.
- [Louagie *et al.*, 1990] Y.A. Louagie, A. Legrand-Monsieur, E. Lavenne-Pardonge, C. Remacle, P. Delvaux, P. Maldague, M. Buche, R. Ponlot, and J.C. Schoevaerdt. Viability of long-term cryopreserved human saphenous veins. *Journal of Cardiovascular Surgery (Torino)*, 31(1) :92–100, 1990.
- [Lynn *et al.*, 1993] C. J. Lynn, I.S. Saidi, D.G. Oelberg, and S.L. Jacques. Gestational age correlates with skin reflectance in newborn infants of 24-42 weeks gestation. *Biology of the Neonate*, 64(2-3) :69–75, 1993.
- [Mahadevan-Jansen *et al.*, 1998] A. Mahadevan-Jansen, M. Mitchell, N. Ramanujam, A. Malpica, S. Thomsen, and U. Utzinger and R. Richards-Kortum. Near-infrared Raman spectroscopy for *in vitro* detection of cervical precancers. *Photochemistry and Photobiology*, 68(1) :123–132, 1998.
- [Manoharan *et al.*, 1998] R. Manoharan, K. Shafer, J. Wu, K. Chen, G. Deinum, M. Fitzmaurice, J. Myles, J. Crowe, R. Dasari, and M. Feld. Raman spectroscopy and fluorescence photon migration for breast cancer diagnosis and imaging. *Photochemistry and Photobiology*, 67(1) :15–22, 1998.
- [Martrenchard-Barra, 2006] S. Martrenchard-Barra. *Lumière Matière*. CNRS, Nature des Sciences, 2006.
- [Matszrak *et al.*, 2004] 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.
- [Mauna Kea Technologies, 2007] Mauna Kea Technologies. Cell vizio. <http://www.maunakeatech.com/med/puling>, 2007.

- [Mayinger *et al.*, 2004] B. Mayinger, M. Jordan, T. Horbach, P. Horner, C. Gerlach, S. Mueller, W. Hohenberger, and E. Hahn. Evaluation of *in vivo* endoscopic autofluorescence spectroscopy in gastric cancer. *Gastrointestinal Endoscopy*, 59(2) :191–198, 2004.
- [Mazerolles, 2005] C. Mazerolles. L’histoire naturelle des cancers de la vessie. *Progrès en Urologie*, 15 :1065–1066, 2005.
- [Meglinski and Matcher, 2003] I.V. Meglinski and S.J. Matcher. Computer simulation of the skin reflectance spectra. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 70 :179–186, 2003.
- [Melicow, 1945] M.M. Melicow. Tumors of the urinary drainage tract : urothelial tumors. *Journal of Urology*, 54 :186–193, 1945.
- [Métais, 1997] P. Métais. *Biochimie clinique. Tome 3 : biochimie fonctionnelle*. SIMEP, 1997.
- [Mian *et al.*, 2006] C. Mian, K. Maier, E. Comploj, M. Lodde, L. Berner, L. Lusuardi, S. Palermo, F. Vittadello, and A. Pycha. uCyt+/ImmunoCyt in the detection of recurrent urothelial carcinoma : an update on 1991 analyses. *Cancer Cytopathology*, 108(1) :60–65, 2006.
- [Mie, 1908] G. Mie. Considerations on the optics of turbid media, especially colloidal metal sols. *Annals of Physics*, 25(3) :377–455, 1908.
- [MILC, 2003] Mission Interministérielle pour la Lutte contre le Cancer MILC. *Plan Cancer 2003-2007*, 2003.
- [Mirabal *et al.*, 2002] Y.N. Mirabal, S.K. Chang, E.N. Atkinson, A. Malpica, M. Follen, and R. Richards-Kortum. Reflectance spectroscopy for *in vivo* detection of cervical precancer. *Journal of Biomedical Optics*, 7(4) :587–594, 2002.
- [Mobley and Vo-Dinh, 2003] J. Mobley and T. Vo-Dinh. *Optical Properties of Tissue*, chapter 2, pages 2.1–2.75. CRC Press, 2003.
- [Molinié, 2006] V. Molinié. Classification des tumeurs de vessie en 2006. *Formation médicale en urologie*, pages 7–12, 2006.
- [Moneron *et al.*, 2005] G. Moneron, K. Grieve, M. Atlan, F. Ramaz, V. Lorient, B. Forget, A. Dubois, and C. Boccara. Lumière et exploration du vivant. Laboratoire d’Optique Physique, Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles, 2005.
- [Moneron *et al.*, 2007] G. Moneron, A.C. Boccara, and A. Dubois. Polarization-sensitive full-field optical coherence tomography. *Optics Letters*, 32(14) :2058–2060, 2007.
- [Morgenthaler, 2001] S. Morgenthaler. *Introduction à la statistique*. Presses Polytechniques et universitaires romandes, 2001.
- [Mostofi *et al.*, 1999] F.K. Mostofi, C.J. Davis, and I.A. Sesterhenn. Histological typing of urinary bladder tumours. In *WHO : International histological classification of tumours*, volume 10. Heidelberg, Germany : Springer Verlag, Berlin, Springer, 1999.
- [Mourant *et al.*, 1995] 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.
- [Mourant *et al.*, 1996] J.R. Mourant, I.J. Bigio, J.D. Boyer, T.M. Johnson, J. Lacey, A.G. Bohorhous III, and M.H. Mellow. Elastic scattering spectroscopy as a diagnostic tool for differentiating pathologies in the gastrointestinal tract : preliminary testing. *Journal of Biomedical Optics*, 1(2) :192–199, 1996.
- [Mourant *et al.*, 1998] 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.

-
- [Mourant, 1997] J. Mourant. Monte Carlo investigations of the wavelength dependence of light transport through turbid media. In Proceedings of SPIE, editor, *Optical Biopsies and Microscopic Techniques II*, volume 3197, pages 93–8, 1997.
- [Muller and Roggan, 1995] G. Muller and A. Roggan. Laser-Induced Interstitial Thermotherapy. volume PM 25, Bellingham, WA, 1995.
- [Muller *et al.*, 2001] 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.
- [Muller *et al.*, 2003] 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, and M.S. Feld. Spectroscopic Detection and Evaluation of Morphologic and Biochemical Changes in Early Human Oral Carcinoma. *Cancer*, 97(7) :1681–1692, 2003.
- [Murrer *et al.*, 1995] L. Murrer, J. Marijnissen, and W. Star. *Ex vivo* light dosimetry and Monte Carlo simulations for endobronchial photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology*, 40(11) :1807–1817, 1995.
- [Myakov *et al.*, 2002] A. Myakov, L. Nieman, L. Wicky, U. Utzinger, R. Richards-Kortum, and K. Sokolov. Fiber optic probe for polarized reflectance spectroscopy in vivo : Design and performance. *Journal of Biomedical Optics*, 7(3) :388–397, 2002.
- [Nair *et al.*, 2002] M. Nair, N. Ghosh, N. Raju, and A. Pradhan. Determination of optical parameters of human breast tissue from spatially resolved fluorescence : a diffusion theory model. *Applied Optics*, 41(19) :4024–4035, 2002.
- [Nichols *et al.*, 1997] M.G. Nichols, E.L. Hull, and T.H. Foster. Design and testing of a white-light, steady-state diffuse reflectance spectrometer for determination of optical properties of highly scattering systems. *Applied Optics*, 36(1) :93–104, 1997.
- [Nicollet, 2006] J.L. Nicollet. Le cancer de la vessie et risques professionnels. Union régionale des caisses d’assurances maladie, 2006.
- [Niepsuj *et al.*, 2003] K. Niepsuj, G. Niepsuj, W. Cebula, W. Zieleznik, M. Adamek, A. Sielanczyk, J. Adamczyk, J. Kurek, and A. Sieron. Autofluorescence endoscopy for detection of high-grade dysplasia in short-segment barrett’s esophagus. *Gastrointestinal Endoscopy*, 58(5) :715–719, 2003.
- [Nordstrom *et al.*, 2001] R.J. Nordstrom, L. Burke, J.M. Niloff, and J.F. Myrtle. Identification of Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) Using UV-Excited Fluorescence and Diffuse-Reflectance Tissue Spectroscopy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 29(2) :118–127, 2001.
- [Olivier, 1996] S. Olivier. *Physique des ondes : électromagnétique et optique*. Lavoisier, 1996.
- [OMLC, 2004] Oregon Medical Laser Center OMLC. Optical Spectra. « [http ://omlc.ogi.edu/spectra/](http://omlc.ogi.edu/spectra/) », 2004.
- [OMS, 1992] Organisation Mondiale de la Santé OMS. Rayonnement ultraviolet et le Programme INTERSUN, 1992.
- [OMS, 2006] Organisation Mondiale de la Santé OMS. Le cancer, 2006. Aide-Mémoire n°297.
- [Oosterlinck *et al.*, 2002] W. Oosterlinck, B. Lobel, G. Jakse, P.U. Malmstrom, M. Stockle, and C. Sternberg. Guidelines on bladder cancer. *European Urology*, 41(2) :105–12, 2002.
- [Opticsvalley *et al.*, 2003] Opticsvalley, Genopole® Evry, and ADIT. *La Biophotonique française : perspectives de développement*. Ecole Polytechnique, 2003.

- [OPUS, 2003] Outils Pédagogiques Utiles en Sciences OPUS. La fibre optique. [http ://www2.fsg.ulaval.ca/opus/physique534/optique/fibre07.shtml](http://www2.fsg.ulaval.ca/opus/physique534/optique/fibre07.shtml), 2003.
- [Padilla Ybarra, 1999] J.J. Padilla Ybarra. *Biopsie optique par spectroscopie de fluorescence des tissus vivants : spectroscopie UV, microspectroscopie, spectroscopie résolue dans le temps*. PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, 1999.
- [Palmer *et al.*, 2003a] G.M. Palmer, P.J. Keely, T.M. Breslin, and N. Ramanujam. Autofluorescence Spectroscopy of Normal and Malignant Human Breast Cell Lines. *Photochemistry and Photobiology*, 78(5) :462–469, 2003.
- [Palmer *et al.*, 2003b] G.M. Palmer, C. Zhu, T.M. Breslin, F. Xu end 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.
- [Panjehpour *et al.*, 2002] M. Panjehpour, E.C. Julius, M.N. Phan, T. Vo-Dinh, and S. Overholt. Laser-induced fluorescence spectroscopy for *in vivo* diagnosis of non-melanoma skin cancers. *Lasers in Surgery and Medicine*, 31 :367–373, 2002.
- [Papaioannou *et al.*, 2003] T. Papaioannou, N.W. Preyer, Q. Fang, H. Kurt, M. Carnohan, R. Ross, A. Brightwell, G. Cottone, L.R. Jones, and L. Marcu. Performance evaluation of fiber optic probes for tissue lifetime fluorescence spectroscopy. volume 4958, pages 43–50, 2003.
- [Papaioannou *et al.*, 2004] T. Papaioannou, N.W. Preyer, Q. Fang, A. Brightwell, M. Carnohan, G. Cottone, R. Ross, L.R. 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*, 43(14) :2846–2860, 2004.
- [Parell *et al.*, 1992] T.J. Parell, M.S. Patterson, and B. Wilson. A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the non-invasive determination of tissue optical properties *in vivo*. *Medical Physics*, 19 :879–888, 1992.
- [Patterson *et al.*, 1989] M.S. Patterson, B. Chance, and B.C. Wilson. Time Resolved reflectance and transmittance for the non invasive measurement of tissue optical properties. *Applied Optics*, 28(12) :2331–2336, 1989.
- [Patterson *et al.*, 1991] 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.
- [Perelman and Backman, 2002] L. Perelman and V. Backman. *Light Scattering Spectroscopy of Epithelial Tissues : Principles and Applications*, chapter 12, pages 675–724. The International Society for Optical Engineering, 2002.
- [Perelman *et al.*, 1998] L.T. Perelman, V. Backman, M. Wallace, G. Zonios, R. Manoharan, A. Nusrat, S. Shields, M. Seiler, C. Lima, T. Hamano, I. Itzkan, J. Van Dam, J. M. Crawford, and M. S. Feld. Observation of Periodic Fine Structure in Reflectance from Biological Tissue : A New Technique for Measuring Nuclear Size Distribution. *Physical Review Letters*, 80(3) :627–630, 1998.
- [Perraudeau, 2004] M. Perraudeau. *Lumière et couleur*, volume C3340. 2004.
- [Pfefer *et al.*, 2001] 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.

