



HAL
open science

Caractérisation de tissus cutanés superficiels hypertrophiques par spectroscopie multimodalité in vivo : instrumentation, extraction et classification de données multidimensionnelle

Honghui Liu

► **To cite this version:**

Honghui Liu. Caractérisation de tissus cutanés superficiels hypertrophiques par spectroscopie multimodalité in vivo : instrumentation, extraction et classification de données multidimensionnelle. Ingénierie biomédicale. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : . tel-00745202

HAL Id: tel-00745202

<https://theses.hal.science/tel-00745202>

Submitted on 24 Oct 2012

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

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

**Caractérisation de tissus cutanés cicatriciels
hypertrophiques par spectroscopie multi-modalités *in vivo* : instrumentation, extraction et classification de données
multi-dimensionnelles**

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 18 avril 2012

pour l'obtention du

Doctorat de l'Université de Lorraine

Spécialité Automatique, Traitement du Signal et des Images, Génie Informatique

par

Honghui LIU

Composition du jury

<i>Rapporteurs :</i>	Franck Marzani	Le2i-CNRS, Dijon
	Anne Humeau-Heurtier	LISA, Angers
<i>Examineurs :</i>	Geneviève Bourg-Heckly	Laboratoire, Jean Perrin, UPMC, Paris 6
	Walter C.P.M. Blondel	CRAN, Nancy
	François Guillemin	CRAN, Centre Alexis Vautrin, Nancy
<i>Invité :</i>	Héloïse Gisquet	CHU, 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**.

Tout d'abord, je me tiens à remercier **La Région Lorraine** et **Centre Alexis Vautrin** pour leur "générosité". Sans leur financement, la présente thèse n'aurait jamais eu lieu.

J'exprime ensuite mes profonds remerciements à mon directeur de thèse **Monsieur le Professeur Walter BLONDEL** pour m'avoir encadré en donnant beaucoup d'assistance et de conseils précieux tant du côté professionnelle que personnelle. Monsieur Blondel, je vous avais côtoyé depuis mon master en GBM à Faculté de Médecine. Pour plus de 4 ans, vous m'avez appris beaucoup de choses comme un prof, un directeur de recherche et un ami. Je vous remercie également pour votre patience et surtout votre confiance sur mon travail qui m'a permis ainsi d'évoluer mes compétences et le sens d'autonomie.

Je tiens également à remercier **Monsieur le Professeur François GUILLEMIN** d'avoir accepté de co-diriger ma thèse, ainsi que pour ses soutiens qui m'ont permis de mener à bien mon projet doctoral.

Je remercie aussi les membres du jury : **Madame le Professeur Anne HUMEAU**, **Monsieur le Professeur Franck Marzani** et **Madame Geneviève BOURG-HECKLY**, pour l'intérêt et le temps qu'ils ont consacré à évaluer mes travaux de recherche, ainsi que pour les remarques qu'ils ont apportés sur le manuscrit et la soutenance.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance et ma sympathie à tous ceux qui m'ont aidé au cours de ces années et contribué à la réalisation de la présente thèse, plus particulièrement :

Madame la Docteur Héloïse Gisquet, j'ai eu la chance de collaborer avec toi pendant la première année de ma thèse, notamment au sujet de l'expérimentation sur les cicatrices hypertrophiques. Je te remercie pour toutes les contributions que tu as apporté sur la partie expérimentale de ma thèse. Ton efficacité et ta rigueur assure la bonne organisation de nos manipulations. Je te remercie également pour la grande enthousiasme de ta famille lors de la rencontre. J'ai un grand plaisir de vous avoir fait la connaissance.

Messieurs Christian Daul et Ernest Galbrun, je vous adresse ma gratitude pour le temps que vous m'avez consacré pour les répétitions de soutenance. Vos expériences et conseils m'ont permis de bien gérer le trac pendant la soutenance et de faire une présentation splendide.

Monsieur le Docteur Randu Ratu, je vous remercie pour votre gentillesse. Il est toujours intéressant de faire des échanges scientifiques et conversation avec vous.

Monsieur le Docteur Dominique DUMAS qui a participé à la réalisation des images en microscopie confocale, et à **Madame Anne-Laure LEBLANC** pour son efficacité au sein de l'animalerie. Sans oublier **Le Docteur Agnès LEROUX et ses collaborateurs** du service d'Anatomie Pathologique du **Centre Alexis Vautrin** qui donnent leur soutien technique lors de

la réalisation des coupes histologiques.

Mes remerciements très chaleureux vont aussi à de nombreuses personnalités :

Monsieur le Docteur Jacques DIDELON, merci de m'avoir donnée une opportunité de faire un stage avec vous à l'IMAC pendant la formation Master. Votre conseil m'a amené décisivement dans les terrains de recherche et encouragé à faire une thèse qui apportera forcément plein de richesse et de bonheur dans ma vie.

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

Madame Christine Pierson et Madame Carole Courier, secrétaires du CRAN qui s'occupent administrativement de moi pendant 4 ans et m'ont fourni beaucoup de soins et d'assistance.

Je remercie aussi tous mes amis et collègues dans le laboratoire, **Ricardo, Christophe, Grace, Achraf, Thomas, Marine, Gilberto, Carlos, Ebrahime, Vanessa, Julien, Yanis, Varis, Guntars, Khadidja, Hecene, etc.** , pour leur constance de soutien moral. J'apprécie énormément les moments sympas que nous avons vécu ensemble pendant ces quelques années. Votre camaraderie a rendu l'atmosphère générale du laboratoire des plus agréables. Cette atmosphère fut propice à un plaisir indispensable pour venir au travail chaque jour L'amitié avec vous est une aubaine que j'ai apporté en plus de mon titre doctorat. Je souhaite sincèrement une bonne continuation pour vous tous et une autre rencontre quelque jour et quelque part dans le future.

Enfin, mes remerciements les plus chaleureux à mes **parents** pour leur soutien pendant toute la durée de mes études.

À mes parents,

Table des matières

Table des figures	ix
Liste des tableaux	xiii
Liste des acronymes	xv
Nomenclature	xvii
Introduction	1
Chapitre 1 Contexte de l'étude et problématique scientifique	3
1.1 Préambule	3
1.2 Photodiagnostic tissulaire et problématique clinique	5
1.2.1 Contexte scientifique	5
1.2.1.1 Optique biomédicale	5
1.2.1.2 Interactions lumière-tissus biologiques	6
1.2.2 Contexte clinique : dermatologie	13
1.2.3 La peau : description histologique et propriétés optiques	14
1.2.3.1 Epiderme	14
1.2.3.2 Derme	17
1.2.3.3 Hypoderme	18
1.2.4 Hypertrophie cutanée	19
1.2.4.1 Epidémiologie et causes	19
1.2.4.2 Physiopathologie	21
1.2.4.3 Diagnostic	21
1.3 Méthodes de spectroscopie point par point appliquées au diagnostic tissulaire <i>in vivo</i>	24
1.3.1 Spectroscopie d'autofluorescence	27
1.3.1.1 Fluorophores endogènes des tissus biologiques	28
1.3.1.2 Avantages et limites des méthodes existantes	29

1.3.2	Spectroscopie de diffusion simple	32
1.3.2.1	Principe	32
1.3.2.2	Avantages et limites	33
1.3.3	Spectroscopie de Réflectance Diffuse	34
1.3.3.1	Principe	34
1.3.3.2	Exploitation des données et applications	35
1.3.4	Approches de spectroscopies multi-modalités	36
1.4	Objectifs des travaux de thèse	38
1.4.1	Développement instrumental	38
1.4.2	Validation expérimentale	39
1.4.3	Traitement des signaux et des données	39
Chapitre 2 Développement Instrumental		41
2.1	Etat de l'art des solutions technologiques pour les systèmes de spectroscopie optique fibrée <i>in vivo</i>	41
2.1.1	Sources d'excitation	42
2.1.1.1	Excitations simple et multiple pour l'autofluorescence	42
2.1.1.2	Excitation pour réflectance diffuse	44
2.1.1.3	Sources d'excitation multi-modalité	45
2.1.2	Sondes fibrées	45
2.1.2.1	Spectroscopie de réflectance diffuse	46
2.1.2.2	Spectroscopie d'autofluorescence	47
2.1.3	Systèmes d'acquisition spectroscopique	48
2.2	Instrumentation existante	49
2.2.1	Cahier des charges pour la poursuite du développement instrumental	53
2.2.1.1	Puissance d'excitation pour l'autofluorescence	53
2.2.1.2	Excitation large bande pour réflectance diffuse	53
2.2.1.3	Automatisation complète des mesures	54
2.2.1.4	Objectifs de développement	54
2.3	Travaux réalisés : améliorations apportées sur le système instrumental	56
2.3.1	Optimisation de la puissance de lumière incidente (sur le tissu)	56
2.3.2	Solution technique pour une bande d'excitation unique en RD	59
2.3.3	Solution logicielle pour une Interface utilisateur unique	59
2.3.4	Intégration du système et rack transportable	60
2.4	Caractérisation métrologique et calibrage de l'instrumentation	60
2.4.1	Etalonnage du détecteur en longueur d'onde	63
2.4.2	Correction de la réponse spectrale du système	63

2.4.3	Normalisation de la puissance de la source d'excitation	65
2.5	Conclusion du chapitre	65
Chapitre 3 Étude préclinique <i>in vivo</i> sur tissus hypertrophiques		69
3.1	Modèle préclinique de cicatrice cutanée hypertrophique	69
3.1.1	Choix du modèle	69
3.1.1.1	Modèles <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	70
3.1.1.2	Modèles <i>in vivo</i>	70
3.1.2	Technique d'induction de cicatrice hypertrophique	71
3.1.3	Mise au point du modèle et du protocole	72
3.1.3.1	Etude préliminaire et validation du modèle	72
3.1.3.2	Difficultés liées aux mesures spectroscopiques	73
3.2	Expérimentation	75
3.2.1	Organisation des expérimentations	75
3.2.2	Mesures spectroscopiques	76
3.3	Analyses histologiques	78
3.3.1	Matériels et méthodes	78
3.3.2	Résultats	78
3.4	Conclusion	80
Chapitre 4 Sélection et classification de données spectroscopiques		83
4.1	Etat de l'art sur le traitement des données spectroscopiques en vue d'une classification tissulaire	83
4.1.1	Prétraitement des spectres	85
4.1.2	Classification	86
4.1.2.1	Jeux de données d'apprentissage	87
4.1.2.2	Extraction de caractéristiques	88
4.1.2.3	Sélection de caractéristiques discriminantes	95
4.1.2.4	Méthodes de Classification (supervisée)	99
4.2	Solutions méthodologiques développées	109
4.2.1	Présentation des données spectrales	109
4.2.2	Algorithme de prétraitement	110
4.2.3	Extraction/Sélection des caractéristiques discriminantes pour la classification	116
4.2.3.1	Solution précédente et problèmes posés	116
4.2.3.2	Solution développée pour notre étude	117
4.2.4	Classification supervisée	122
4.3	Résultats et Discussion	123

4.3.1 Performances comparées des différents classifieurs testés	123
4.3.2 Classification combinée et fusion de décision	127
4.4 Conclusion et perspectives	128
Conclusion générale et Perspectives	131
Bibliographie	135
Annexe A Spectre d'intensité de la lampe de calibrage	147
Annexe B Rappel des caractéristiques spectrales extraites et composantes principales utilisées pour la classification (l'étude de [Diaz, 2009])	149

Table des figures

1.1	Schéma du principe de réflexion/réfraction (Loi de Snell-Descartes)	7
1.2	Coefficients d’extinction en fonction de la longueur d’onde pour les principaux chromophores de la peau	9
1.3	Coefficients d’extinction en fonction de la longueur d’onde pour les principaux chromophores de la peau	10
1.4	Diagramme de Jablonsky simplifié	10
1.5	Illustration de la structure de la peau humaine	14
1.6	Schéma de la structure de l’épiderme	15
1.7	Spectres de coefficient d’extinction molaire pour les deux types de mélanine dans la peau humaine	16
1.8	Image d’une coupe histologique du derme	18
1.9	Représentation schématique montrant les profondeurs de pénétration de la lumière en fonction des longueurs d’onde au sein des différentes couches cutanées.	19
1.10	Photographes d’exemples de cicatrice hypertrophique et de chéloïde	20
1.11	Images de coupes histologiques de peau saine et de peau cicatricielle hypertrophique prélevées sur des oreilles de lapin dans le cadre de notre étude pré-clinique	22
1.12	Exemple de 4 courbes de ROC	24
1.13	Représentation schématique des principaux éléments constitutifs d’un système de spectroscopie fibré solue spatialement	25
1.14	Schéma illustrant les multiples zones d’exploration permises par l’utilisation de plusieurs distances interfibres	26
1.15	Spectres d’absorption et d’émission de quelques fluorophores endogènes	31
1.16	Efficacité de diffusion pour les phères de polymère de 1 et $2\mu m$ de diamètre	33
2.1	Exemple de spectres d’intensité d’émission par sources LEDs	43
2.2	Exemple de spectre d’intensité caractéristique d’une lampe mercure-argon	44
2.3	Présentation schématique de la distribution spatiale des photons (“Banana Shape”) dans un milieu semi-infini	46
2.4	Représentation schématique de la configuration Fastie Ebert	49
2.5	Diagramme de la configuration Czerny Turner	49
2.6	Représentation schématique illustrant la formation des images spectrales pour trois fibres réceptrices et le découpage en zone de la matrice CCD.	50
2.7	Représentation schématique de l’ancien système spectroscopique bimodal réalisé pour une étude en tissu cancéreux de la vessie	51
2.8	Représentation schématique de l’instrumentation développée pour la spectroscopie bimodale	51

2.9	Schéma de la disposition géométrique des fibres à l'extrémité de la sonde utilisée par [Diaz, 2009]	52
2.10	Exemple de 3 profils d'intensité spectrale combinés pour la mesure spectroscopique en RD	54
2.11	Schéma-bloc illustrant le fonctionnement pour le système développé par [Diaz, 2009]	55
2.12	Spectres d'intensité des lampes Xénon testées	56
2.13	Schéma illustrant la partie d'injection de lumière de la source dans la fibre optique d'excitation à l'aide d'ancienne lentille	57
2.14	Schéma illustrant la partie d'injection de lumière d'excitation après remplacement de lentille	58
2.15	Schéma technique de la nouvelle sonde fibrée	58
2.16	Photographie de l'extrémité distale de la sonde multi-fibres	59
2.17	Schéma-bloc illustrant le fonctionnement pour le nouveau système développé	61
2.18	Exemple de contenu d'un fichier de configuration pour le programme développé	62
2.19	Photographie des parties du système avant leur intégration	62
2.20	Photographies des parties du système après leur intégration dans un rack transportable	63
2.21	Principe de la correction par rapport à la réponse spectrale non-linéaire du système, appliquée à chaque voie (fibre) de mesure	64
2.22	Exemple de facteurs de correction de la réponse spectrale obtenus à l'excitation de 360nm	65
2.23	Courbes typiques moyenne , minimale et maximale de variation de la puissance relative au cours du temps d'utilisation de la lampe Xénon 300W	66
3.1	Photographie de plaies réalisées sur la face ventrale d'une oreille de lapin sous anesthésie générale	72
3.2	Photographie d'un exemple de cicatrice hypertrophique 28 jours après le prélèvement	72
3.3	Schéma représentant les épaisseurs mesurées pour le calcul de l'indice d'élévation cicatricelle	73
3.4	Pièces accessoires utilisées pour l'expérimentation	74
3.5	Organisation chronologique de l'expérimentation	76
3.6	Image illustrant les parties du système après l'intégration dans un rack transportable	79
3.7	Images des coupes illustrant la Densité Cellulaire pour les tissus sain, cicatriciel hypertrophique et cicatriciel normal	80
4.1	Organigramme des fonctions de prétraitement implémentées pour nos spectres d'intensité d'autofluorescence	86
4.2	Schéma illustrant la projection des données caractéristiques sur l'axe d'une composante principale	89
4.3	Interprétation géométrique des corrélations des variables	95
4.4	Schéma-bloc simple de la méthode "filter"	96
4.5	Schéma-bloc de la méthode "wrapper" qui utilise le résultat obtenu par l'algorithme de classification pour évaluer l'optimalité des caractéristiques	98
4.6	Explication géométrique de l'approche d'ADL	100
4.7	Distributions de deux classes de données en fonction de leur variance et covariance	102
4.8	Exemple de classification k-ppv d'un objet S	103
4.9	Représentation schématique de la structure d'un neurone artificiel	104
4.10	Structure de réseau neuronal à 3 couches	105

4.11	Organisation de nos données spectrales dans une matrice 3D M_i	109
4.12	Parties constitutives d'une courbe typique de spectre d'autofluorescence excité à $440nm$	112
4.13	Comparaison des spectres avant et après la suppression d'artéfact par un filtre de médian	113
4.14	Exemple de spectres erronés	114
4.15	Comparaison de spectres avant et après le lissage par un filtre polynomial	115
4.16	Comparaison de spectres avant et après la correction spectrale	116
4.17	Comparaison des formes entre les spectres normal et aberrant mesurés dans cette étude	118
4.18	Comparaison des variations spectrales (écart-type) entre les individus hypertrophique et non-hypertrophique	120
4.19	Comparaison par morceaux des spectres moyens (excités à $360nm$ et mesurés au 5^{ime} <i>CEFS</i>) pour les tissus HT et NHT	121
4.20	Schéma illustrant la méthode de comparaison des efficacités en termes de classification entre deux caractéristiques quelconques	121
4.21	Schéma illustrant les profondeurs d'exploration permises par les <i>CEFS</i> $440\mu m$ et $670\mu m$ pour une excitation de $420nm$, en correspondance avec les épaisseurs moyennes \pm EC des couches explorées pour les tissus cutanés (sains, cicatriciels hypertrophiques et non-hypertrophiques) de notre étude	126
A.1	Spectre étalon de la lampe de calibrage (DH 2000-CAL, Ocean Optics).	148

Liste des tableaux

1.1	Indices de réfraction mesurées <i>ex vivo</i> par réfractomètre pour différentes couches cutanées dans le corps humain [Ding <i>et al.</i> , 2006]	8
1.2	Définition des caractéristiques d'un test de dépistage	23
1.3	Pics de longueurs d'onde d'excitation et d'émission des principaux chromophores et fluorophores endogènes des tissus biologiques	30
1.4	Performance de différentes techniques spectroscopiques pour la classification des tissus lésionaux et sains dans l'oesophage de Barret	37
1.5	performance des différentes techniques spectroscopiques pour séparer les SIL de non-SIL	37
2.1	Caractéristiques techniques du système d'acquisition spectroscopique	53
2.2	Comparaison de puissance P à la sortie de fibre d'excitation avant et après les modifications apportées	59
3.1	Paramètres utilisés pour la mesure spectroscopique <i>in vivo</i>	77
3.2	Nombre de cicatrices hypertrophiques apparues dans l'étude	78
3.3	Nombre de cicatrices hypertrophiques apparues dans l'étude	79
3.4	Nombre de cicatrices hypertrophiques apparues en fonction du site anatomique	80
4.1	Valeurs de S_e et S_p obtenues pour les caractéristiques sélectionnées en utilisant classifieur k-ppv avec valeur de k différentes.	123
4.2	Caractéristiques sélectionnées pour la classification finale	124
4.3	Performance générale des 3 méthodes testées pour la classification des tissus hypertrophiques et non-hypertrophiques	124
4.4	Rappel des pics et bandes spectrales d'émission de plusieurs fluorophores rapportés dans les études sur la peau pour les longueurs d'onde d'excitation liées à nos caractéristiques extraites	125
4.5	Valeurs moyennes de sensibilité et de spécificité obtenues pour les 3 méthodes de classification en utilisant toutes les caractéristiques optimales ou seulement les caractéristiques communes	127
B.1	Caractéristiques extraites des spectres pour chaque excitation en autofluorescence et des spectres en RD dans l'étude de [Diaz, 2009]	150
B.2	Nombre de caractéristiques finalement retenues après la méthode de sélection dans l'étude de [Diaz, 2009]	151
B.3	Nombre de composantes principales (CPs) utilisées pour la classification dans l'étude de [Diaz, 2009]	151

Liste des acronymes

ACP Analyse en Composantes Principales ou « Principal Component Analysis », PCA

ADL Analyse Discriminante Linéaire ou « Linear Discriminant Analysis », LDA

AF Autofluorescence

B classe des tissus Bénins

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

CIS Carcinome *In Situ* ou carcinome intra-épithélial

DBG Dysplasie de Bas Grade

DEL Diode Electroluminescente

DHG Dysplasie de Haut Grade

FAD « Flavine Adenine Dinucleotide »

FCTB Facteur de Croissance Transformant Beta ou « Transforming Growth Factor beta »,
(*TGF* – β)

FOLV Filtre Optique Linéairement Variable

FP Faux Positif

FN Faux Négatif

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

H classe de tissus Hypertrophiques

Hb Désoxy-hémoglobine

HbO₂ Oxy-hémoglobine

IEC Indice d'Elevation Cicatricielle

IMC Imagerie Microscopique Confocale

IR InfraRouge

k-ppv k-plus proches voisins ou « k Nearest Neighbour », (k-NN)

LASER « Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation » ou Amplification de la
Lumière par Emission Stimulée de Rayonnement, (ALESR)

- LIE** Lésion Intraépithéliale Epidermoïde ou « Squamous Intraepithelial Lesion », (SIL)
- ME** Métaplasie Epidermoïde ou « Squamous Metaplasia », (SQM)
- NADH** reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen
- NADPH** reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen
- NEE** tissu Normal Epidermoïde Exocervicale ou « Normal Squamous Ectocervical », (NSE)
- ND** classe de tissus Non-Dysplasiques
- NH** classe de tissus Non-Hypertrophiques
- NIR** « Near InfraRed » ou Proche InfraRouge
- ON** Ouverture Numérique ou « Numerical Aperture »
- RD** Réflectance Diffuse ou DR Diffuse Reflectance
- ROC** « Receiver Operating Characteristic » ou courbe caractéristique d'efficacité
- RSB** Rapport Signal sur Bruit ou SNR « Signal to Noise Ratio »
- SAF** Spectroscopie d'Autofluorescence
- SDE** Spectroscopie de Diffusion ou Élastique« Elastic Scattering Spectroscopy », (ESS)
- SDS** Spectroscopie par Diffusion Simple ou « Light Scattering Spectroscopy »(LSS)
- Se** Sensibilité ou « Sensitivity »
- Sp** Spécificité ou « Specificity »
- SRD** Spectroscopie Réflectance Diffuse ou DRS « Diffuse Reflectance Spectroscopy »
- STM** Spectroscopie Trimodale ou « Trimodal Spectroscopy »(TMS)
- SVM** Séparateur à Vaste Marge ou « Support Vector Machine »(ou Machine à Vecteur de Support (MVS))
- TCO** Tomographie de Cohérence Optique ou « Optical Coherence Tomography »(OCT)
- TOD** Tomographie Optique en Diffusion ou « Optical Diffusion Tomography »(ODT)
- TOF** Tomographie Optique en Fluorescence ou « Optical Fluorescence Tomography »(OFT)
- PDT** « Photodynamic Therapy » ou Thérapie PhotoDynamique (TPD)
- UV** UltraViolet
- VP** Vrai Positif
- VPP** Valeur Prédicative Positive
- VPN** Valeur Prédicative Négative
- VN** Vrai Négatif