-
- [Pfefer *et al.*, 2002] 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.
- [Pfefer *et al.*, 2003a] T. Pfefer, L. Matchette, C. Bennett, J. Gall, J. Wilke, A. Durkin, and M. Ediger. Reflectance-based determination of optical properties in highly attenuating tissue. *Journal of Biomedical Optics*, 8(2) :206–215, 2003.
- [Pfefer *et al.*, 2003b] 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.
- [Pfefer *et al.*, 2004] 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.
- [Pinel, 1997] V. Pinel. *Apport de la modélisation du transfert radiatif pour l’étude des écosystèmes forestiers par télédétection*. PhD thesis, Université Paul Sabatier, Toulouse, 1997.
- [Pogue *et al.*, 2001] B.W. Pogue, J.D. Pitts, M.A. Mycek, R.D. Sloboda, C.M. Wilmot, J.F. Brandsema, and J.A. O’Hara. In vivo NADH fluorescence monitoring as an assay for cellular damage in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74(6) :817–824, 2001.
- [Poisson, 2007] L. Poisson. Spectroscopie résolue en temps, 2007.
- [Ponerros and Nishioka, 2003] J.M. Ponerros and N.S. Nishioka. Diagnosis of Barrett’s esophagus using optical coherence tomography. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 13(2) :309–323, 2003.
- [Ponerros *et al.*, 2001] J.M. Ponerros, S. Brand, B.E. Bouma, G.J. Tearney, C.C. Compton, and N.S. Nishioka. Diagnosis of specialized intestinal metaplasia by optical coherence tomography. *Gastroenterology*, 120(1) :7–12, 2001.
- [Ponerros *et al.*, 2002] J.M. Ponerros, G.J. Tearney, M. Shiskov, P.B. Kelsey, G.Y. Lauwers, N.S. Nishioka, and B.E. Bouma. Optical coherence tomography of the biliary tree during ERCP. *Gastrointestinal Endoscopy*, 55(1) :84–88, 2002.
- [Prahl *et al.*, 1989] S.A. Prahl, M. Keijzer, S.L. Jacques, and A.J. Welch. A Monte Carlo Model of Light Propagation in Tissue. In *Proceedings of SPIE*, volume IS 5, pages 102–113, 1989.
- [Prahl, 1988] S.A. Prahl. *Light transport in tissue*. PhD thesis, University of Texas, 1988.
- [Prahl, 1995] S.A. Prahl. The Adding-Doubling Method. In A.J. Welch and M.J.C. van Gemert, editors, *Optical-Thermal Response of Laser Irradiated Tissue*, chapter 5, pages 101–129. Plenum Press, 1995.
- [Prosst and Gahlen, 2002] R.L. Prosst and J. Gahlen. Fluorescence diagnosis of colorectal neoplasms : a review of clinical applications. *International Journal of Colorectal Diseases*, 17(1) :1–10, 2002.
- [Péry *et al.*, 2005] E. Péry, 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 *Proceedings of SPIE*, volume 5695, pages 66–74, 2005.
- [Péry *et al.*, 2006a] E. Péry, M. Amouroux, G. Diaz, F. Guillemain, and W. Blondel. Spectroscopie bimodale (autofluorescence et diffusion élastique) pour la caractérisation tissulaire *in vivo*. In *ESPCI, Journée de Rencontres Club SFO « Photonique et Sciences du Vivant »*, 2006.
- [Péry *et al.*, 2006b] E. Péry, C. Thomas, W. Blondel, J. Didelon, S. Berrahmoune, and F. Guillemain. Bimodal spectroscopy : An application to an orthotopic rat bladder model. In *Proceedings of European Optical Society (EOS)*, 2006.

- [Ramanujam *et al.*, 1996a] N. Ramanujam, M. Mitchell, A. Jansen, S. Thomsen, G. Staerckel, 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.
- [Ramanujam *et al.*, 1996b] N. Ramanujam, M. Follen Mitchell, A. Mahadevan, S. Thomsen, A. Malpica, T. Wright, N. Atkinson, and R. Richards-Kortum. Development of a Multivariate Statistical Algorithm to Analyze Human Cervical Tissue Fluorescence Spectra Acquired In Vivo. *Lasers in Surgery and Medicine*, 19 :46–62, 1996.
- [Ramanujam, 2000] N. Ramanujam. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, chapter Fluorescence Spectroscopy In Vivo, pages 20–56. R.A. Meyers, Chichester, 2000.
- [Ranta, 2003] R. Ranta. *Traitement et analyse de signaux sonores physiologiques. Application à la phonoentérogaphie*. PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, 2003.
- [Rayleigh, 1871] Lord Rayleigh. On the light from the sky, its polarization and colour. *Philosophical Magazine*, 41 :107–120, 1871.
- [Richards-Kortum *et al.*, 1991] R. Richards-Kortum, R.P. Rava, M. Fitzmaurice, J.R. Kramer, and M.S. Feld. 476 nm excited laser-induced fluorescence spectroscopy of human coronary arteries : Applications in cardiology. *American Heart Journal*, 122(4) :1141–1150, 1991.
- [Roach and Burton, 1957] M.R. Roach and A.C. Burton. The reason for the shape of distensibility curves of arteries. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 35(8) :681–690, 1957.
- [Rosset *et al.*, 1996] 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.
- [Saidi *et al.*, 1995] I.S. Saidi, S.L. Jacques, and F.K. Tittel. Mie and Rayleigh modeling of visible-light scattering in neonatal skin. *Applied Optics*, 34(31) :7410–7418, 1995.
- [Saporta, 1990] G. Saporta. *Probabilités, analyse des données et statistique*. Éditions Technip, 1990.
- [Saul *et al.*, 2005] A.N. Saul, T.M. Oberyszyn, C. Daugherty, D. Kusewitt, S. Jones, S. Jewell, W.B. Malarkey, A. Lehman, S. Lemeshow, and F.S. Dhabhar. Chronic Stress and Susceptibility to Skin Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(23) :1760–1767, 2005.
- [Schantz *et al.*, 1998] S.P. Schantz, V. Kolli, H.E. Savage, G. Yu, J.P. Shah, D.E. Harris, A. Katz, R.R. Alfano, and A.G. Huvo. *In vivo* native cellular fluorescence and histological characteristics of head and neck cancer. *Clinical Cancer Research*, 4(5) :117–1182, 1998.
- [Schmidt, 1999] F. Schmidt. *Development of a Time-Resolved Optical Tomography System for Neonatal Brain Imaging*. PhD thesis, University of London, 1999.
- [Seitz and Soehendra, 2003] U. Seitz and N. Soehendra. Endoscopy : current state and future trends in tumor diagnosis. *Anticancer Research*, 23(2A) :827–829, 2003.
- [Selb, 2002] J. Selb. *Source virtuelle acousto-optique pour l'imagerie des milieux diffusants*. PhD thesis, Université Paris VI, 2002.
- [Shadwick, 1992] R.E. Shadwick. *Biomechanics, Structures and Systems : A Practical Approach*, chapter Circulatory structure and mechanisms, pages 233–261. A.A. Biewener, 1992.
- [Sharma, 1974] M.G. Sharma. Viscoelastic behavior of conduit arteries. *Biorheology*, 11 :279–291, 1974.

-
- [Shim *et al.*, 2000] M.G. Shim, L.M. Wong Kee Song, N.E. Marcon, and B. Wilson. *In vivo* near-infrared Raman spectroscopy : demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy. *Photochemistry and Photobiology*, 72(1) :146–150, 2000.
- [Shiyan, 2007] W. Shiyan. Encre de Chine. <http://www.chine-informations.com>, 2007.
- [Simonot, 2002] L. Simonot. *Etude expérimentale et modélisation de la diffusion de la lumière dans une couche de peinture colorée et translucide*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), 2002.
- [Skala *et al.*, 2004] 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.
- [Sokolov *et al.*, 2002] K. Sokolov, M. Follen, and R. Richards-Kortum. Optical spectroscopy for detection of neoplasia. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6 :651–658, 2002.
- [Sommoggy *et al.*, 1975] S. Sommoggy, H.J. Wiendl, M. Schwabe, and G. Blumel. Electronic volume analysis of cell nuclei in the gastric mucosa. *Langenbecks Archiv fur Chirurgie*, pages Suppl : 239–243, 1975.
- [Stevens and Lowe, 1997] A. Stevens and J. Lowe. *Histologie humaine, traduction française*, pages 137–147. De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 2^{ème} edition, 1997.
- [Stevens *et al.*, 2004] A. Stevens, J.S. Lowe, and B. Young. *Anatomie pathologique : Atlas de Wheater, traduction française*. De Boeck, 4^{ème} edition, 2004.
- [Stone *et al.*, 2004] N. Stone, C. Kendall, J. Smith, P. Crow, and H. Barr. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. *Faraday Discussions*, 126 :141–157, 2004.
- [Storchi, 1984] P.R.M. Storchi. Application of the Pn-method to the calculation of the angular flux of gamma rays. *Journal of computational physics*, 55(1) :81–97, 1984.
- [Sung *et al.*, 2003] K.B. Sung, R. Richards-Kortum, M. Follen, A. Malpica, C. Liang, and M.R. Descour. Fiber optic confocal reflectance microscopy : a new real-time technique to view nuclear morphology in cervical squamous epithelium *in vivo*. *Optics Express*, 11(24) :3171–3181, 2003.
- [Svistun *et al.*, 2004] E. Svistun, R. Alizadeh-Naderi, A. El-Naggar, R. Jacob, A. Gillenwater, and R. Richards-Kortum. Vision enhancement system for detection of oral cavity neoplasia based on autofluorescence. *Head Neck*, 26 :205–215, 2004.
- [Swartling *et al.*, 2005] J. Swartling, J. Svensson, D. Bengtsson, K. Terike, and S. Andersson-Engels. Fluorescence spectra provide information on the depth of fluorescent lesions in tissue. *Applied Optics*, 44(10) :1934–1941, 2005.
- [Swindle *et al.*, 2003] L.D. Swindle, S.G. Thomas, M. Freeman, and P.M. Delaney. View of normal human skin *in vivo* as observed using fluorescent fiber-optic confocal microscopic imaging. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(4) :706–712, 2003.
- [Takatani and Graham, 1979] S. Takatani and M. Graham. Theoretical analysis of diffuse reflectance from a two-layer tissue model. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 26(12) :656–664, 1979.
- [Taroni *et al.*, 2005] P. Taroni, A. Torricelli, L. Spinelli, A. Pifferi, F. Arpaia, G. Danesini, and R. Cubeddu. Time-resolved optical mammography between 637 and 985 nm : clinical study on the detection and identification of breast lesions. *Physics in Medicine and Biology*, 50(11) :2469–2488, 2005.