Nomenclature

Grandeurs

A	Absorbance
c_0	Célérité de la lumière dans le vide, 3.10^8 m.s^{-1}
$[C]$	Concentration molaire, mol.L^{-1}
d	Diamètre, mm
E	Énergie, J
F_r	Fibre réceptrice
F_x	Fibre excitatrice
g	Facteur d'anisotropie
h	Constante de Planck, $6,64.10^{-34} \text{ J.s}$
I	Intensité lumineuse, W.sr^{-1}
L	Longueur, mm
$LISR$	Logarithme Inverse du Spectre de Réflectance
N	Nombre d'unités ou d'évènements
n	Indice de réfraction
n_i	Indice de réfraction du milieu du faisceau incident
n_t	Indice de réfraction du milieu du faisceau transmis
p	Probabilité
R	Coefficient de réflexion
$R(\lambda)$	Réflectance
$R_{I_{615}/I_{565}}$	Rapport d'intensité spectrales à 615 nm à 565 nm
r	Rayon, mm
r_{sd}	Distance entre fibre d'excitation et de réception, mm
S_0	Etat fondamental d'une molécule
S_1	Etat substable d'une molécule
S_2	Etat excité d'une molécule fluorescente.
s	Facteur de dilatation d'une fonction d'ondelette
t	Durée, ms
V	Volume, m^3
v	vitesse, m.s^{-1}
w_d	poids de calcul
z	Coordonnée spatiale suivant la direction de profondeur
z_o	distance d'extrapolation

Symboles grecques

Nomenclature

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
ϕ	Rendement quantique de la fluorescence
ρ	Densité volumique de particules, cm^{-3}
τ	Durée de vie de fluorescence ou Facteur de translation d'une fonction d'ondelette
σ_{eff}	Section efficace de diffusion
θ_c	Angle critique au delà duquel la transmission n'est plus possible
θ_i	Angle d'incidence formé entre la normale à l'interface et le rayon incident
θ_r	Angle de réflexion formé entre la normale à l'interface et le rayon réfléchi
$\theta_{r'}$	Angle de réfraction formé entre la normale à l'interface et le rayon réfracté
ξ, ξ_1, ξ_2	Fonction Transformation liées à chaque neurone artificiel

Indices

<i>abs</i>	d'absorbtion ou absorbé(e)
<i>calc</i>	Calculé(e)
<i>calib</i>	Calibré(e)
<i>em</i>	d'émission ou émis(e)
<i>ex</i>	d'excitation
<i>o</i>	d'origine
<i>mes</i>	mesuré(e)
<i>ref</i>	référentiel(le)
φ	Un milieu optique

Notations mathématiques

\bar{x}	moyenne de variable
$\psi_{s,\tau}(t)$	Fonction d'Ondelette
$\psi_{m,n}[t]$	Fonction d'Ondelette Discrète
$\varrho[t]$	Coefficient d'ondelette

Introduction

Au cours des vingt dernières années, la spectroscopie tissulaire est devenue une méthode diagnostique de plus en plus importante dans le domaine biomédical. Le principe de cette technique dite de " biopsie optique " repose sur l'exploitation des interactions entre la lumière et le tissu biologique, qui concernent principalement l'absorption, la fluorescence et la diffusion élastique des photons. Cette méthode consiste à faire l'analyse des mesures spectrales de ces interactions lumière-tissu, associées aux différentes conditions biologiques ou pathologiques, afin d'en extraire des informations (biochimiques et/ou structurales) intéressantes pour le diagnostic, notamment de cancers. L'intérêt clinique de l'approche spectroscopique provient de la nature non-ionisante de la lumière utilisée, du caractère non-traumatique (non-invasif) de la mesure, de sa grande sensibilité [Valette, 2002], ainsi que de sa capacité de mise en oeuvre *in vivo*, en clinique, au moyen de systèmes à fibres optiques. La plus développée jusqu'à présent, la Spectroscopie d'Autofluorescence (SAF) présente une grande sensibilité à la composition biochimique des tissus, lié au développement précoce de pathologies. La Spectroscopie de Réflectance Diffuse (SRD), malgré une moindre spécificité de mesure, nécessite des instruments plus simples et faciles à mettre en oeuvre pour la clinique. Par ailleurs, comparée à la technique d'AF, le temps nécessaire pour la mesure en RD est plus court, et le rapport signal sur bruit(RSB) est bien meilleur.

Les spectres mesurés par ces deux méthodes spectroscopiques portent des informations liées respectivement à la nature biochimique et morphologique du tissu. L'objectif est alors de rechercher les déformations significatives de ces spectres en lieu avec la progression pathologique des tissus afin de faire la distinction entre les tissus normaux et ceux pathologiques. Un grand nombre d'études dans la littérature montrent que la combinaison de ces informations complémentaires (AF et RD) peut augmenter la sensibilité et la spécificité du diagnostic et donc sa fiabilité.

Le sujet d'étude de cette thèse est donc le développement d'une méthode spectroscopique bimodale pour la caractérisation des tissus biologiques *in vivo*. Cette étude multidisciplinaire concerne des tâches liées à :

- **l'instrumentation** : conception d'un système de spectroscopie bimodale (autofluorescence et diffusion élastique) fibrée, résolue spatialement pour des expérimentations tissulaires *in vivo* ;
- **l'expérimentation** : mise en place d'un modèle préclinique et validation d'un protocole expérimental de mesures ;
- **le traitement de signaux** : développement méthodologique pour corriger et débruiter les spectres ;
- **le traitement de données** : extraction de signatures spectrales discriminantes ; sélection de caractéristiques et adaptation de méthodes de classification adéquates pour nos jeux de données (faible taille d'échantillon).

Le premier chapitre de cette thèse présente un état de l'art en spectroscopie multi-modalités. Nous considérons tout d'abord les spectroscopies d'autofluorescence et de réflectance diffuse, ainsi que les avantages et limites liés respectivement à ces méthodes. Ensuite, les principales études menées sur la spectroscopie multimodale sont présentées. Les difficultés techniques et méthodologiques utilisés sont présentées, afin d'énoncer les objectifs de nos travaux.

Dans le chapitre 2, après une présentation du système d'instrumentation existant, plusieurs éléments de réflexion et d'action sont explicités sur l'amélioration technique (matériel et logicielle) et des performances du système existant. Les étapes méthodologiques sont décrites à la fin du chapitre. Les résultats de mesure obtenus par ces procédures sont importants pour la correction spectrale mentionnée plus loin au chapitre 4.

L'étude expérimentale sur tissus hypertrophiques *in vivo* est présentée au chapitre 3, avec des informations détaillées sur le contexte clinique, sur le modèle préclinique adopté, ainsi que sur le protocole expérimental.

Au début du chapitre 4, les méthodes de traitement de données spectroscopiques utilisées dans la littérature sont recensées. A partir d'une part, des problèmes à résoudre qui y sont mentionnés pour la classification spectroscopique et d'autre part, compte tenu des spécificités de notre étude, nous proposons quelques méthodes innovatrices pour améliorer le résultat de classification de nos données. Les résultats obtenus par ces méthodes sont discutés à la fin du chapitre.

1

Contexte de l'étude et problématique scientifique

CE chapitre présente, en première partie l'application médicale dans laquelle s'inscrivent nos travaux (la dermatologie) ainsi que les principaux éléments de la structure histologique et de la composition biochimique de la peau humaine.

La deuxième partie consacrée à la présentation d'une pathologie cutanée "l'hypertrophie cicatricielle", constitue le contexte médical et scientifique de notre étude. Les modifications structurales au cours de l'évolution de cette maladie sont présentées et corrélées à plusieurs constituants de la peau, ce qui présente un intérêt potentiel en termes de détection et de caractérisation *in vivo* du tissu hypertrophique par spectroscopie multimodalités.

La dernière partie propose un état de l'art des méthodes de spectroscopie tissulaire appliquées au diagnostic *in vivo*.

1.1 Préambule

Depuis plusieurs années, notre équipe consacre une partie de ses activités au développement d'outils de diagnostic par méthodes spectroscopiques atraumatiques pour détecter, localiser et identifier des cellules ou tissus pathologiques, plus spécialement en cancérologie. Les travaux antérieurs à cette thèse concernent le diagnostic *in vivo* de lésions pré-cancéreuses et de cancers épithéliaux et plus particulièrement les pré-cancers cutanés : tissus hyperplasiques, dysplasiques et Carcinomes *In Situ* (CIS).

A la suite des bons résultats obtenus dans le cadre des travaux précédemment réalisés, nous avons souhaité élargir le champ d'application de la technique de spectroscopie fibrée multimodalités en conduisant une étude originale sur la classification spectroscopique *in vivo* de tissu chéloïdal ou cicatriciel hypertrophique.

Les motivations de cette orientation thématique applicative sont les suivantes :

- Bien que les travaux précédents ont prouvé l'efficacité de cette méthode de photodiagnostic sur des modèles pré-cliniques, son transfert en clinique implique la réalisation de plusieurs conditions administratives et techniques : 1) pour obtenir les autorisations de mise en place d'un protocole de test pour les mesures spectroscopiques sur des patients (comité de protection des personnes) ; 2) convertir l'instrument de laboratoire en prototype compatible avec une utilisation en clinique et apporter des améliorations au système existant pour le rendre efficace ;
- L'instrumentation dans son état actuel (équipements de laboratoire "sur table") nécessite d'être intégrée dans une unité mobile et protégée, afin qu'elle soit transportable et utilisable en clinique. Néanmoins, ces travaux ont été retardés d'un an et demi par suite de la cessation temporaire d'activité du sous-traitant industriel (Kaluti, Paris), ce qui fait que les essais cliniques initialement envisagés n'ont pu être mis en place pour la période de la présente thèse ;
- l'opportunité d'élargir l'étude de l'efficacité de notre méthode de biopsie optique pour la première fois au traitement et au diagnostic de cicatrices hypertrophiques cutanées dans le cadre d'un travail collaboratif avec le service de chirurgie maxillo-faciale du CHU de Nancy (chirurgienne esthétique en année recherche M2R en pharmacologie, Héloïse Gisquet) ;

L'objectif de cette étude est de développer et valider une méthode innovante pour caractériser la cicatrice hypertrophique ou chéloïde cutanée par spectroscopie bimodale (Autofluorescence et Réflectance Diffuse). Cette méthode permettrait par ailleurs d'effectuer des études pharmacodynamiques associées au développement de cicatrices hypertrophiques sans passer par la voie de biopsies mécaniques.