- [Tedgui and Levy, 1994] A. Tedgui and B. Levy. *Biologie de la paroi artérielle. Aspects normaux et pathologiques*. Masson, 1994.
- [Thakrar *et al.*, 2006] R.R. Thakrar, V.P. Patel, G. Hamilton, B.J. Fuller, and A.M. Seifalian. Vitreous cryopreservation maintains the viscoelastic property of human vascular grafts. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20 :874–881, 2006.
- [Thorlab, 2007] Thorlab. Optical Coherence Tomography. <http://www.thorlabs.com//advSearch.cfm>, 2007.
- [Thueller *et al.*, 2003] P. Thueller, 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.
- [Trébucq, 2005] A. Trébucq. *Le cancer de la vessie*. Ligue nationale contre le cancer, 2005.
- [Tricker *et al.*, 1989] A.R. Tricker, M.H. Mostafa, B. Spiegelhalder, and R. Preussmann. Urinary excretion of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in Schistosomiasis and bilharzia bladder cancer patients. *Carcinogenesis*, 10(3) :547–552, 1989.
- [Tsai *et al.*, 2003] T. Tsai, H.M. Chen, C.Y. Wang, J.C. Tsai, C.T. Chen, and C.P. Chiang. *In vivo* autofluorescence spectroscopy of oral premalignant and malignant lesions : distortion of fluorescence intensity by submucous fibrosis. *Lasers in Surgery and Medicine*, 33 :40–47, 2003.
- [Tuchin, 2002] V.V. Tuchin. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*, chapter Pulse and frequency-domain techniques for tissue spectroscopy and imaging, pages 355–986. The International Society for Optical Engineering, 2002.
- [Tuffin, 1997] B. Tuffin. *Simulation accélérée par les méthodes de Monte Carlo et Quasi-Monte Carlo : théorie et applications*. PhD thesis, Université de Rennes I, 1997.
- [Tyczynski and Parkin, 2003] J.E. Tyczynski and D.M. Parkin. Bladder Cancer in Europe. *Encr. (European Network of Cancer Registries) Cancer Fact Sheets*, pages 1–4, 2003.
- [UICC, 2002] International Union Against Cancer UICC. *TNM atlas : Illustrated guide to the TNM/pTNM classification of malignant tumours*. John Wiley and Sons : New York, 6 edition, 2002.
- [Utzing and Richards-Kortum, 2003] U. Utzinger and R.R. Richards-Kortum. Fiber optic probes for biomedical optical spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 8(1) :121–147, 2003.
- [Utzinger *et al.*, 2001a] U. Utzinger, M. Brewer, E. Silva, D. Gershenson, R.C. Blast, M. Follen, and R.R. Richards-Kortum. Reflectance Spectroscopy for *In Vivo* Characterization of Ovarian Tissue. *Lasers in Surgery and Medicine*, 28(1) :56–66, 2001.
- [Utzinger *et al.*, 2001b] U. Utzinger, D.L. Heintzelman, A. Mahadevan-Jansen, A. Malpica, M. Follen, and R.R. Richards-Kortum. Near-Infrared Raman Spectroscopy for *In Vivo* Detection of Cervical Precancers. *Applied Spectroscopy*, 55(8) :955–959, 2001.
- [Valette and Bourg-Heckly, 2002] S. Valette and G. Bourg-Heckly. *La spectroscopie tissulaire appliquée à la détection des états précancéreux et cancéreux précoces*, chapter 2, pages 103–168. HERMES, Lavoisier, 2002.
- [Valeur, 2001] B. Valeur. *Molecular Fluorescence : Principles and Applications*. Wiley-VCH, 2 edition, 2001.
- [Van de Hulst and Graaff, 1996] H.C. Van de Hulst and R. Graaff. Aspects of similarity in tissue optics with strong forward scattering. *Physics in Medicine and Biology*, 41(11) :2519–2531, 1996.

-
- [Van de Hulst, 1980] H.C. Van de Hulst. *Multiple Light Scattering : : Tables, Formulas, and Applications*, volume 2. Academic Press, 1980.
- [Van den Akker *et al.*, 2000] J.T.H.M. Van den Akker, H.S. de Bruijn, G.M.J. Beijersbergen van Henegouwen, W.M. Star, and H.J.C.M. Sterenborg. Protoporphyrin IX Fluorescence Kinetics and Localization after Topical Application of ALA Pentyl Ester and ALA on Hairless Mouse Skin with UVB-Induced Early Skin Cancer. *Photochemistry and Photobiology*, 72(3) :399–406, 2000.
- [van Staveren *et al.*, 1991] H.G. van Staveren, C.J.M. Moes, J. van Marle, S.A. Prahl, and M.J.C. van Gemert. Light scattering in Intralipid-10% in the wavelength range of 400-1100 nanometers. *Applied Optics*, 30 :4507–4514, 1991.
- [Vargas and Niklasson, 1997] W.E. Vargas and G.A. Niklasson. Applicability conditions of the Kubelka-Munk theory. *Applied Optics*, 36(22) :5580–5586, 1997.
- [Vargas, 2002] W.E. Vargas. Inversion methods from Kubelka-Munk analysis. *Journal of Optics A : Pure and Applied Optics*, 4(4) :452–456, 2002.
- [Verdier, 2000] J. Verdier. La propagation des ondes électromagnétiques, 2000.
- [Vignaud, 2004] J.M. Vignaud. Pathologie tumorale, 2004.
- [Vishwanath *et al.*, 2002] K. Vishwanath, B. Pogue, and M.A. Mycek. Quantitative fluorescence lifetime spectroscopy in turbid media : comparison of theoretical, experimental and computational methods. *Physics in Medicine and Biology*, 47 :3387–3405, 2002.
- [Vito and Dixon, 2003] R.P. Vito and S.A. Dixon. Blood vessel constitutive models : 1995-2002. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5 :413–439, 2003.
- [Vo-Dinh, 2003a] T. Vo-Dinh. *Biomedical Photonics Handbook*, chapter 6 : Basic Instrumentation in Photonics, pages 1–30. Tuan Vo-Dinh, CRC Press, 2003.
- [Vo-Dinh, 2003b] T. Vo-Dinh. *Biomedical Photonics Handbook*, chapter 2 : Optical Properties of Tissue, pages 1–75. Tuan Vo-Dinh, CRC Press, 2003.
- [Wagnieres *et al.*, 1998] G.A. Wagnieres, W.M. Star, and B.C. Wilson. *In vivo* fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochemistry and Photobiology*, 68(5) :603–632, 1998.
- [Wallace *et al.*, 2000] 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.
- [Wang *et al.*, 1995] 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.
- [Wang, 1998] L.V. Wang. Rapid modeling of diffuse reflectance of light in turbid slabs. *Journal of the Optical Society of America A*, 15(4) :936–944, 1998.
- [Wayt Gibbs, 2003] W. Wayt Gibbs. Untangling the Roots of Cancer. *Scientific American*, pages 56–65, 2003.
- [Welch *et al.*, 1987] A.J. Welch, G. Yoon, and M.J.C. Van Gemert. Practical models for light distribution in laser-irradiated tissue. *Lasers in Surgery and Medicine*, 6(6) :488–493, 1987.
- [West *et al.*, 1999] D.A. West, J.M. Cummings, W.E. Longo, K.S. Virgo, F.E. Johnson, and R.O. Parra. Role of chronic catheterization in the development of bladder cancer in patients with spinal cord injury. *Urology*, 53(2) :292–297, 1999.

- [Wilczynski, 2001] S. Wilczynski. *Introduction to the Diagnostics of Cancer*, chapter 33, pages 461–475. London : Nature Publishing Group, 2001.
- [Williams and Heistad, 1996] J.K. Williams and D.D. Heistad. Les vasa vasorum des artères (structure and function of arterial vasa vasorum). *Journal des Maladies Vasculaires*, 21(supplément C) :266–269, 1996.
- [Wu *et al.*, 1993] J. Wu, M.S. Feld, and R.P. Rava. Analytical model for extracting intrinsic fluorescence in turbid media. *Applied Optics*, 32(19) :3585–3595, 1993.
- [Yadavalli *et al.*, 2004] V.K. Yadavalli, R.J. Russell, M.V. Pishko, M.J. McShane, and G.L. Cote. A Monte Carlo simulation of photon propagation in fluorescent poly(ethylene glycol)hydrogel microsensors. *Sensors and Actuators B*, pages 1–13, 2004. article in press.
- [Yamazaki *et al.*, 2003] H. Yamazaki, S. Kaminaka, E. Kohda, M. Mukai, and H.O. Hamaguchi. The diagnosis of lung cancer using 1064-nm excited near-infrared multichannel Raman spectroscopy. *Radiation Medicine*, 21(1) :1–6, 2003.
- [Zaak *et al.*, 2005] D. Zaak, A. Karl, R. Knäuper, H. Stepp, A. Hartmann, O. Reich, A. Bachmann, M. Siebels, G. Popken, and C. Stief. Diagnosis of urothelial carcinoma of the bladder using fluorescence endoscopy. *British Journal of Urology*, 96 :217–222, 2005.
- [Zeng *et al.*, 2004] H. Zeng, M. Petek, M.T. Zorman, A. McWilliams, B. Palcic, and S. Lam. Integrated endoscopy system for simultaneous imaging and spectroscopy for early lung cancer detection. *Optics Letters*, 29(6) :587–589, 2004.
- [Zerbib, 1998] M. Zerbib. *Tumeurs de Vessie et des Voies Excrétrices Urinaires*. Ecole Européenne d’Oncologie, 1998.
- [Zheng *et al.*, 2003] 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.
- [Zhu *et al.*, 2003] 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.
- [Zhu *et al.*, 2006] C. Zhu, G. M. Palmer, T.M. 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*, 38 :714–724, 2006.
- [Zonios *et al.*, 1996] G. Zonios, R. Cothren, J. Arendt, J. Wu, J. Van Dam, J. Crawford, R. Manoharan, and M.S. Feld. Morphological model of human colon tissue fluorescence. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 43(2) :113–122, 1996.
- [Zonios *et al.*, 1999] G. Zonios, L.T. Perelman, V. Backman, R. Manoharan, M. Fitzmaurice, J. Van Dam, and M.S. Feld. Diffuse Reflectance Spectroscopy of Human Adenomatous Colon Polyps *In Vivo*. *Applied Optics*, 38(31) :6628–6637, 1999.