En fait, l'hypertrophie tissulaire est un développement important de taille de tissu à cause d'altérations fonctionnelles et ceci de manière très variable. Elle est différente de l'hyperplasie (étudiée dans les thèses précédentes) par le nombre de cellules (plus important pour l'hyperplasie) et l'accroissement de taille cellulaire (plus grosses pour l'hypertrophie). Cependant, l'hypertrophie cellulaire et l'hyperplasie peuvent à la fois conduire à une hypertrophie tissulaire ou organique (augmentation de volume de tissu ou d'organe). La cicatrice hypertrophique ou chéloïde concerne donc un phénomène hypertrophique au niveau de la cicatrisation. Elle est considérée comme une tumeur dermique fibreuse bénigne résultant d'une cicatrisation pathologique qui se traduit par une production excessive, donc un phénomène d'hyperplasie, de divers constituants du tissu conjonctif [Marneros and Krieg, 2004]. Les cicatrices hypertrophiques ou chéloïdiales, en général, ne sont pas malignes en tant que telles ; mais dans certaines conditions, elles vont conduire à des problèmes plus graves comme des risques de cancers, tel que le sarcome Kaposi [Oluwasanmi *et al.*, 1969].

L'étude de ce type de lésion présente un intérêt particulier par rapport à une application ultérieure de la méthode développée en oncologie, grâce à une connaissance plus approfondie de caractéristiques spectrales d'états tissulaires bénins.

1.2 Photodiagnostic tissulaire et problématique clinique

1.2.1 Contexte scientifique

1.2.1.1 Optique biomédicale

Les travaux de recherche dans le domaine de l'optique biomédicale étudient l'application de la photonique aux tissus biologiques, en particulier à visée d'explorations diagnostiques *in vivo*. Les axes d'étude dans ce domaine exploitent :

- les effets de la lumière sur les cellules et les tissus biologiques afin de traiter une pathologie et notamment : la chirurgie LASER en dermatologie ou en chirurgie vasculaire, la photothérapie et la thérapie photodynamique (PDT).
- la manière dont les photons interagissent avec les différents constituants des tissus, ce qui consiste à exploiter les variations de certaines propriétés mesurables de la lumière, telles que l'absorption, la fluorescence ou la diffusion (élastique et inélastique), afin d'obtenir des images structurales/fonctionnelles des tissus ou de les caractériser à partir des paramètres spectraux mesurés ou calculés. Les travaux de recherche essentiels dans ce domaine concernent le développement de nouvelles méthodes diagnostiques qui soient atraumatiques et utilisables *in vivo*.

Par rapport à d'autres techniques biomédicales d'exploration utilisant les ultrasons, les RX ou la résonance magnétique (échographie, radiologie, IRM, etc.), les méthodes optiques possèdent des avantages importants :

- les photons dans la bande NUV-visible-IR fournissent des irradiations non-ionisantes et sécurisées d'intérêt pour les applications médicales ;
- les spectres d'intensité recueillis suite aux interactions optiques entre lumière et tissus fournissent des informations liées aux caractéristiques morphologiques et/ou biochimiques des tissus ;
- une étude spectroscopique permet d'explorer simultanément plusieurs phénomènes photo-physiques dont les informations sont complémentaires pour un examen global ;
- les instruments nécessaires pour les mesures spectroscopiques sont relativement moins complexes avec un prix plus abordable ; les procédures d'acquisition sont simples et rapides.

En contre-partie, elles présentent des inconvénients liés à la nature des mesures, tels que :

- des profondeurs d'exploration limitées par l'absorption de la lumière due à la présence importante de chromophores (comme l'eau et l'hémoglobine) dans les tissus biologiques ;
- un problème inverse (c'est à dire retrouver les paramètres optiques exacts à partir de spectres d'intensité mesurés sur la surface du tissu) difficile à résoudre compte tenu de la forte diffusion et de la complexité des modèles.

[Wagnieres *et al.*, 1998] ont divisé les méthodes de diagnostic optique en deux catégories, spectroscopie et imagerie, selon l'instrument utilisé et/ou l'application clinique finale.

- Les techniques spectroscopiques, comme la Spectroscopie d'Autofluorescence (SAF) et la Spectroscopie de Réflectance Diffuse (SRD), consistent à obtenir la réponse spectrale (dans une bande de longueur d'onde assez large) du tissu en mesurant un spectre d'intensité lumineuse sur une zone particulière. Ces techniques impliquent des instruments équipés d'une sonde optique fibrée qui permet des mesures point par point. **L'intérêt de l'utilisation de cette technique en clinique est la richesse d'information spectrale fournie pour une caractérisation précise des tissus ; nos travaux de thèse s'inscrivent dans cet axe.**
- Les méthodes d'imagerie, telles que la Tomographie de Cohérence Optique (TCO) [Poneros *et al.*, 2001; Tuchin, 2002; Poneros *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2006; Tuchin, 2007], l'Imagerie Microscopique Confocale (IMC) [Anikijenko *et al.*, 2001; Tuchin, 2002; Swindle *et al.*, 2003; Sung *et al.*, 2003; Mauna Kea Technologies, 2007; Tuchin, 2007], la Tomographie Optique en Diffuse ou en Fluorescence (TOD ou TOF) [Taroni *et al.*, 2005; Enfield *et al.*, 2007], exploitent des phénomènes d'interaction lumière-tissu à des longueurs d'onde spécifiques, et créent des images des tissus, en topographie ou en section. Les instruments utilisés pour l'imagerie possèdent typiquement une source monochromatique et une conception optique sans contact (c'est à dire, la source lumineuse est projetée sur le tissu) pour avoir une plus large surface d'exploration. Dans la mesure où les tissus normaux et pathologiques présentent des caractéristiques différentes (intensité lumineuse, durée de vie de fluorescence, etc.), les lésions et les tissus sains peuvent être identifiés par des contrastes d'image. Donc, les techniques d'imagerie sont plus adéquates pour la localisation de tumeurs. En revanche, afin d'obtenir des images spectrales les plus contrastées possible, les longueurs d'onde d'excitation et de détection doivent être optimisées *a priori* pour une application donnée, ce qui nécessite de recourir souvent à la méthode spectroscopique. [Qu *et al.*, 1995; Forrer *et al.*, 1995; Coghlan *et al.*, 2000; Zellweger *et al.*, 2001]

Dans le cadre des travaux de recherche dans notre laboratoire (IPS), nous voulons développer une méthode de diagnostic simple et non-invasive pour aider le clinicien au guidage biopsique et à la détermination plus précise de marges chirurgicales en péri-opération. La technique spectroscopique est donc une direction principale à cette fin applicative.

1.2.1.2 Interactions lumière-tissus biologiques

Réflexion/réfraction Lorsque la lumière passe d'un milieu d'indice de réfraction donné à un autre, une partie de l'énergie lumineuse pénètre dans le nouveau milieu avec un changement de direction de propagation (réfraction), et une autre partie reste dans le milieu d'origine en suivant une autre direction déterminée par la loi de Snell Descartes (réflexion).

Cette loi annonce que :

- les rayons réfractés et réfléchis sont dans le plan d'incidence,
- l'angle de réflexion par rapport à la normale θ_r est équivalent à celui du faisceau incident θ_i et du même côté de l'interface,

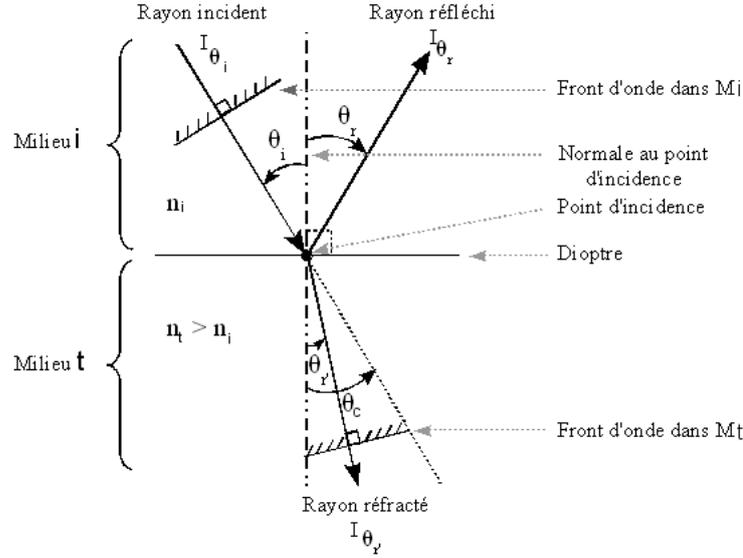


FIGURE 1.1 – Schéma du principe de réflexion/réfraction (Loi de Snell-Descartes)

- les indices de réfraction n_i et n_t de chacun des milieux et les angles d'incidence θ_i et de réfraction $\theta_{r'}$ sont liés par la relation de Snell-Descartes (Equ. 1.1) :

$$n_i \cdot \sin \theta_i = n_t \cdot \sin \theta_{r'} \quad (1.1)$$

Pour un couple d'indices n_i et n_t , un angle critique θ_c peut être déterminé. Il est défini par $\theta_c = \arcsin(\frac{n_t}{n_i})$ (pour $\theta_{r'} = 90^\circ$), est un angle au delà duquel la transmission n'est plus possible.

Dans une étude en optique biomédicale, on veut généralement maximiser la transmission de lumière à l'interface air-tissu, afin d'optimiser l'effet d'excitation ou thérapeutique.

Les phénomènes physiques de réfraction et réflexion sont causés par le changement de vitesse de la lumière dans les différents environnements physiques du milieu. Ce changement de vitesse est déterminé par un indice de réfraction qui est le rapport entre les vitesses de la lumière dans le milieu $v_\varphi(\lambda)$ et dans le vide c_o (Equ. 1.2) [Jackson, 2001] :

$$n(\lambda) = \frac{c_o}{v_\varphi(\lambda)} \quad (1.2)$$

Les tissus biologiques contenant principalement de l'eau ($n_{eau} = 1.33$) et des protéines ($n_{proteine} = 1.6$), leur indice de réfraction varie entre 1.35 et 1.5. La différence des indices de réfraction entre le tissu et l'air ($n_{air} \approx 1$) ou entre couches de tissus donne lieu à la réfraction/réflexion au niveau des interfaces. Ce phénomène est important en optique biomédicale, parce qu'il conditionne non seulement la portion de lumière pénétrant dans le tissu pour y interagir, mais aussi l'intensité du signal lumineux sortant du milieu biologique pour la détection. La réflectivité ou réflectance, fraction de flux énergétique incident réfléchi, à l'interface air-tissu est typiquement entre 5 et 25%. Le tableau (Tab. 1.1) [Ding *et al.*, 2006] recense les valeurs d'indices de réfraction mesurées pour différentes couches de la peau humaine, comprises entre

TABLE 1.1 – Indices de réfraction mesurées *ex vivo* par réfractomètre pour différentes couches cutanées dans le corps humain [Ding *et al.*, 2006]

Couches	$\lambda(nm)$	n	n_{moyen}
Stratum Corneum	400 – 700	1,55	1,55
Epiderme	325	1,489	1,447
	442	1,449	
	532	1,448	
	633	1,433	
Derme	325	1,401	1,390
	442	1,395	
	532	1,378	
	633	1,396	

1.3 – 1.6 et dépendantes de la longueur d'onde. Ce tableau montre d'une part, que l'indice de réfraction varie en fonction de la longueur d'onde de la lumière pénétrant dans la peau et d'autre part, que la variation est plus importante en fonction des couches ($n_{moyen} = 1,55$ pour la couche cornée ; 1,447 pour l'épiderme ; 1,390 pour le derme). Lors de développement pathologique, des caractéristiques morphologiques des tissus (dimension, densité cellulaire, etc) peuvent changer, ce qui modifie l'indice de réfraction (valeurs globales des indices dans ces trois couches) et donne une réponse spectrale différente par rapport au tissu normal.

Absorption Quand les photons se propagent dans les tissus, une partie de leur énergie peut être absorbée par le milieu biologique. Cette partie d'énergie absorbée est ensuite convertie soit en une autre forme d'énergie par l'émission de fluorescence, soit en chaleur. A l'échelle macroscopique, la quantité énergétique absorbée ∂I est en général déterminée une équation décrivant la relation entre la lumière absorbée et les propriétés optiques du milieu qu'elle traverse [Bohren and Huffman, 2004] :

$$\partial I(\lambda) = -\mu_a(\lambda) \cdot I_o(\lambda) \cdot \partial l \quad (1.3)$$

où ∂l est la distance parcourue dans le milieu par un faisceau d'intensité I_o à l'entrée du milieu et μ_a est le coefficient d'absorption. En intégrant l'équation (1.3) sur l , nous obtenons la loi de Beer-Lambert :

$$I(\lambda) = I_o(\lambda) e^{-\mu_a(\lambda)L} \quad (1.4)$$

Le coefficient d'absorption μ_a est défini comme la probabilité d'absorption d'un photon à une longueur d'onde donnée par distance unitaire dans un milieu, qui s'exprime en fonction du coefficient d'extinction molaire ε (en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) et de la concentration molaire $[C]$ (en $mol \cdot L^{-1}$) tel que [Jacques, 2005] :

$$\mu_a(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot [C] \quad (1.5)$$

Une grandeur physique en fonction de μ_a et largement utilisée pour caractériser l'absorption d'un milieu homogène est l'absorbance ou densité optique $A(\lambda)$ qui est définie telle que :

$$A(\lambda) = -\log_{10} \frac{I(\lambda)}{I_o(\lambda)} = \mu_a(\lambda) \cdot l \quad (1.6)$$

Cependant, les milieux biologiques contiennent éventuellement plusieurs absorbeurs et l'absorbance $A(\lambda)$ d'un mélange de n espèces absorbantes est alors la somme des absorbances individuelles (Equ.1.7) :

$$A(\lambda) = \sum_{i=1}^n A_i(\lambda) = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i(\lambda) \cdot [C]_i = \sum_{i=1}^n \mu_a(\lambda)_i \cdot l \quad (1.7)$$

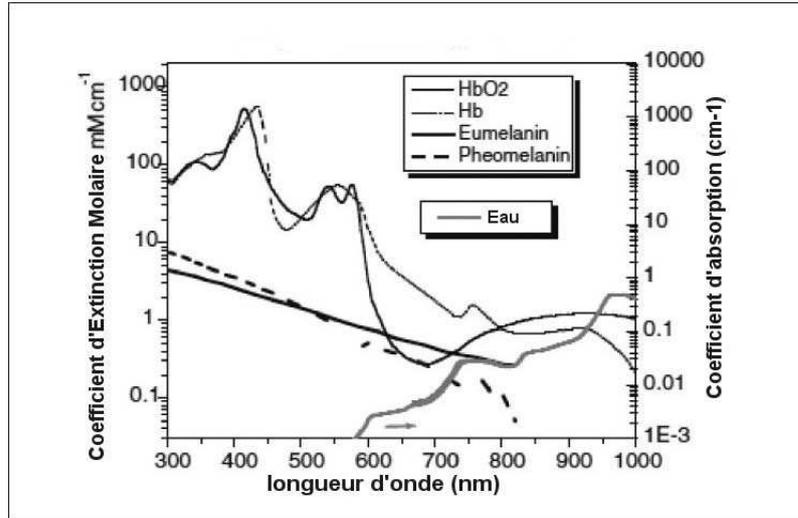


FIGURE 1.2 – Coefficients d'extinction en fonction de la longueur d'onde pour les principaux chromophores de la peau : hémoglobine, eau, eumélanine et phéomélanine [Srinivas and Kumaresan, 2011]

Au sein des tissus biologiques, l'hémoglobine et l'eau sont deux principaux absorbeurs dans la bande de longueur d'onde NUV-visible-IR (bande spectrale d'intérêt pour notre étude). La concentration de ces chromophores détermine l'absorbance des différentes couches tissulaires. Pour certains tissus spécifiques, tels que la peau, d'autres types de chromophores (mélanine notamment) peuvent être présents et à l'origine d'absorption de la lumière dans des bandes spectrales spécifiques. La figure 1.3 présente la variation des coefficients d'extinction de ces différents chromophores de la peau humaine (eau, hémoglobine, mélanine) en fonction de la longueur d'onde dans la bande 300 – 1000nm [Srinivas and Kumaresan, 2011].

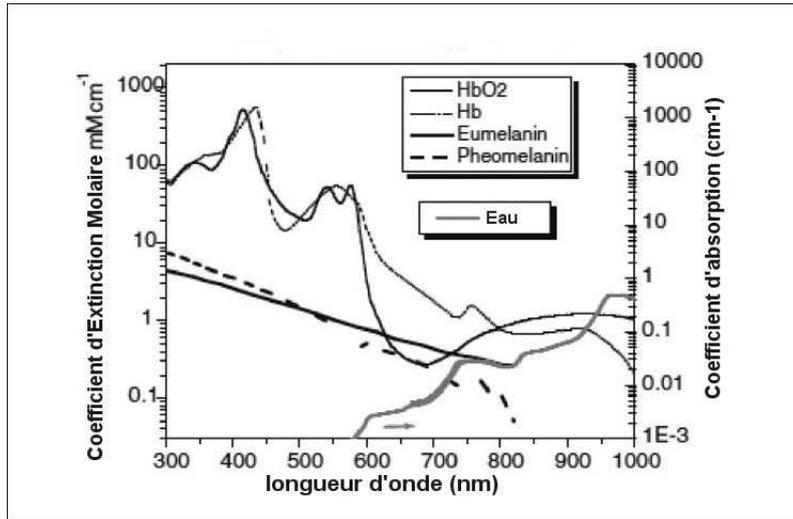


FIGURE 1.3 – Coefficients d’extinction en fonction de la longueur d’onde pour les principaux chromophores de la peau : hémoglobine, eau, eumélanine et phéomélanine [Srinivas and Kumaresan, 2011]

Fluorescence Dans les tissus biologiques, certaines molécules peuvent émettre une lumière (fluorescence) après absorption d’une énergie lumineuse. Le mécanisme quantique de ce phénomène physique est traduit par des étapes de transition énergétique schématisés par le diagramme de Jablonsky (Fig.1.4) :

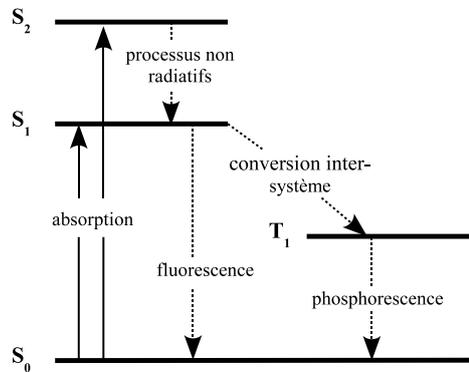


FIGURE 1.4 – Diagramme de Jablonsky simplifié représentant les différentes transitions énergétiques possibles entre les états singulets S₀ (état stable), S₁ et S₂ (états excités) et l’état triplet T₁.

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 $E_{p\ ex} = h \frac{c_0}{\lambda_{ex}}$ ($E_{p\ ex}$ énergie du photon, h constante de Planck, c_0 célérité de la lumière dans le vide et λ_{ex} 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 S₀ à un niveau d’énergie électronique supérieur S₁ ou S₂ 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 $h \frac{c}{\lambda_{em}} < h \frac{c}{\lambda_{ex}}$. La longueur d'onde du photon de *fluorescence* émis λ_{em} sera plus grande que la longueur d'onde λ_{ex} du photon incident qui aura excité la molécule : ce phénomène est appelé *déplacement de Stokes*.
 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, 2002].

Les fluorophores sont également caractérisés par deux paramètres qui leur sont propres : rendement quantique de fluorescence Φ et une durée de vie de fluorescence τ . Le rendement quantique est simplement le rapport entre le nombre de photons émis N_{em} et le nombre de photons absorbés N_{abs} (Eq.1.8). Il décrit l'efficacité d'excitation d'un fluorophore.

$$\Phi(\lambda) = \frac{N_{em}(\lambda)}{N_{abs}(\lambda)} \quad (1.8)$$

La durée de vie est définie par le temps moyen qu'un fluorophore a passé dans son état excité. Ces deux paramètres déterminant l'intensité de fluorescence détectée sont sensibles à des facteurs variables, tels que l'environnement biochimique. De plus, l'intensité de fluorescence varie en fonction de la concentration et du coefficient d'absorption de ces fluorophores (à la longueur d'onde d'excitation). Ainsi, une mesure de la variation d'intensité spectrale de fluorescence (en spectroscopie résolue temporellement ou spatialement) reflète la variation de l'ensemble de ces facteurs et peut être utilisée pour caractériser différents types de tissus biologiques.

Diffusion élastique Macroscopiquement, les tissus biologiques possédant des indices de réfraction globaux différents de celui de l'air ($n_{tissu} \approx 1.410$ et $n_{air} = 1$), une partie de la lumière incidente est réfléchi au niveau de l'interface air-tissu. A l'échelle microscopique, la composition biologique hétérogène des tissus biologiques (cellules, noyaux, cytoplasmes, matrices extracellulaires ...) avec des constituants de taille, de formes et d'indice de réfraction variables a

pour effet de dévier le rayonnement lumineux de sa direction initiale par une succession de réflexion/réfraction à chaque interface entre éléments d'indices différents. Ce phénomène de diffusion (élastique) peut suivre 2 régimes différents selon la dimension des particules diffusantes par rapport à la longueur d'onde de la lumière incidente : la diffusion Rayleigh et la diffusion de Mie.

La diffusion de Rayleigh a lieu lorsque la taille des particules diffusantes est beaucoup plus petite que la longueur d'onde du rayonnement incident. En physique des particules, la section efficace σ_{eff} est la grandeur physique utilisée pour rendre compte de la probabilité d'interaction d'une particule avec son environnement. Dans la diffusion de Rayleigh, cette section efficace est définie comme (Equ.1.9) :

$$\sigma_{eff} = \frac{2\pi^5 d^6}{3 \lambda^4} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \quad (1.9)$$

où d et n sont respectivement le diamètre et l'indice de réfraction des particules diffusantes. La dépendance quadratique par rapport à la longueur d'onde ($\propto \frac{1}{\lambda^4}$) décrit que ce phénomène est plus accentué pour la lumière dans le bleu et l'UV. Ce paramètre peut être multiplié par le nombre N ou la densité volumique ρ de particules, afin de déduire le coefficient de diffusion μ_s , qui définit la probabilité de diffusion pour un groupe de particules. Ce paramètre est largement utilisé, dans les études spectroscopiques, pour décrire les propriétés optiques des milieux biologiques diffusants à l'échelle macroscopique. Dans les tissus biologiques, certains constituants et en particulier un grand nombre d'organites intracellulaires sont de dimension typique inférieure aux longueurs d'onde utilisées en spectroscopie optique (300 – 900nm environ), et entraînent donc ce régime de diffusion isotrope.