A

Distance entre les centres des cœurs des fibres
optiques de notre capteur

		Distance entre les fibres du capteur (µm)																																				
Numéro de la fibre		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
1		0	271	262.9	265.2	268.8	278.2	274.9	526.7	493.4	516.4	502.4	515.1	501.2	524.7	514.7	541.2	515.1	528.8	504.3	764.9	754.4	758.2	756.8	753	753.5	756.8	759.7	768.9	773.9	774	777.6	785.1	776.7	766.4	761.6	762.7	762.7
2			0	270.2	467.3	539.7	472.2	271.2	263.4	333.6	495.9	609.6	720.6	762.6	792.5	742.1	681	540.4	411.8	271.9	520	574	664.3	757	842.8	921.7	980.5	1019.3	1032.9	1032.7	995.2	940.8	869.8	772.2	669.6	574.3	513.4	491.7
3				0	265.9	462.5	541.1	466.6	415.8	265.3	260.8	340.4	489.4	606	722.6	766.7	810.5	738.5	669.6	537.7	589	517	485.3	515.7	573.4	661.9	734.1	845.1	927.3	988.1	1025	1040.5	1035.8	992.1	926.4	844.3	760.1	672
4					0	268.7	471	540	671.4	524.4	405.4	273.7	256.6	342.4	498.8	615.5	738.5	767.9	792	733.8	854.6	760.5	673.2	584.5	515.3	488.3	513.2	579.4	672.5	767.7	858.6	936.5	1002.2	1029.6	1031.6	1014.4	980.7	926.5
5						0	272.5	467.8	793.8	724.1	663.3	535.8	406	267	263	348.5	510.6	613.2	726.2	758.5	1022.8	979.5	928.7	853.1	762.7	666	583.2	518.1	500.2	525.7	590.2	679	781.2	862.1	927.3	982.8	1018.9	1031.4
6							0	272.4	732.2	758.9	792.4	741.1	667.9	531	408.8	273.7	270.3	343	498.6	604.1	992.2	1018.5	1036.3	1024.4	986.2	927	855.6	766.4	679.3	594.4	523	499.5	531.2	589.7	668.9	765.2	855.4	930.5
7								0	500.2	602.5	724.1	765.6	787.3	732	668.8	539.6	420	275.9	261.5	332.9	767.4	844.9	924.5	982.2	1015	1028.4	1019.7	985.9	937.2	866.8	773.5	682.2	598.8	525.5	491.6	515.1	583.2	669.7
8									0	267.2	527.1	728.2	905.1	996.1	1051.4	1004	920.2	736.6	526.4	279.9	267.4	401.4	583.4	762.5	920.7	1063.2	1169.9	1246.7	1291.5	1295.5	1254.8	1182.4	1076.2	927.9	757.5	566.1	389.9	256.3
9										0	267	497.3	716.4	866.8	986	1008.1	997.4	874	723	510.6	339.9	261	339.5	495.5	663.3	832.9	975.4	1097.5	1192.1	1249.5	1267.4	1251.1	1201	1102	974.3	817.8	657.1	491.8
10											0	258.5	515.3	724.1	904.3	996.3	1057.6	997.9	907.6	735	583.9	403.7	267.8	262.2	396.2	581.3	755.3	920.4	1063.1	1173.2	1249.5	1289.5	1296.1	1248.9	1165.5	1048.2	913.9	738.8
11												0	268.7	512.1	734.1	884.2	1010.3	1017.5	995.8	878.2	831.2	662.1	492.8	330.8	250.7	336.7	497.1	676.9	847.8	995.5	1119.4	1209.7	1271.2	1279	1248.3	1183.8	1094.8	977.4
12													0	270	524.9	729.3	916.5	993.7	1013.9	989.2	1056.2	915.2	761.2	583.4	404.2	260.2	264.8	408.4	590.4	767.1	933.4	1071.5	1187.1	1251.7	1277.3	1270.7	1233	1161.4
13														0	265.2	503.5	735	873.9	992	1005.2	1194.7	1100	987.2	840.7	674.2	493.4	339.1	258.6	339.3	497.1	677.5	845.2	1001.7	1115.1	1193.6	1245.6	1263.9	1246.3
14															0	265.2	531	727.3	907.3	987.5	1285.2	1239.4	1172	1064.1	925.6	758.6	587.4	405.4	270.5	269.1	412.3	593.3	781.7	938.2	1065.8	1173.5	1246.1	1282.4
15																0	276.1	508.7	733.7	872.5	1261.2	1269.1	1255.5	1199.5	1107.5	982	840	670.6	500.4	342.4	259.3	343.6	516.8	689.4	848.3	998.6	1117.5	1203.8
16																	0	265.9	528.4	724.1	1187.5	1251	1299.7	1293.8	1235.5	1176.6	1073.1	933.3	776.4	600.1	406.8	262.2	270.8	413.5	590.4	777.7	940.2	1075.3
17																		0	271.8	498.8	1000.1	1108	1199.8	1253.8	1268.1	1248.1	1196	1105.9	992.1	848.9	672.6	498	339.7	262	340.8	512.1	688.2	850.3
18																			0	254.7	773.8	923.1	1062.2	1169.7	1239.6	1278.4	1281.4	1243.9	1177.8	1074.9	930	767.7	590.9	403.7	258	267.2	416.4	592.7
19																				0	519.2	681.2	846.6	991	1104.4	1193.6	1246.2	1263.8	1250.5	1198	1101.6	981.4	834.1	658.3	477.6	313.3	260.4	332.9
20																					0	256.5	510.4	753.1	968	1163.8	1315.1	1452.5	1509.9	1538.8	1512	1449.6	1339.8	1177.5	982.8	751.3	514.1	265.7
21																						0	259.2	515.6	751.6	975.8	1159	1314.8	1433	1505.1	1528.4	1507.4	1442.3	1319.4	1158.9	958.1	744.3	512.2
22																							0	265.2	518	766.3	978.2	1169.6	1326.5	1440.9	1511.2	1535.7	1516.9	1436.5	1313.7	1148.1	962.2	751.1
23																								0	261.2	525.8	759.8	981.2	1172.5	1326.3	1442.2	1512.5	1541.8	1507.6	1427.6	1316.5	1152.4	970.2
24																									0	272.3	520.7	764.5	983.7	1171.3	1328.5	1441.6	1517.3	1529.7	1494.2	1415.1	1303.1	1154.9
25																										0	256	516.2	757.8	975.3	1170.9	1325.4	1447.2	1507.7	1519.9	1489.9	1422	1313.8
26																											0	268.1	524.2	763.5	989.8	1178.8	1340.6	1444.7	1501.3	1518.3	1493.8	1426.1
27																												0	263.1	518	769.2	988.5	1187.1	1333.6	1435	1500.7	1522.4	1499.2
28																													0	263.3	532.6	775.7	1005.3	1189.5	1332.2	1443.9	1510.3	1531.6
29																														0	278.5	537.7	790.8	1006.9	1186.3	1340.5	1449.6	1514.5
30																															0	267.1	536.2	778.4	990.2	1184	1334.3	1443.2
31																																0	276.8	537.1	774.1	1000.3	1185.9	1333.8
32																																	0	271.7	528	781.3	998	1182.1
33																																		0	264.7	544.3	772.8	985
34																																			0	277	529.5	762.4
35																																				0	259.9	508
36																																					0	255.7
37																																					0	

Fig. A.1 – Distance entre les centres des cœurs des fibres optiques de notre capteur (µm). Diamètre de cœur des fibres : 200 µm.

B

Tableau récapitulatif de quelques valeurs de propriétés optiques

Cette annexe présente des tableaux de synthèse de quelques valeurs des paramètres optiques μ_a , μ_s , μ_s' , g et n [Cheong *et al.*, 1990] [Vo-Dinh, 2003b]. Comme nous pouvons le constater ci-après, la bibliographie est plus riche pour les paramètres optiques de la peau que pour les paramètres optiques de la vessie et les paramètres optiques ne sont connus que pour quelques longueurs d'onde précises.

TAB. B.1 – Exemples de valeurs d'indice de réfraction (Ref. 1 : [Vo-Dinh, 2003b], Ref. 2 : [Flahaut, 2007], Ref. 3 : [Brizemur, 2006]).

Milieu	n	Ref
Vide	1	2
Eau :	1 - 1,33	2
gaz, 20°C, 35°C, 100°C	1,000261 - 1,33335 - 1,33157 - 1,31819	
Ethanol	1,36	2
Plastique	1,460	2
Plexiglass	1,50	2
Verre ordinaire :	1,511 - 1,539	3
361, 434, 486, 589, 656, 768 nm	1,539 - 1,528 - 1,523 - 1,517 - 1,514 - 1,511	
Cristal	1,6 - 2	1
Diamant	2,42	1

TAB. B.2 – Quelques valeurs d'indice de réfraction pour des tissus biologiques (Ref. 1 : [Vo-Dinh, 2003b], Ref. 2 : [Muller and Roggan, 1995]).

Description	$\lambda(\text{nm})$	n	Ref
Tissu artériel :			
- Intima	456-1 064	1,39	2
- Media	456-1 064	1,38	2
- Adventice	456-1 064	1,36	2
Vessie humaine :			
- Muqueuse	456-1 064	1,37	1
- Paroi	456-1 064	1,40	1
- Intégrale	456-1 064	1,38	1
Peau :			
- Souris	456-1 064	1,40	1
- Rat	456-1 064	1,42	1

TAB. B.3 – Valeurs de quelques paramètres optiques pour des tissus biologiques (Ref. 1 : [Vo-Dinh, 2003b], Ref. 2 : [Muller and Roggan, 1995], Ref. 3 : [Cheong *et al.*, 1990]).