Dans le cas où la taille des éléments diffusants est comparable ou plus grande que la longueur d'onde, la théorie de Mie décrit ce phénomène. Dans ce régime, la section efficace d'une particule est donnée par une somme de fonctions harmoniques (Equ.1.10) :

$$\sigma_{eff} = \frac{\lambda^2}{2\pi} \sum_{N=1}^{\infty} (|a_s|^2 + |b_s|^2) \quad (1.10)$$

a_s et b_s sont deux solutions de la diffusion de Mie aux conditions limites :

$$|a_s| = \frac{\Psi'_s(nx)\Psi_s(x) - n\Psi_s(nx)\Psi'_s(x)}{\Psi'_s(nx)\zeta_s(x) - n\Psi_s(nx)\zeta'_s(x)} \quad (1.11)$$

$$|b_s| = \frac{n\Psi'_s(nx)\Psi_s(x) - \Psi_s(nx)\Psi'_s(x)}{n\Psi'_s(nx)\zeta_s(x) - \Psi_s(nx)\zeta'_s(x)} \quad (1.12)$$

où Ψ et ζ sont les fonctions de Riccati-Bessel et avec n l'indice de réfraction de l'élément diffusant, et x le paramètre de sa taille défini par :

$$x = \frac{2\pi r}{\lambda} \quad (1.13)$$

La section efficace de la diffusion de Mie possède une solution analytique simple pour une particule sphérique de rayon r avec une onde incidente plane de nombre d'onde k telle que (Equ. 1.14) :

$$\sigma_{eff} = \frac{10\pi}{3} r^2 (kr)^4 \quad (1.14)$$

avec

$$k = \frac{\omega}{c} = \frac{2\pi f}{c} = 2\pi \frac{1}{cT} = 2\pi \frac{1}{\lambda} \quad (1.15)$$

Si la dimension des particules r est très inférieure à la longueur d'onde, la diffusion revient au régime de Rayleigh, avec une dépendance en $\frac{1}{\lambda^4}$. De ce fait, la diffusion de Rayleigh est un cas limite de Mie en fonction de taille de diffuseur. En revanche, lorsque r est très supérieur à longueur d'onde, la diffusion n'est plus dépendante de la longueur d'onde, ce qui est le cas pour la réfraction simple (optique géométrique).

Dans les tissus biologiques, la taille moyenne des cellules est comparable aux longueurs d'onde utilisées (350–900nm), la diffusion créée dans ce milieu suit donc le régime de Mie et est fonction de la longueur d'onde λ (le coefficient de diffusion μ_s décroît de façon monotone avec la longueur d'onde entre 350–1000nm). Au cours de certaines pathologies, la dimension des particules diffuses r , donc la diffusion globale du milieu biologique, peut changer significativement [Tuchin, 2007]. Ainsi, la mesure spectroscopique de diffusion élastique permet de détecter ce changement microscopique, exploitable pour le diagnostic.

1.2.2 Contexte clinique : dermatologie

En médecine, la dermatologie est une branche d'étude très importante, qui concerne la peau mais aussi les muqueuses et les phanères (ongles, cheveux, poils). Nos travaux concernent la peau qui est un des organes les plus importants du corps en regard de sa surface et de sa masse. En effet, véritable interface avec le monde extérieur, elle est par nature directement exposée aux facteurs pathologiques comme des infections, aux rayons solaires nocifs et aux blessures. Les maladies cutanées présentent de grandes diversités morphologiques et touchent des populations de tous âges. De plus, de nombreuses maladies systémiques (touchant l'ensemble de l'organisme et non un seul organe) telles que le diabète, certaines maladies hormonales ou inflammatoires (plus spécifiquement celles atteignant le collagène) ont un retentissement plus ou moins important sur la peau et provoquent ainsi des symptômes cutanés [Jamison *et al.*, 2006].

Du fait de l'incidence élevée des affections cutanées et de leur polymorphisme, leur dépistage et/ou diagnostic est toujours basé sur une évaluation visuelle des lésions afin d'identifier des éléments symptomatiques correspondants. Cette méthode diagnostique plutôt subjective manque à la fois de spécificité et de sensibilité, compte tenu de la grande variété des maladies pouvant affecter la peau humaine [Jamison *et al.*, 2006]. Le cas échéant, l'analyse d'un échantillon tissulaire prélevé par biopsie précise définitivement le diagnostic clinique initial. Cette méthode invasive et traumatique nécessite le prélèvement du tissu suspect et une série de procédures préparatoires pour l'analyse anatomopathologique. Par rapport aux autres maladies présentant un plus grand taux de mortalité, comme celles touchant le coeur, le cerveau et le système respiratoire, il existe

très peu d'appareils diagnostiques pour les maladies de la peau humaine.

Ainsi, de nouveaux outils et méthodes de diagnostic sont développés par plusieurs équipes [Anderson and Parrish, 1981; Bigio and Mourant, 1997; Gillies *et al.*, 2000; Yaroslavsky *et al.*, 2004] pour un usage quotidien en clinique appliqué à la détection des lésions cutanées. Dans ce travail de thèse, nous proposons une approche diagnostique non-invasive pour détecter une des maladies cutanées bien répandue dans le monde : les cicatrices hypertrophiques ou chéloïdes. Cette méthode basée sur une analyse des spectres d'intensité de lumière mesurés sur la lésion cutanée est bien adaptée à la nécessité clinique, et pourra éventuellement simplifier, dans un proche avenir, le diagnostic *in vivo* d'une grande variété de maladies cutanées en donnant des résultats plus "objectifs" ou opérateur-indépendants et en temps réel.

1.2.3 La peau : description histologique et propriétés optiques

Préalablement à la présentation de méthodes spectroscopiques applicables au diagnostic des maladies cutanées, cette section vise à décrire les propriétés histologiques et optiques essentielles de la peau. [Anderson and Parrish, 1981] ont détaillé les structures constitutives et certaines propriétés optiques de la peau humaine dans leur publication en 1981.

Histologiquement, la peau humaine normale se compose de trois couches principales (Fig.1.5) : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Ces trois couches constitutives composées de types cellulaires et de substances biochimiques différentes remplissent chacune diverses fonctions vitales et possèdent des propriétés optiques différentes.

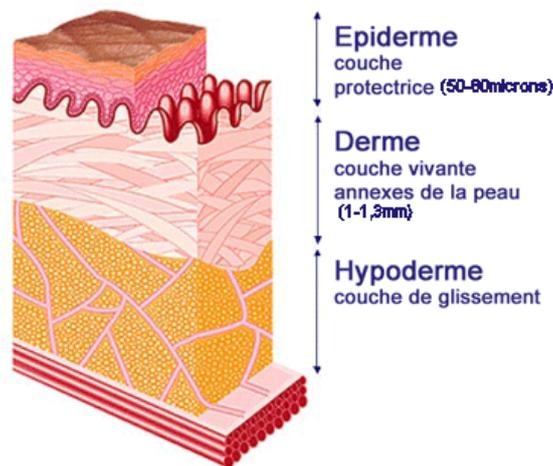


FIGURE 1.5 – Illustration de la structure de la peau humaine comprenant 3 couches constitutives : épiderme, derme et hypoderme [URGO, 2010]

1.2.3.1 Epiderme

Description histologique L'épiderme est la couche superficielle de la peau dont la surface (stratum corneum ou couche cornée) est formée de cellules mortes kératinisées. Son épaisseur

varie, en fonction de la localisation anatomique, de 0.05mm (partie couvrant les paupières) à 1.5mm (au niveau de la paume et de la plante du pied). Les kératinocytes constituent de 90 à 95% de la population épidermique. Le rôle des kératinocytes consiste à produire de la kératine, qui garantit une imperméabilité de la peau. Les kératinocytes prolifèrent dans l'assise basale puis se différencient progressivement pour former les différentes couches de l'épiderme en migrant depuis la profondeur vers la surface où elles desquament. En général, l'épiderme est constitué de quatre couches cellulaires (Fig.1.6).

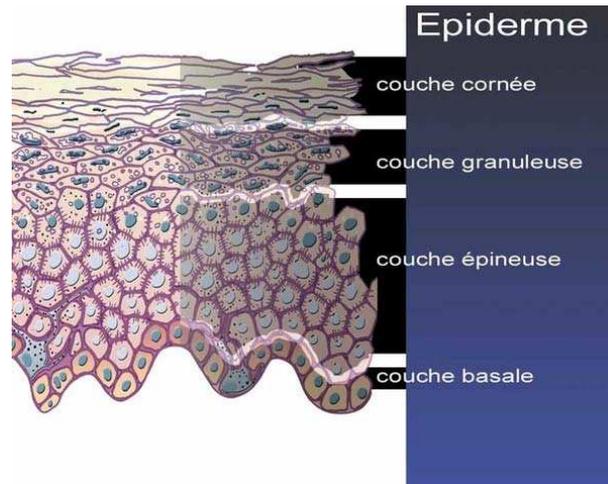


FIGURE 1.6 – Schéma de la structure de l'épiderme montrant 4 couches et ses cellules constitutives [Olivry, 2009]

La couche basale est une zone de jonction entre l'épiderme et le derme. Elle est séparée de la couche adjacente dermique par une membrane basale ondulée, qui contribue principalement à la cohésion structurale de l'épithélium. Cette couche basale est principalement constituée de kératinocytes en activité mitotique et de cellules migrantes. Les kératinocytes basaux contiennent de fins réseaux de filaments de kératine, rendant le cytosquelette suffisamment flexible pour permettre la division et la migration. On y trouve les mélanocytes, cellules responsables de la couleur de la peau et du bronzage.

La couche épineuse (stratum spinosum) est composée de 5 à 15 strates de kératinocytes volumineux et polygonaux ou épineux, qui lui donne son nom de couche. On trouve de nombreux granules de mélanine et des macrophages disséminés parmi les kératinocytes.

La couche granuleuse constitue la dernière couche de cellules nucléées de l'épiderme. Elle est formée de 1 à 4 strates cellulaires aplaties dont le noyau commence à dégénérer. Le cytoplasme des cellules de la couche granuleuse contient des grains de kératohyaline (ou profilaggrine), pré-curseur de la kératine, et des lipides qui permettent l'élaboration de la graisse épidermique.

La couche cornée (stratum corneum) est la couche la plus superficielle de l'épiderme. Elle se compose de 20 à 30 strates de cellules et peut occuper jusqu'aux trois quarts de l'épaisseur de l'épiderme. La kératine et les membranes plasmiques épaissies des cellules de la couche cornée protègent la peau contre l'abrasion et la pénétration. La couche cornée est composée de cellules

mortes appelées cellules kératinisées ou cornées entièrement remplies de fibrilles de kératine et empilées les unes sur les autres.

Caractérisation/Propriétés optiques La couche cornée, surface externe de la peau, est en contact direct avec l'environnement extérieur (l'air en général). La différence entre l'indice de réfraction de la couche cornée ($n = 1.55$) et celui de l'air ($n = 1$) fait qu'une partie de lumière incidente est réfléchiée vers l'extérieur. De plus, dans certaines conditions pathologiques, comme le psoriasis [Anderson and Parrish, 1981], plusieurs interfaces air-tissus peuvent se créer par la présence des cellules (cornéocytes) détachées qui augmentent considérablement les propriétés de réflexion dans cette couche. La réflectivité peut atteindre une valeur de 20% dans la région du visible (plus particulièrement la bande spectrale de couleur "bleue" et "verte").