Description	λ (nm)	μ_a (cm ⁻¹)	μ_s (cm ⁻¹)	$\mu_{s'}$ (cm ⁻¹)	g	Ref
Tissu artériel <i>in vitro</i> :						
- Intima	476	14.8	237	45	0.81	3
	580	8.9	183	34,8	0.81	3
	600	4	178	33,8	0.81	3
	633	3.6	171	25,7	0.85	3
	1 064	2.3	165		0.97	2
- Media	476	7.3	410	45,1	0.89	3
	580	4.8	331	33,1	0.9	3
	600	2.5	323	35,5	0.89	3
	633	2.3	310	31	0.9	3
	1 064	1	634		0.96	2
- Adventice	476	18.1	267	69,4	0.74	3
	580	11.3	217	49,9	0.77	3
	600	6.1	211	46,4	0.78	3
	633	5.8	195	37,1	0.81	3
	1 064	2	484		0.97	2
Vessie <i>in vitro</i> :						
- Muqueuse	1064	0,7	7,5		0,85	3
- Paroi	1064	0,9	54,3		0,85	3
- Intégrale	633	1,4	29,3	2,64	0,91	3
	1 064	0,4	116		0,9	3
Peau <i>in vitro</i> :						
- Epiderme	250	1 000	2 000		0,69	1
	308	300	1 400		0,71	1
	351	100	1 100		0,72	1
	415	66	800		0,74	1
	488	50	600		0,76	1
	514	44	600		0,77	1
	585	36	470		0,79	1
	633	35	450		0,8	1
	800	40	420		0,85	1
- Derme	250	35	833		0,69	1
	308	12	583		0,71	1
	351	7	458		0,72	1
	415	4,7	320		0,74	1
	488	3,5	250		0,76	1
	514	3	250		0,77	1
	585	3	196		0,79	1
	633	2,7	187,5		0,8	1
	800	2,3	175		0,85	1

C

Solution de la diffusion de Mie

Nous avons vu dans le paragraphe 3.1.3.3 que dans le cas d'une onde incidente I_0 non polarisée, l'intensité de l'onde diffusée I_1 peut s'écrire :

$$I_1 = \frac{1}{2} \frac{|S_1(\theta)|^2 + |S_2(\theta)|^2}{k^2 r^2} I_0 \quad (\text{C.1})$$

Les fonctions d'amplitude S_1 (perpendiculaire au plan de diffusion) et S_2 (dans le plan de diffusion) ont la forme suivante :

$$\begin{cases} S_1(\theta) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} [a_n \pi_n(\cos \theta) + b_n \tau_n(\cos \theta)] \\ S_2(\theta) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} [a_n \tau_n(\cos \theta) + b_n \pi_n(\cos \theta)] \end{cases} \quad (\text{C.2})$$

Les facteurs d'amplitude a_n et b_n ont la forme suivante :

$$\begin{aligned} & \text{Posons } x = k \cdot a = \frac{2\pi a}{\lambda} \quad \text{et} \quad y = m \cdot x \\ & \begin{cases} a_n = \frac{\psi'_n(y) \cdot \psi_n(x) - m \cdot \psi_n(y) \cdot \psi'_n(x)}{\psi'_n(y) \cdot \zeta_n(x) - m \cdot \psi_n(y) \cdot \zeta'_n(x)} \\ b_n = \frac{m \cdot \psi'_n(y) \cdot \psi_n(x) - \psi_n(y) \cdot \psi'_n(x)}{m \cdot \psi'_n(y) \cdot \zeta_n(x) - \psi_n(y) \cdot \zeta'_n(x)} \end{cases} \end{aligned} \quad (\text{C.3})$$

avec :

$$\begin{aligned}
 \psi_n(x) &= \sqrt{\frac{\pi \cdot x}{2}} J_{n+\frac{1}{2}}(x) \\
 C_n(x) &= (-1)^n \sqrt{\frac{\pi \cdot x}{2}} J_{-n-\frac{1}{2}}(x) \\
 \zeta_n(x) &= \psi_n(x) + i \cdot C_n(x) \\
 \psi'_n(x) &= \frac{\partial \psi_n(x)}{\partial x} \\
 \zeta'_n(x) &= \frac{\partial \zeta_n(x)}{\partial x}
 \end{aligned} \tag{C.4}$$

Les facteurs angulaires π_n et τ_n s'écrivent :

$$\begin{cases} \pi_n(\cos \theta) = \frac{1}{\sin \theta} \cdot P_n^l(\cos \theta) \\ \tau_n(\cos \theta) = \frac{d}{d\theta} \cdot P_n^l(\cos \theta) \end{cases} \tag{C.5}$$

P_n^l étant le polynôme de Legendre de degré n .

Par ailleurs, nous avons [Bohren and Huffman, 2004] :

$$\pi_n(1) = \tau_n(1) = \frac{n(n+1)}{2} \tag{C.6}$$

Ainsi, pour un angle $\theta = 0^\circ$, (C.2) se réduit à :

$$S_1(\theta = 0^\circ) = S_2(\theta = 0^\circ) = S(\theta = 0^\circ) = \frac{1}{2} \sum_n (2n+1)(a_n + b_n) \tag{C.7}$$

et (C.1) devient :

$$I_1 = \frac{1}{2} \frac{|\sum_n (2n+1)(a_n + b_n)|^2}{k^2 r^2} I_0 \tag{C.8}$$

soit :

$$I_1 = I_0 e^{(-\mu_t L)} \tag{C.9}$$

avec :

$$\mu_t = J \frac{4\pi}{k^2} \text{Re}(S(\theta = 0^\circ)) \tag{C.10}$$

où J est le nombre de diffuseurs par unité de volume.

D

Approximations analytiques de l'équation de transfert radiatif

Des approximations déterministes (paramétriques ou non paramétriques) de l'équation de transfert radiatif sont possibles dans différentes géométries. Deux modèles sont les plus couramment employés. Il s'agit d'un modèle :

- physique : l'approximation de la diffusion [Takatani and Graham, 1979] [Contini *et al.*, 1997],
- « phénoménologique » décrivant le comportement : la théorie de Kubelka-Munk [Kubelka and Munk, 1931] [Vargas, 2002].

D.1 Théorie de la diffusion

Une méthode d'approximation standard de l'équation de transport est connue sous le nom d'approximation P_N . Cette méthode permet de développer la radiance, la fonction de phase et la source en harmoniques sphériques jusqu'à l'ordre N . La précision de la méthode augmente avec N mais la complexité des calculs également.

En développant l'équation de transfert radiatif avec des harmoniques sphériques, il découle de nombreuses équations dont la plus simple est l'*équation de la diffusion* (dépendante en temps), avec comme approximation P_1 . L'approximation P_1 est valable seulement pour $\mu_{s'} \gg \mu_a$, soit $\mu_s \gg \mu_a$. Ce paragraphe présente une description brève de l'obtention de cette équation, le détail des calculs est donné en annexe E.

L'intégration de l'équation (3.58) sur tous les angles solides donne l'équation de continuité suivante :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot \vec{j}(\vec{r}, t) = -\mu_a \Phi(\vec{r}, t) + S(\vec{r}, t) \quad (\text{D.1})$$

$$\text{avec} \begin{cases} \Phi(\vec{r}, t) &= \int_{4\pi} L(\vec{r}, \vec{s}, t) d\Omega \\ \vec{j}(\vec{r}, t) &= \int_{4\pi} L(\vec{r}, \vec{s}, t) \vec{s} d\Omega \\ S(\vec{r}, t) &= \int_{4\pi} Q(\vec{r}, \vec{s}, t) d\Omega \end{cases}$$

où $\Phi(\vec{r}, t)$ est le taux de fluence (ou densité de photons) et $\vec{j}(\vec{r}, t)$ le flux surfacique radiatif.

Lorsque la diffusion est beaucoup plus importante que l'absorption ($\mu_{s'} \gg \mu_a$), dans le cadre de l'approximation P_1 , la luminance peut être approximée comme la somme d'un taux de fluence isotropique et d'un flux directionnel (contribution anisotrope) :

$$L(\vec{r}, \vec{s}, t) = \frac{1}{4\pi} \Phi(\vec{r}, t) + \frac{3}{4\pi} \vec{j}(\vec{r}, t) \cdot \vec{s} \quad (\text{D.2})$$

En reportant la décomposition de $L(\vec{r}, \vec{s}, t)$ (équation D.2) dans l'ETR (équation 3.58), en multipliant par $\vec{s}$ et en intégrant sur tous les angles solides, nous obtenons l'équation suivante :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial \vec{j}(\vec{r}, t)}{\partial t} = -\frac{1}{3} \nabla \Phi(\vec{r}, t) - \frac{1}{3D} \vec{j}(\vec{r}, t) \quad (\text{D.3})$$

où $D = 1/3(\mu_a + \mu_{s'})$ représente la constante de diffusion. En obtenant l'équation D.3, la source Q est supposée isotropique.

En combinant les équations (D.1) et (D.3), nous obtenons une équation différentielle en Φ appelée équation des télégraphes :

$$\begin{aligned} D \nabla^2 \Phi(\vec{r}, t) - \mu_a \Phi(\vec{r}, t) &= (1 + 3D\mu_a) \frac{1}{c} \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} - S(\vec{r}, t) \\ &+ \frac{3D}{c^2} \frac{\partial^2 \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t^2} - \frac{3D}{c} \frac{\partial S(\vec{r}, t)}{\partial t} \end{aligned} \quad (\text{D.4})$$

Pour $\mu_{s'} \gg \mu_a$, nous avons $3D\mu_a \ll 1$ et pour de faibles variations temporelles de l'intensité de la source, nous obtenons l'équation de la diffusion :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} - D \nabla^2 \Phi(\vec{r}, t) + \mu_a \Phi(\vec{r}, t) = S(\vec{r}, t) \quad (\text{D.5})$$

Pour $\mu_{s'} \gg \mu_a$, la constante de diffusion D est proche de $1/(3\mu_{s'})$.

Dans les cas plus complexes (équation d'onde inhomogène), il faut utiliser une résolution numérique. En particulier lorsque les propriétés optiques du milieu varient spatialement, on considère les variations des coefficients d'absorption et de diffusion comme des perturbations d'un bruit de fond uniforme :

$$\begin{cases} \mu_a(\vec{r}) &= \mu_{a,0} + \delta\mu_a(\vec{r}) \\ \mu_s(\vec{r}) &= \mu_{s,0} + \delta\mu_s(\vec{r}) \end{cases}$$

avec $\delta\mu_a$ et $\delta\mu_s$ des petites perturbations.

Ils existent alors deux approches pour résoudre l'équation de diffusion :

- l'approximation de Born qui est un développement au premier ordre des perturbations [Ishimaru, 1978] [Kak and Slaney, 1999] : le champ total $u(\vec{r})$ peut s'écrire comme la somme du champ incident $u_0(\vec{r})$ et une petite perturbation tel que : $u(\vec{r}) = u_0(\vec{r}) + u_{pert}(\vec{r})$,

- l'approximation de Rytov [Kak and Slaney, 1999] où le champ total est considéré comme une phase complexe : $u(\vec{r}) = e^{u_{pert}(\vec{r})}$.

Dans les deux cas, il s'agit de décomposer u en un terme u_0 qui ne dépend que des propriétés optiques du fond uniforme et un terme u_{pert} qui dépend linéairement des variations spatiales des propriétés optiques $\delta\mu_a$ et $\delta\mu_s$.

Le lecteur pourra se reporter aux références citées dans le document pour plus de détails.

D.2 Théorie de Kubelka-Munk (KMT)

Ce modèle découle de travaux menés dès 1905 par l'astrophysicien Arthur Schuster qui cherchait à expliquer le comportement des atmosphères stellaires. Sa théorie repose sur des milieux diffusants, mélange de gaz et de poussières, composés de particules de dimension inférieure à la longueur d'onde dans le visible. Il se plaçait ainsi dans les conditions requises pour appliquer la théorie de la diffusion de Rayleigh [Bohren and Huffman, 2004]. Historiquement, en 1931, les auteurs cherchaient un moyen simple de prédire la luminance d'un revêtement blanc couvrant une surface plane ayant un coefficient de réflexion quelconque.

L'utilisation de deux flux de rayonnement de sens opposés est à l'origine de toute une famille de variantes regroupées sous le nom de théories à deux constantes dont la théorie de Kubelka-Munk est la plus connue [Kubelka and Munk, 1931]. La théorie de Kubelka-Munk est donc une approche de transfert radiatif à 2 flux de lumière se propageant en sens opposés avec une source parfaitement diffuse [Ishimaru, 1978] [Schmidt, 1999] [Vargas, 2002].

Le modèle phénoménologique décrit l'absorption et la diffusion de la lumière dans un milieu homogène.

Considérons un revêtement d'épaisseur connue X déposé sur un support de surface infinie, afin de pouvoir négliger l'influence des bords, de réflectance connue R_g . La distribution de lumière est représentée comme deux flux d'énergie : un flux lumineux descendant $i(x)$ et un flux ascendant $j(x)$ réfléchi par le support dans la direction opposée.

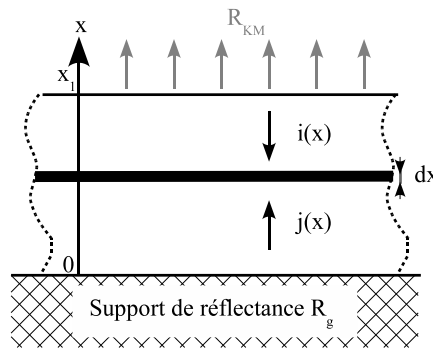


FIG. D.1 – Illustration de la théorie des deux flux dans le modèle de Kubelka-Munk.

Soit K la fraction de flux absorbée (coefficient d'absorption) et S_{KM} la fraction diffusée (coefficient de diffusion). Pour déterminer les flux transmis ou réfléchis, la couche est découpée en tranches élémentaires d'épaisseur dx . En effectuant un bilan radiatif des flux traversant une couche infinitésimale en x , nous aboutissons à un système d'équations différentielles linéaires à

coefficients constants [Kubelka, 1948] [Vargas, 2002] :

$$\begin{cases} \frac{di(x)}{dx} = (K + S_{KM})i(x) - Sj(x) \\ \frac{dj(x)}{dx} = -(K + S_{KM})j(x) + Si(x) \end{cases} \quad (D.6)$$

En intégrant les équations précédentes, nous obtenons l'expression explicite de la réflectance diffuse de Kubelka-Munk R_{KM} :

$$R_{KM} = \frac{1 - R_g[a - b \coth(bSX_1)]}{a + b \coth(bS_{KM}X_1) - R_g} \quad (D.7)$$

avec R_g le coefficient de réflexion diffuse, X_1 l'épaisseur du revêtement, $a = (K + S_{KM})/S$ et $b = \sqrt{a^2 - 1}$. Les deux paramètres K et S n'ont pas de signification physique [Cortat, 2004].

En négligeant les réflexions aux frontières en mesurant les réflectances diffuses R_0 pour un revêtement sur une surface noire ($R_g = 0$) et R_1 pour le même revêtement mais déposé sur une surface blanche ($R_g = 1$), nous montrons que :

$$\frac{K}{S_{KM}} = \frac{(1 - R_0)(1 - R_1)}{2R_0} \quad (D.8)$$

avec $R_0 = 1/(a + y)$, $R_1 = (1 - a + y)/(a + y - 1)$ où $y = b \coth(bS_{KM}X_1)$.

Lorsque $X_1 \rightarrow \infty$, l'expression également appelée fonction de Kubelka-Munk est obtenue [Emmel, 2000] [Vargas, 2002] [Cortat, 2004] :

$$\frac{K}{S_{KM}} = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2R_\infty} \quad (D.9)$$

où R_∞ désigne la réflectance limite lorsque l'épaisseur du revêtement tend vers l'infini.

E

Passage d'une équation de transfert radiatif à une équation de diffusion

E.1 Notations utilisées

Soit un point $M \in \mathbb{R}^3$ défini par ses coordonnées sphériques (r_M, θ_M, ϕ_M) dans le repère $(0, r, \theta, \phi)$ avec $r \geq 0$, la colatitude θ tel que $0 \leq \theta \leq \pi$ et l'angle azimuthal ϕ telle que $0 \leq \phi \leq 2\pi$. Les coordonnées cartésiennes de ce point dans le repère $(0, \vec{i}, \vec{j}, \vec{k})$ peuvent alors s'écrire :

$$\begin{aligned} M &= [r \sin \theta \cos \phi, r \sin \theta \sin \phi, r \cos \theta]^T \\ &= [x_M, y_M, z_M]^T \end{aligned} \quad (\text{E.1})$$

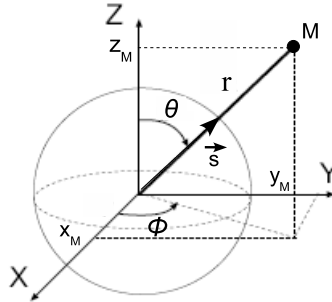


FIG. E.1 – Coordonnées sphériques et cartésiennes.

Le vecteur position s'écrit $\overrightarrow{OM} = r \cdot \vec{s}$ avec $\vec{s}$ le vecteur unitaire, dont les coordonnées s'écrivent :

$$\vec{s} = \sin \theta \cos \phi \vec{i} + \sin \theta \sin \phi \vec{j} + \cos \theta \vec{k} \quad (\text{E.2})$$

L'angle solide élémentaire $d\Omega$ s'exprime comme suit :

$$\begin{aligned} d\Omega &= \frac{d^2s}{r^2} = \frac{r d\theta r \sin \theta d\phi}{r^2} \\ &= \sin \theta d\theta d\phi \end{aligned} \quad (\text{E.3})$$

E.2 Rappels de mathématiques

Rappelons quelques résultats mathématiques qui interviendront fréquemment dans la suite des calculs :

- l'**angle solide** correspondant à tout l'espace vaut 4π :

$$\int_{4\pi} d\Omega = \int_{\theta=0}^{\pi} \int_{\phi=0}^{2\pi} \sin \theta d\theta d\phi = 4\pi \quad (\text{E.4})$$

- l'**intégrale de $\vec{s}$** sur tout l'espace est nulle :

$$\int_{4\pi} \vec{s} d\Omega = \int_{\theta=0}^{\pi} \int_{\phi=0}^{2\pi} (\sin \theta \cos \phi \vec{i} + \sin \theta \sin \phi \vec{j} + \cos \theta \vec{k}) \sin \theta d\theta d\phi = \vec{0} \quad (\text{E.5})$$

- la **condition de normalisation de la fonction de phase** $f(\vec{s}, \vec{s}')$ impose que :

$$\int_{4\pi} f(\vec{s}, \vec{s}') d\Omega = 1 \quad (\text{E.6})$$

- de la définition du **facteur d'anisotropie** g , on déduit que :

$$\int_{4\pi} f(\vec{s}, \vec{s}') \vec{s} d\Omega = g \cdot \vec{s}' \quad (\text{E.7})$$

Rappelons quelques définitions du calcul vectoriel :

- le **gradient** d'une fonction ou d'un champ scalaire $V(x, y, z)$ est un vecteur s'exprimant comme :

$$\begin{aligned} \overrightarrow{\text{grad}}(V) &= \vec{\nabla} V \\ &= \left[\frac{\partial V}{\partial x}, \frac{\partial V}{\partial y}, \frac{\partial V}{\partial z} \right]^T \\ &= \left[\frac{\partial V}{\partial r}, \frac{1}{r} \frac{\partial V}{\partial \theta}, \frac{1}{r \sin \theta} \frac{\partial V}{\partial \phi} \right]^T \end{aligned} \quad (\text{E.8})$$

- la **divergence** d'un champ vectoriel $\vec{E}$ est un scalaire :

$$\text{div}(\vec{E}) = \vec{\nabla} \cdot \vec{E} = \frac{\partial E_x}{\partial x} + \frac{\partial E_y}{\partial y} + \frac{\partial E_z}{\partial z} \quad (\text{E.9})$$

où $\vec{E} = (E_x, E_y, E_z)$ désigne le champ vectoriel auquel est appliqué l'opérateur divergence.

- le **rotationnel** d'un champ vectoriel $\vec{E}$ est un vecteur dont les coordonnées sont :

$$\begin{aligned}\vec{rot} \vec{E} &= \vec{\nabla} \wedge \vec{E} \\ &= \left[\frac{\partial E_z}{\partial y} - \frac{\partial E_y}{\partial z}, \frac{\partial E_x}{\partial z} - \frac{\partial E_z}{\partial x}, \frac{\partial E_y}{\partial x} - \frac{\partial E_x}{\partial y} \right]^T\end{aligned}\quad (\text{E.10})$$

- le **laplacien** d'une fonction $f(x, y, z)$ est un scalaire :

$$\Delta(f) = \nabla^2(f) = \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial z^2} \quad (\text{E.11})$$

$$\Delta(f) = \text{div}(\text{grad}(f))$$

- le **laplacien** d'un champ vectoriel $\vec{E}$ est un vecteur :

$$\begin{aligned}\Delta(\vec{E}) &= \vec{\nabla}^2(\vec{E}) \\ &= \left[\frac{\partial^2 E_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 E_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 E_x}{\partial z^2}, \frac{\partial^2 E_y}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial z^2}, \frac{\partial^2 E_z}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial z^2} \right]^T\end{aligned}\quad (\text{E.12})$$

$$\Delta(\vec{E}) = \text{grad}(\text{div}(\vec{E})) - \text{rot}(\text{rot}(\vec{E}))$$

E.3 Approximation de la diffusion

Repartons de l'équation de transfert radiatif (ETR) présentée dans le chapitre 3, paragraphe 3.2.1 :

$$\begin{aligned}\frac{1}{c} \frac{\partial L(\vec{r}, \vec{s}, t)}{\partial t} + \vec{s} \cdot \vec{\nabla} L(\vec{r}, \vec{s}, t) \\ = -(\mu_a + \mu_s) L(\vec{r}, \vec{s}, t) + \mu_s \int_{4\pi} L(\vec{r}, \vec{s}', t) f(\vec{s}, \vec{s}') d\Omega' + Q(\vec{r}, \vec{s}, t)\end{aligned}\quad (\text{E.13})$$

La méthode d'approximation polynomiale P_N consiste à décomposer la luminance L en harmoniques sphériques jusqu'à l'ordre N . L'approximation P_1 permet de réécrire L sous la forme :

$$L(\vec{r}, \vec{s}, t) = \frac{1}{4\pi} \Phi(\vec{r}, t) + \frac{3}{4\pi} \vec{j}(\vec{r}, t) \cdot \vec{s} \quad (\text{E.14})$$

avec

$$\begin{cases} \Phi(\vec{r}, t) = \int_{4\pi} L(\vec{r}, \vec{s}, t) d\Omega & \text{contribution isotrope} \\ \vec{j}(\vec{r}, t) = \int_{4\pi} L(\vec{r}, \vec{s}, t) \cdot \vec{s} d\Omega & \text{contribution anisotrope, composante selon } \vec{s} \end{cases} \quad (\text{E.15})$$

E.3.1 Première étape

La première étape du calcul consiste à intégrer les deux membres de l'ETR (équation E.13) sur tout l'espace ($\int_{4\pi} d\Omega$).