La mélanine, un polymère important dans l'épiderme, possède des propriétés absorbantes accrues pour les rayonnements UV. Elle est produite par les mélanocytes de la couche basale et diffusée entre les kératinocytes de la couche épineuse, créant un filtre optique empêchant une grande partie de la lumière UV (Fig.1.7) d'entrer dans les couches plus profondes de la peau. Sa concentration et sa sécrétion varient en fonction de la zone et du temps d'exposition au rayonnement solaire. La mélanine est le chromophore majeur déterminant le comportement optique de cette couche (épiderme) non-vascularisée.

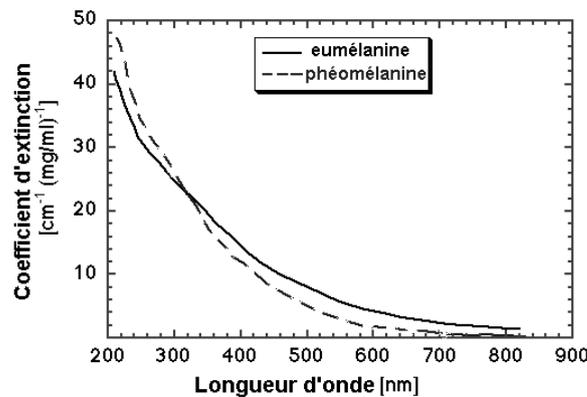


FIGURE 1.7 – Spectres de coefficient d'extinction molaire pour les deux types de mélanine dans la peau humaine : eumélanine (ligne foncée) et phéomélanine (ligne claire) [OMLC, 2004]

D'autres molécules aromatiques, spécifiquement l'acide urocanique, complètent la fonction protectrice contre les radiations d'UV, mais leur quantité dans la peau, comparée à celle de la mélanine, est relativement petite. De plus, leur synthèse est fortement liée aux phénomènes physiologiques, comme la transpiration pour l'acide urocanique. Donc, leur influence sur les spectres mesurés sur cette couche peut être négligée, lorsque l'on étudie les propriétés optiques de l'épiderme.

En plus de ces chromophores, on trouve également au sein de l'épiderme plusieurs fluorophores endogènes, notamment : tyrosine, tryptophane et kératine. La tyrosine et le tryptophane

sont des acides aminés présents dans les cellules de l'épiderme, qui possèdent des bandes d'excitation maximale vers $280nm$ ($240 - 320 nm$), et fluorescent dans la bande de 300 à $350 nm$. L'intensité de fluorescence émise par ces deux molécules est relativement petite par rapport à celle des fluorophores dans les couches plus profondes, parce qu'elles présentent des rendements quantiques faibles. Cependant, elles constituent les seules sources de fluorescence efficacement excitables dans cette couche, ce qui permet de détecter l'hyper-prolifération cellulaire, par exemple un épaissement de l'épiderme. La kératine possède des propriétés mécaniques et biochimiques différentes. Pour la peau, la kératine principalement confinée dans la couche épidermique (où le mécanisme de kératinisation est important) possède des caractéristiques spectrales relativement proches de celles du collagène [Wu and Qu, 2006b]) : excitation dans l'UV-bleu et émission de fluorescence dans le vert. Néanmoins, l'effet d'absorption dans l'UV par la mélanine inhibitant l'excitation de la kératine et la fluorescence intense provenant du collagène dans la couche inférieure ne peuvent pas toujours être distingués au sein des spectres d'AF mesurés à la surface de la peau.

Dans l'épiderme, un régime de diffusion de Mie prédomine du fait de la présence des particules diffusantes de taille du même ordre de grandeur que la longueur d'onde. La lumière a ainsi tendance à s'y propager vers l'avant. Cette propriété d'anisotropie dépend de la longueur d'onde et est plus prononcée dans le domaine rouge et IR [W. and van der Leun J., 1984].

1.2.3.2 Derme

Description histologique Le derme constitué du tissu conjonctif donne une structure flexible à la peau et lui permet de résister à des contraintes mécaniques. Son épaisseur varie selon les régions corporelles et peut atteindre un millimètre. Le derme est irrigué par des capillaires dispersés dans cette couche et nourrit en même temps la couche épidermique par diffusion. **La couche dermique assure aussi la thermorégulation, l'élimination des agents toxiques et étrangers, ainsi que la cicatrisation.** On distingue normalement 2 couches constitutives pour le derme : derme papillaire et derme réticulaire (Fig.1.8).

Le derme papillaire est la couche supérieure du derme. Il tient son nom de sa surface en papilles qui forment des saillies alternant avec des prolongements épidermiques. Cette structure renforce la liaison inter-couches par une interface plus vaste entre derme papillaire et la dernière couche de l'épiderme (couche basale), et facilite le passage des nutriments du derme à l'épiderme. On trouve un grand nombre de vaisseaux sanguins et de neurofibres dans cette couche fine conjonctive.

Le derme réticulaire, plus profond, occupe environ 80% du volume du derme. Il est plus dense et élastique, grâce à des fibres protéiques formant des matrices entrecroisées qui tiennent la structure et donne de la force et de l'extensibilité à la peau. Deux de ces protéines structurales sont le collagène et l'élastine. Leurs synthèse et renouvellement sont assurés par les fibroblastes dont la quantité augmente significativement lors de la cicatrisation. Le derme réticulaire est abondamment vascularisé dans sa partie la plus superficielle.

Propriétés optiques Le derme est une couche riche en vaisseaux sanguins qui prennent en charge la fonction nutritionnelle de la peau. Ces vaisseaux se concentrent plutôt au-dessous de la

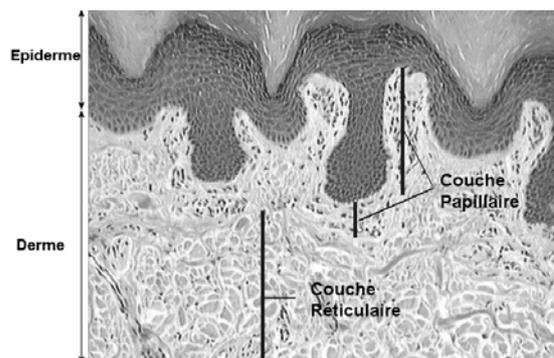


FIGURE 1.8 – Image d'une coupe histologique du derme montrant deux zones distinctes : derme papillaire et réticulaire. [Macomber, 2009]

papille dermique (partie haute du derme papillaire) et plus profondément en contact avec l'hypoderme. On trouve donc beaucoup de cellules sanguines dans cette couche nutritive. L'hémoglobine est un chromophore qui absorbe fortement la lumière visible avec des maxima d'absorption à 420, 540 et 580nm pour l'oxyhémoglobine.

Les deux principaux constituants du derme (70% du poids net), collagène et élastine forment des réseaux matriciels qui fluorescent dans le vert 330–550nm (collagène($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) : 325nm/400nm, 360nm/405nm, 340nm/410nm ;élastine : 290/340nm, 325/400nm, 420/500nm [Ramanujam, 2000]). L'intensité de fluorescence émise par ces deux fluorophores est principalement dépendant de la structure matricielle qu'ils créent. Par exemple, [Ye and Patricia, 2008] a rapporté que la destruction de réticulation collagène ("collagenase digestible collagen cross-links") engendre une diminution de fluorescence émise de la couche dermique.

En plus de leur propriété de fluorescence, les faisceaux de fibres créés par ces deux constituants matriciels confèrent des propriétés particulières de diffusion de la lumière à cette couche : les fibres de quelques μm de diamètre sont d'origine de la diffusion de Mie, tandis que d'autres micro-structures de cette couche provoquent une diffusion de Rayleigh plus isotrope.

1.2.3.3 Hypoderme

Description histologique L'hypoderme, appelé aussi tissu sous-cutané, est la couche adjacente du derme. Dans la plupart des références de la littérature, cette couche n'est pas considérée comme une couche constitutive de la peau. Elle sert d'interface entre la peau et les structures mobiles en dessous d'elle, comme le muscle et le tendon. Le derme sert encore d'amortisseur anti-impact pour l'organisme qu'il couvre et d'une réserve adipeuse.

Propriétés optiques La graisse constitue un milieu optique très diffusant. Un nombre important de vaisseaux sanguins la traversent avant de pénétrer dans le derme, et confère également à cette couche une propriété absorbante dans le domaine du visible, à cause de l'absorption par l'hémoglobine. Cependant, compte tenu de la profondeur à laquelle se situe cette couche ($> 3mm$) et de la pénétration limitée de la lumière dans la bande de 350 – 750nm (profondeur de pénétration 0.8 – 3.1mm) dans ces tissus absorbants et très diffusants (Fig.1.9), l'hypoderme

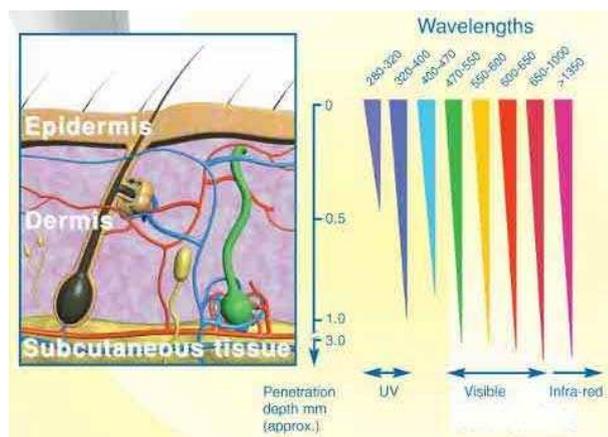


FIGURE 1.9 – Représentation schématique montrant les profondeurs de pénétration de la lumière en fonction des longueurs d'onde au sein des différentes couches cutanées. [Sowray, 2009]

est rarement pris en compte pour l'étude des tissus cutanés humains en spectroscopie *in vivo*.

1.2.4 Hypertrophie cutanée

En médecine, l'hypertrophie désigne l'augmentation volumique d'un organe ou d'une partie du corps, à cause d'altérations de fonctionnement et ceci de manière variable. Ce phénomène physiologique ne pose pas forcément de problème de santé pour l'homme. Par exemple, l'hypertrophie musculaire après musculation ou entraînement physique permet d'augmenter le volume sarcoplasmique et améliore ainsi la qualité mécanique (contractilité et résistance) du muscle [Kraemer *et al.*, 2006]. **Par contre, d'autres types d'hypertrophie, comme celles apparaissant au cours de la cicatrisation cutanée après un traumatisme quelconque, peut diminuer dramatiquement la qualité de vie des personnes atteintes.**

Cicatrice hypertrophique et Chéloïde Deux types de phénomène hypertrophique peuvent survenir sur une cicatrice humaine : Cicatrice hypertrophique et Chéloïde. Ces deux lésions cutanées sont dues à l'excroissance du derme au niveau d'une blessure guérie et présentent des apparences lésionnelles similaires. Les cicatrices hypertrophiques (Fig. 1.10.1) sont érythémateuses, prurigineuses, caractérisées par des lésions fibreuses qui généralement ne s'étendent pas au-delà des limites de la lésion initiale et peuvent se résorber partiellement de façon spontanée. Cependant, la régression entière d'une cicatrice hypertrophique peut se prolonger jusqu'à 3 ans après son apparition initiale. En revanche, le tissu chéloïdien se développe au-delà des frontières de la plaie d'origine, et se guérit rarement spontanément, et a tendance à réapparaître même après une excision (Fig. 1.10.2).