Terme de variation temporelle

$$\int_{4\pi} \frac{1}{c} \frac{\partial L(\vec{r}, \vec{s}, t)}{\partial t} d\Omega = \frac{1}{c} \frac{\partial}{\partial t} \int_{4\pi} L(\vec{r}, \vec{s}, t) d\Omega = \frac{1}{c} \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (\text{E.16})$$

Terme de gradient de luminance

$$\begin{aligned} \int_{4\pi} \vec{s} \cdot \vec{\nabla} L(\vec{r}, \vec{s}, t) d\Omega &= \frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} \vec{s} \cdot \vec{\nabla} \Phi(\vec{r}, t) d\Omega + \frac{3}{4\pi} \int_{4\pi} \vec{s} \cdot \vec{\nabla} \left(\vec{j}(\vec{r}, t) \cdot \vec{s} \right) d\Omega \\ &= 0 + \frac{3}{4\pi} \int_{4\pi} \vec{s} \cdot \left[\left(\vec{\nabla} \vec{j}(\vec{r}, t) \right) \cdot \vec{s} \right] d\Omega \\ &= \vec{\nabla} \cdot \vec{j}(\vec{r}, t) \end{aligned} \quad (\text{E.17})$$

Terme de pertes par absorption et diffusion

$$\int_{4\pi} (\mu_a + \mu_s) L(\vec{r}, \vec{s}, t) d\Omega = (\mu_a + \mu_s) \Phi(\vec{r}, t) \quad (\text{E.18})$$

Terme de rediffusion dans la direction $\vec{s}$

$$\begin{aligned} \int_{4\pi} \mu_s \left[\int_{4\pi} L(\vec{r}, \vec{s}', t) f(\vec{s}, \vec{s}') d\Omega' \right] d\Omega \\ &= \int_{4\pi} \mu_s \left[\int_{4\pi} \left(\frac{1}{4\pi} \Phi(\vec{r}, t) + \frac{3}{4\pi} \vec{j}(\vec{r}, t) \cdot \vec{s}' \right) f(\vec{s}, \vec{s}') d\Omega' \right] d\Omega \\ &= \int_{4\pi} \mu_s \left[\frac{1}{4\pi} \Phi(\vec{r}, t) \int_{4\pi} f(\vec{s}, \vec{s}') d\Omega' + \frac{3}{4\pi} \vec{j}(\vec{r}, t) \cdot \int_{4\pi} \vec{s}' f(\vec{s}, \vec{s}') d\Omega' \right] d\Omega \\ &= \frac{1}{4\pi} \mu_s \Phi(\vec{r}, t) \int_{4\pi} d\Omega + \frac{3}{4\pi} \mu_s \int_{4\pi} \vec{j}(\vec{r}, t) \cdot (\vec{g} \cdot \vec{s}) d\Omega \\ &= \mu_s \Phi(\vec{r}, t) \end{aligned} \quad (\text{E.19})$$

Terme source (source isotrope)

$$\int_{4\pi} Q(\vec{r}, \vec{s}, t) d\Omega = S_0(\vec{r}, t) \quad (\text{E.20})$$

Ainsi, on aboutit à une nouvelle équation :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot \vec{j}(\vec{r}, t) = -(\mu_a + \mu_s) \Phi(\vec{r}, t) - \mu_s \Phi(\vec{r}, t) + S_0(\vec{r}, t) \quad (\text{E.21})$$

soit :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot \vec{j}(\vec{r}, t) = -\mu_a \Phi(\vec{r}, t) + S_0(\vec{r}, t) \quad (\text{E.22})$$

E.3.2 Deuxième étape

La deuxième étape consiste à multiplier tous les termes de l'ETR (équation E.13) par $\vec{s}$, puis à intégrer sur tout l'espace ($\int_{4\pi} d\Omega$).

Terme de variation temporelle

$$\int_{4\pi} \frac{1}{c} \frac{\partial L(\vec{r}, \vec{s}, t)}{\partial t} \cdot \vec{s} d\Omega = \frac{1}{c} \frac{\partial}{\partial t} \int_{4\pi} L(\vec{r}, \vec{s}, t) \cdot \vec{s} d\Omega = \frac{1}{c} \frac{\partial \vec{j}(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (\text{E.23})$$

Terme de gradient de luminance

$$\begin{aligned} & \int_{4\pi} \left(\vec{s} \cdot \vec{\nabla} L(\vec{r}, \vec{s}, t) \right) \cdot \vec{s} d\Omega \\ &= \int_{4\pi} \left[\vec{s} \cdot \vec{\nabla} \left(\frac{1}{4\pi} \Phi(\vec{r}, t) + \frac{3}{4\pi} \vec{j}(\vec{r}, t) \cdot \vec{s} \right) \right] \cdot \vec{s} d\Omega \\ &= \frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} \left(\vec{s} \cdot \vec{\nabla} \Phi(\vec{r}, t) \right) \cdot \vec{s} d\Omega + \frac{3}{4\pi} \int_{4\pi} \left[\vec{s} \cdot \vec{\nabla} \left(\vec{j}(\vec{r}, t) \cdot \vec{s} \right) \right] \cdot \vec{s} d\Omega \\ &= \frac{1}{3} \vec{\nabla} \Phi(\vec{r}, t) + \frac{3}{4\pi} \int_{4\pi} \left[\vec{s} \cdot \left(\nabla \vec{j}(\vec{r}, t) \cdot \vec{s} \right) \right] \cdot \vec{s} d\Omega \\ &= \frac{1}{3} \vec{\nabla} \Phi(\vec{r}, t) \end{aligned} \quad (\text{E.24})$$

Terme de pertes par absorption et diffusion

$$\int_{4\pi} (\mu_a + \mu_s) L(\vec{r}, \vec{s}, t) \cdot \vec{s} d\Omega = (\mu_a + \mu_s) \cdot \vec{j}(\vec{r}, t) \quad (\text{E.25})$$

Terme de rediffusion dans la direction $\vec{s}$

$$\begin{aligned} & \int_{4\pi} \mu_s \left[\int_{4\pi} L(\vec{r}, \vec{s}', t) f(\vec{s}, \vec{s}') d\Omega' \right] \cdot \vec{s} d\Omega \\ &= \int_{4\pi} \mu_s \left[\int_{4\pi} \frac{1}{4\pi} \Phi(\vec{r}, t) f(\vec{s}, \vec{s}') d\Omega' \right] \cdot \vec{s} d\Omega \\ & \quad + \int_{4\pi} \mu_s \left[\int_{4\pi} \frac{3}{4\pi} \left(\vec{j}(\vec{r}, t) \cdot \vec{s}' \right) f(\vec{s}, \vec{s}') d\Omega' \right] \cdot \vec{s} d\Omega \\ &= \frac{1}{4\pi} \mu_s \Phi(\vec{r}, t) \int_{4\pi} \vec{s} d\Omega + \frac{3}{4\pi} \mu_s \int_{4\pi} \left[\vec{j}(\vec{r}, t) \cdot \int_{4\pi} \vec{s}' f(\vec{s}, \vec{s}') d\Omega' \right] \cdot \vec{s} d\Omega \\ &= \frac{3}{4\pi} \mu_s \int_{4\pi} \left(\vec{j}(\vec{r}, t) \cdot \vec{g} \cdot \vec{s} \right) \cdot \vec{s} d\Omega \\ &= \mu_s \cdot \vec{g} \cdot \vec{j}(\vec{r}, t) \end{aligned} \quad (\text{E.26})$$

La source Q est supposée isotrope $\Rightarrow \int_{4\pi} Q d\Omega = 0$

On aboutit alors à l'équation suivante :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial \vec{j}(\vec{r}, t)}{\partial t} + \frac{1}{3} \vec{\nabla} \Phi(\vec{r}, t) + (\mu_a + \mu_s) \cdot \vec{j}(\vec{r}, t) = \mu_s \cdot g \cdot \vec{j}(\vec{r}, t) \quad (\text{E.27})$$

soit :

$$\begin{aligned} \frac{1}{c} \frac{\partial \vec{j}(\vec{r}, t)}{\partial t} &= -\frac{1}{3} \vec{\nabla} \Phi(\vec{r}, t) - (\mu_a + \mu'_s) \cdot \vec{j}(\vec{r}, t) \\ \Rightarrow \frac{1}{c} \frac{\partial \vec{j}(\vec{r}, t)}{\partial t} &= -\frac{1}{3} \vec{\nabla} \Phi(\vec{r}, t) - \frac{1}{3D} \cdot \vec{j}(\vec{r}, t) \end{aligned} \quad (\text{E.28})$$

où $D = 1/[3(\mu_a + \mu'_s)]$ représente la constante de diffusion et $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$.

Nous disposons à présent, avec les équations (E.22) et (E.28), d'un système fermé d'équations avec Φ et $\vec{j}$ que nous pouvons résoudre pour obtenir l'équation de diffusion.

En dérivant l'équation (E.22) par rapport au temps, nous obtenons :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial^2 \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t^2} + \vec{\nabla} \cdot \frac{\partial \vec{j}(\vec{r}, t)}{\partial t} = -\mu_a \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} + \frac{\partial S(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (\text{E.29})$$

En remplaçant $[\partial \vec{j}(\vec{r}, t)/\partial t]$ par son expression déduite de l'équation (E.28) :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial^2 \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t^2} - \frac{c}{3} \vec{\nabla}^2 \Phi(\vec{r}, t) - \frac{c}{3D} \vec{\nabla} \cdot \vec{j}(\vec{r}, t) = -\mu_a \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} + \frac{\partial S(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (\text{E.30})$$

En multipliant par $(3D/c)$:

$$\frac{3D}{c^2} \frac{\partial^2 \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t^2} - \vec{\nabla} \cdot \vec{j}(\vec{r}, t) - D \vec{\nabla}^2 \Phi(\vec{r}, t) = -\frac{3D\mu_a}{c} \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} + \frac{3D}{c} \frac{\partial S(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (\text{E.31})$$

En exprimant $\vec{\nabla} \cdot \vec{j}(\vec{r}, t)$ à partir de l'équation (E.22) :

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{j}(\vec{r}, t) = -\frac{1}{c} \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} - \mu_a \Phi(\vec{r}, t) + S_0(\vec{r}, t)$$

Il vient alors :

$$\frac{3D}{c^2} \frac{\partial^2 \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t^2} - D \vec{\nabla}^2 \Phi(\vec{r}, t) + \mu_a \Phi(\vec{r}, t) = -\frac{(1 + 3D\mu_a)}{c} \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} + \frac{3D}{c} \frac{\partial S(\vec{r}, t)}{\partial t} + S_0(\vec{r}, t) \quad (\text{E.32})$$

soit l'équation des télégraphes :

$$D \vec{\nabla}^2 \Phi(\vec{r}, t) - \mu_a \Phi(\vec{r}, t) = (1+3D\mu_a) \frac{1}{c} \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} - S_0(\vec{r}, t) + \frac{3D}{c^2} \frac{\partial^2 \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t^2} - \frac{3D}{c} \frac{\partial S(\vec{r}, t)}{\partial t}$$

$\Downarrow$

$$\frac{3D}{c^2} \frac{\partial^2 \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t^2} + (1+3D\mu_a) \frac{1}{c} \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} + \mu_a \Phi(\vec{r}, t) = D \vec{\nabla}^2 \Phi(\vec{r}, t) \frac{3D}{c} + \frac{\partial S(\vec{r}, t)}{\partial t} + S_0(\vec{r}, t) \quad (\text{E.33})$$

Cette équation n'est pas l'équation de la diffusion utilisée classiquement dans les problèmes de transfert radiatif et qui décrit un processus de diffusion, vérifiant la loi de Fick pour le courant :

$$\vec{j}(\vec{r}, t) = -D \vec{\nabla} \Phi \quad (\text{E.34})$$

Comparé à l'équation (E.28), la loi de Fick revient à négliger les variations temporelles du courant dans le premier terme de l'équation (E.28).

L'équation de la diffusion est obtenue en utilisant les équations (E.22) et (E.34) :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)}{\partial t} - D \vec{\nabla}^2 \Phi(\vec{r}, t) + \mu_a \Phi(\vec{r}, t) = S_0(\vec{r}, t) \quad (\text{E.35})$$

Dans le cas où la luminance est continue $\left(\frac{\partial L(\vec{r}, \vec{s})}{\partial t} = 0 \right)$:

$$\begin{cases} (\text{E.22}) \Rightarrow \vec{\nabla} \cdot \vec{j}(\vec{r}, t) = -\mu_a \phi(\vec{r}, t) + S_0(\vec{r}, t) \\ (\text{E.28}) \Rightarrow \vec{\nabla} \phi(\vec{r}, t) = -\frac{1}{D} \vec{j}(\vec{r}, t) \Rightarrow \vec{j}(\vec{r}, t) = -D \vec{\nabla} \phi(\vec{r}, t) \end{cases} \quad (\text{E.36})$$

$$\Rightarrow -D \vec{\nabla}^2 \phi(\vec{r}, t) = -\mu_a \phi(\vec{r}, t) + S_0(\vec{r}, t)$$

$$\Rightarrow \left(\vec{\nabla}^2 - \mu_{eff}^2 \right) \phi(\vec{r}, t) = \frac{\mu_{eff}^2}{\mu_a} S_0(\vec{r}, t) \quad (\text{E.37})$$

avec $\mu_{eff} = \sqrt{\frac{\mu_a}{D}}$

S'il n'y a pas de source, on a : $\vec{\nabla}^2 \phi(\vec{r}, t) = \mu_{eff}^2 \phi(\vec{r}, t)$

dont une solution est : $\phi(\vec{r}, t) = e^{-\mu_{eff} \cdot \vec{r}}$

Index

- Échographie vésicale, 17
- Éosine, 109
- Équation de Helmholtz, 82
- Équation de transfert radiatif, 71, 89
- Équations de Maxwell, 71, 81

- Absorbance, 79
- Absorption, 71
 - coefficient d', 78–80
 - libre parcours moyen d', 79
- Adventice, 119
- Analyse en composantes principales, 155
- Angle
 - azimuthal, 95
 - déflexion, 95
- Anisotropie, 87
- Apoptose, 6
- Approximation de la diffusion, 91, 203–205
- Artères
 - composition pariétale, 118
 - histologie, 118

- Biopsie optique, 10

- Cancer, 5–9
 - cancer invasif, 8
 - carcinome *in situ*, 7
 - dysplasie, 7
 - hyperplasie, 7
 - tumeur bénigne, 6
 - tumeur maligne, 6
- Classification, 155, 165
 - non supervisée, 156
- Coefficient d'atténuation de transport, 88
- Coefficient d'extinction effective, 87
- Coefficient total d'extinction, 84
- Contrainte, 121
- Courbe ROC, 12
- Cryoconservation, 121
- Cryptocyanine, 109
- Culture cellulaire, 150

- Cystoscopie, 17
- Cytologie urinaire, 17
- Cytométrie de flux, 17

- Déformation, 120
- Dépistage, 9, 18
- Degré de pénétration, 15
- Densité optique, 79
- Diagnostic, 9
- Diagramme de Jablonsky, 38
- Diffusion, 71, 80
 - coefficient de, 84
 - coefficient de diffusion réduit, 87
 - de Mie, 81, 82
 - indicatrice de, 85
 - libre parcours moyen de, 84
 - optique géométrique, 81
 - Rayleigh, 81

- ECBU, 17
- Encre de chine, 109

- Fenêtre optique, 80
- Fluorescéine, 109
- Fluorophore, 40
 - endogène, 39
 - exogène, 39
- Flux lumineux, 89
- Flux radiant, 89
- Fonction d'amplitude, 83
- Fonction de Bessel, 83
- Fonction de distribution cumulative, 94
- Fonction de phase, 85
 - Heney-Greenstein, 86, 95, 98
 - Mie, 86
 - Rayleigh, 85
- Formule de Fresnel, 99
- Formule de Planck, 88

- Grade tumoral, 14, 17

- Hémoglobine, 80

- Imagerie endoscopique de fluorescence, 23
- Imagerie multi ou hyper-spectrale, 20, 23
- Imagerie optique, 20, 21
 - FOCI, 23
 - OCT, 21
 - TOD, 23
- Incompressibilité, 120
- Indice de réfraction, 75
- Induction tumorale, 151
- Injection de la lumière, 60
- Intensité radiante, 89
- Intima, 119
- Intralipides, 109
- Laparotomie, 152
- Loi de Beer-Lambert, 79
- Lumière, 18
- Luminance, 89
- Média, 119
- Maquette de diffusion élastique, 52
- Marqueurs immunocytologiques, 17
- Milieu
 - homogène, 70
 - isotrope, 70
- Monte Carlo, 92–100
 - applications, 93
 - distance entre les événements, 95
 - pas, 95
 - poids d'un photon, 94, 98
 - principe, 94
- Onde plane, 73
- Paroi vésicale
 - adventice, 13
 - muqueuse, 13
 - musculaire lisse, 13
 - séreuse, 13
 - sous-muqueuse, 13
- Photon
 - balistique, 70
 - multidiffusé, 70
 - serpente, 70
- Polynôme de Legendre, 83
- Réflexion, 77, 99
- Réfraction, 75, 99
 - indice de, 35, 72, 75, 76, 78, 108, 130, 197
 - indice de réfraction complexe, 73
- Résection endoscopique, 17
- Résection transurétrale, 18
- Radiance, 89
- Radiance spectrale, 89
- Relation constitutive, 72
- Relaxation, 121
- Scanner, 17
- Sensibilité, 10, 11, 17, 21, 167
- Simplexe, 141
- Sonde à fibres optiques, 55
- Spécificité, 10, 11, 17, 21, 167
- Spectre électromagnétique, 18
- Spectrofluorimètre portable, 49
- Spectromètre
 - Jobin Yvon CP200, 49
 - Jobin Yvon iHR320, 66
 - USB2000, 50
- Spectroscopie tissulaire, 10, 20
 - fluorescence intrinsèque, 154, 164
 - spectroscopie d'autofluorescence, 21, 38–45, 55, 134–136, 158
 - spectroscopie de diffusion élastique, 21, 32–37, 137–139
 - spectroscopie de réflectance diffuse, 56, 161
 - spectroscopie multi-modalités, 45, 56
 - spectroscopie résolue dans le domaine fréquentiel, 20
 - spectroscopie résolue dans le temps, 20
 - spectroscopie résolue spatialement, 20
 - spectroscopie Raman, 21, 29–32
- Système de réception, 63
- Théorie de Kubelka-Munk, 91, 205–206
- Transmittance, 79
- Valeur prédictive, 10
 - négative, 11
 - positive, 11
- Vecteur de Poynting, 74
- Vessie, 12
 - Cancer, 12
 - classification TNM, 14, 15
 - Paroi vésicale, 13
 - Système urinaire, 12
- Viscoélasticité, 121
- Vitesse de phase, 74

Résumé

L'objectif de ce travail de recherche est le développement, la mise au point et la validation d'une méthode de spectroscopie multi-modalités en diffusion élastique et autofluorescence pour caractériser des tissus biologiques *in vitro* et *in vivo*. Ces travaux s'organisent en quatre axes.

La **première partie des travaux** présente l'instrumentation : développement, réalisation et caractérisation expérimentale d'un système de spectrométrie bimodale multi-points fibrée permettant l'acquisition de spectres *in vivo* (distances variables, acquisition rapide).

La **deuxième partie** porte sur la modélisation des propriétés optiques du tissu : développement et validation expérimentale sur fantômes d'un algorithme de simulation de propagation de photons en milieux turbides et multi-fluorescents.

La **troisième partie** propose une étude expérimentale conduite *ex vivo* sur des anneaux artériels frais et cryoconservés. Elle confirme la complémentarité des mesures spectroscopiques en diffusion élastique et autofluorescence et valide la méthode de spectroscopie multi-modalités et l'algorithme de simulation de propagation de photons. Les résultats originaux obtenus montrent une corrélation entre propriétés rhéologiques et optiques.

La **quatrième partie** développe une seconde étude expérimentale *in vivo* sur un modèle pré-clinique tumoral de vessie. Elle met en évidence une différence significative en réflectance diffuse et/ou en autofluorescence et/ou en fluorescence intrinsèque entre tissus sains, inflammatoires et tumoraux, sur la base de longueurs d'onde particulières. Les résultats de la classification non supervisée réalisée montrent que la combinaison de différentes approches spectroscopiques augmente la fiabilité du diagnostic.

Mots-clés: biopsie optique, spectroscopie multi-modalités, autofluorescence, diffusion multiple, instrumentation, modélisation Monte Carlo, diagnostic *in vivo*, cancer.

Abstract

This research activity aims at developing and validating a multimodal spectroscopy method in elastic scattering and autofluorescence to characterize biological tissues *in vitro* and *in vivo*. It is articulated in four axes.

At first, instrumentation is considered with the development, the engineering and the experimental characterization of a fibers bimodal, multi-points spectrometry system allowing the acquisition of spectra *in vivo* (variable distances, fast acquisition).

Secondly, the optical properties of tissues are modelled with the development and the experimental validation on phantoms of a photons propagation simulation algorithm in turbids media and multi-fluorescent.

Thirdly, an experimental study has been conducted *ex vivo* on fresh and cryopreserved arterial rings. It confirms the complementarity of spectroscopic measurements in elastic scattering and autofluorescence, and validates the method of multi-modality spectroscopy and the simulation of photons propagation algorithm. Results have well proved a correlation between rheological and optical properties.

Finally, one second experimental study *in vivo* related to a pre-clinical tumoral model of bladder has been carried out. It highlights a significant difference in diffuse reflectance and/or autofluorescence and/or intrinsic fluorescence between healthy, inflammatory and tumoral tissues, on the basis of specific wavelength. The results of not supervised classification show that the combination of various spectroscopic approaches increases the reliability of the diagnosis.

Keywords: optical biopsy, multi-modal spectroscopy, autofluorescence, multiple diffusion, instrumentation, Monte Carlo simulation, *in vivo* diagnostic, cancer.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Anne HUMEAU, Professeur, Groupe ISAIP-ESAIP, St Barthélémy d'Anjou

Monsieur Hervé SAINT-JALMES, Professeur, UCB Lyon1, ESCPE, Villeurbanne

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame PERY Emilie

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Spectroscopie bimodale en diffusion élastique et autofluorescence résolue spatialement :
instrumentation, modélisation des interactions lumière-tissus et application à la
caractérisation de tissus biologiques *ex vivo* et *in vivo* pour la détection de cancers"**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Automatique et traitement du signal** »

Fait à Vandoeuvre, le 16 octobre 2007

Le Président de l'IN.P.L.,

F. LAURENT