1.2.4.1 Epidémiologie et causes

Incidence Seuls les humains sont touchés par les chéloïdes, et les deux modes dominants et récessifs de l'héritage ont été décrits. Bien que les chéloïdes se produisent dans tous les groupes



1.10.1:



1.10.2:

FIGURE 1.10 – Exemple d'une cicatrice hypertrophique au niveau du genou (Fig. 1.10.1) et d'une Chéloïde à l'abdomen (Fig. 1.10.2) présentant un volume plus élevé par rapport à la cicatrice hypertrophique. [American Osteopathic College Of Dermatology, 2010]

d'âge, on les trouve rarement chez les nouveau-nés ou les personnes âgées. Elles ont la plus forte incidence chez les individus âgés de 10 à 20 ans [Berman *et al.*, 2009].

Âge La maladie débute le plus souvent chez les individus âgés de 10 à 30 ans. Les chéloïdes se produisent moins souvent aux extrêmes de l'âge, bien qu'un nombre croissant de chéloïdes présternales aient résulté d'opérations, de pontages artériels et d'autres procédures similaires réalisées sur des personnes appartenant à des groupes plus âgés [Berman *et al.*, 2009].

Mortalité et morbidité Les chéloïdes et les cicatrices hypertrophiques surviennent sur la plupart des sites corporels d'importance esthétique et peuvent entraîner des défigurations majeures si elles sont situées sur la face. Certaines (chéloïdes en particulier) peuvent provoquer des contractures. Dans ces conditions, une perte de fonction peut survenir lorsque la lésion recouvre une articulation. Les chéloïdes et cicatrices hypertrophiques peuvent être à la fois douloureuses et prurigineuses [Berman *et al.*, 2009].

Ethnie Les chéloïdes se forment plus fréquemment chez les personnes chinoises et polynésiennes que chez les personnes indiennes et malaisiennes. Jusqu'à 16% de la population dans un échantillonnage aléatoire de noirs africains ont déclaré avoir des chéloïdes. Les personnes de peau blanche sont moins souvent touchées [Berman *et al.*, 2009].

Genre La prévalence est rapportée comme étant plus élevée chez les jeunes femmes que chez les jeunes hommes, ce qui reflète probablement l'existence plus fréquente de piercing du lobe de l'oreille chez les femmes. Chéloïdes et cicatrices hypertrophiques affectent également les deux sexes dans les autres groupes d'âge [Berman *et al.*, 2009].

Causes Les mécanismes exacts de la pathogenèse des chéloïdes et des cicatrices hypertrophiques restent mal connus. Aucun gène ou ensemble de gènes spécifiques n'a été identifié, mais

la prévalence accrue de chéloïde chez les sujets de couleur de peau foncée suggère une base génétique ou, au moins, un lien génétique. L'incidence de l'hypertrophie est multifactorielle. Les traumatismes de la peau, tant physiques (par exemple, le piercing et la chirurgie) que pathologiques (par exemple l'acné, la varicelle), sont les principales causes identifiées du développement de chéloïdes et de cicatrices hypertrophiques. La présence de matières étrangères, les infections, les hématomes, ou les tensions de la peau peuvent également conduire à la formation de cicatrices chéloïdales ou hypertrophiques chez les personnes sensibles [Berman *et al.*, 2009].

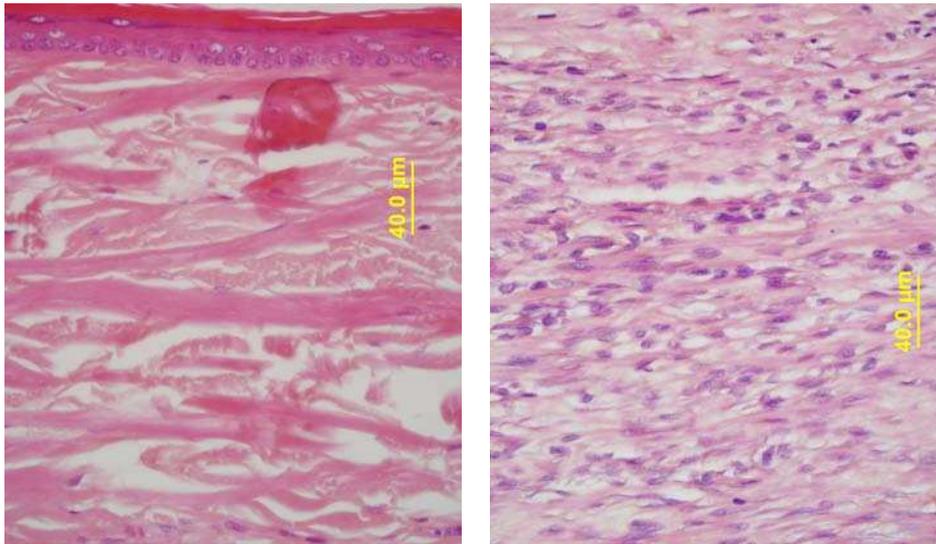
1.2.4.2 Physiopathologie

Les cicatrices hypertrophiques et chéloïdes peuvent être décrites comme des variations de la cicatrisation des plaies typiques. Dans une plaie typique, les processus anaboliques et cataboliques peuvent atteindre un état d'équilibre environ 6 à 8 semaines après la lésion initiale. A ce stade, la résistance de la plaie est d'environ 30-40% de celle de la peau saine. La résistance à la traction de la cicatrice favorise par la suite la réticulation des fibres de collagène. À ce stade, la cicatrice est habituellement hyperhémique et peut être épaissie, mais elle tend à s'atténuer progressivement au fil des mois jusqu'à ce qu'une cicatrice plate, blanche, souple, étirable et mature soit formée. Lors d'un déséquilibre entre les phases anaboliques et cataboliques du processus de guérison, davantage de collagène est produit par rapport à ce qui est dégradé, et la cicatrice se développe dans toutes les directions. La cicatrice s'élève au-dessus de la peau et reste hyperémique. Par excès de tissus fibreux, elle est classée comme une chéloïde ou une cicatrice hypertrophique [Maurice King and C. Peter, 1999].

[Kischer and Brody, 1981] ont défini les nodules de collagène comme un indice structurel des cicatrices hypertrophiques et chéloïdes. Ces nodules absents des cicatrices matures, contiennent une forte densité de fibroblastes et de fibrilles de collagène unidirectionnelles dans une orientation caractéristique et très organisée. En outre, les chéloïdes et les cicatrices hypertrophiques diffèrent de la peau saine par une riche vascularisation, une grande densité de cellules mésenchymateuses, et un épaississement de la couche de cellules épidermiques. **Les tentatives visant à différencier cliniquement les chéloïdes des cicatrices hypertrophiques se sont révélées relativement inefficaces dans les phases précoces de leur formation.** Des différences cliniques apparaissent plus clairement pour les lésions matures. La différence histologique essentielle est la présence de faisceaux larges, rougeux et mats de collagène dans les chéloïdes, qui ne sont pas présents dans les cicatrices hypertrophiques.

1.2.4.3 Diagnostic

Le diagnostic est généralement basé sur l'évaluation visuelle de la lésion en référence à des caractéristiques conformationnelles de cicatrice hypertrophique ou de chéloïde [Berman *et al.*, 2009]. Cette méthode dépend énormément de l'expérience du clinicien en termes de caractérisation du tissu cicatriciel par observation directe et possède donc une robustesse de sensibilité limitée. Le cas échéant, le clinicien recourt à la biopsie d'un échantillon tissulaire pour la confirmation définitive et objective du diagnostic. Cependant, ceci nécessite des procédures de prélèvement et de préparation de coupes tissulaires pour une analyse anatomopathologique *ex vivo*, ce qui rend le travail diagnostique lourd et long, surtout pour les chéloïdes récurrentes. De plus, au cours du prélèvement de tissu cicatriciel, des corps étrangers et/ou infectieux peuvent s'introduire dans la



1.11.1:

1.11.2:

FIGURE 1.11 – Images de coupes histologiques de peau saine (1.11.1) et de peau cicatricielle hypertrophique (1.11.2), prélevées sur des oreilles de lapin dans le cadre de notre étude pré-clinique

cicatrice et peuvent à leur tour être la cause de formations hypertrophiques récidivantes.

C'est la raison pour laquelle l'approche en spectroscopie optique fibrée (ou "biopsie optique") proposée dans le cadre de notre thèse présente un intérêt pour ce type de diagnostic *in vivo*, simple et non-invasif (atraumatique).

Critères de performance d'une nouvelle technique diagnostique Quelque soit la méthode utilisée, l'efficacité est le critère le plus important pour la clinique. L'efficacité d'une nouvelle méthode est généralement évaluée par comparaison des résultats avec ceux donnés par une autre méthode de référence ("gold standard") qui est validée comme efficace en possédant des sensibilité et spécificité élevées. **Dû à l'accessibilité des tissus épithéliaux, tels que la peau, et à la haute efficacité diagnostique, de l'analyse histologique cette dernière reste le "gold standard" [Diagaradjane *et al.*, 2005].** Les critères de performance d'une nouvelle technique diagnostique telle que, dans notre étude la spectroscopie optique tissulaire, par rapport aux résultats obtenus par histologie sont calculés sous la forme de quatre résultats possibles pour un test diagnostique sur un échantillon de tissus/individus sains et pathologiques donné (cf. Tab. 1.2) :

- Vrai Positif (VP) : résultat positif du test effectué sur un sujet diagnostiqué par histologie comme malade ;
- Faux Positif (FP) : résultat positif du test effectué sur un sujet diagnostiqué par histologie comme sain ;
- Vrai Négatif(VN) : résultat négatif du test effectué sur un sujet diagnostiqué par histologie comme sain ;
- Faux Négatif (FN) : résultat négatif d'un test effectué sur un sujet diagnostiqué par histologie comme malade.

TABLE 1.2 – Définition des caractéristiques d’un test de dépistage.

		Pathologie	
		Présente	Absente
Resultat du Test de diagnostic	+	VP	FP
	-	FN	VN

A partir de ces quatre valeurs, la précision d’une méthode est caractérisée par deux paramètres ci-après :

- La Sensibilité (Se) : probabilité pour un sujet malade de présenter un test positif. Un test diagnostique est d’autant plus sensible que les sujets atteints de la maladie présentent plus souvent le signe “positif” (Equ. 1.16).

$$Se = \frac{VP}{VP + FN} \quad (1.16)$$

- La Spécificité (Sp) : probabilité pour un sujet sain de présenter un test négatif. Un test diagnostique est d’autant plus spécifique que les sujets sains présentent plus souvent le signe “négatif” (Equ. 1.17).

$$Sp = \frac{VN}{VN + FP} \quad (1.17)$$

Cependant, ces deux paramètres varient en sens inverse, si on varie un seuil de “positivité” pour désigner le signe d’un test. Par exemple, un seuil à valeur médiane d’une population donne la moitié de chance pour qu’un test soit “positif” et l’autre moitié pour qu’il soit négatif. Si on augmente ce seuil de “positivité”, on trouve forcément plus de sujets qui tombent dans la population “négatif”, le test devient donc plus spécifique. Donc, un compromis doit être trouvé entre la sensibilité Se et la spécificité Sp . La courbe “Receiver Operating Characteristic” (ROC, courbe caractéristique d’efficacité), est une représentation graphique de Se en fonction de $(1 - Sp)$ qui permet une évaluation plus globale d’une méthode diagnostique pour différents seuils de discrimination choisis. Comme illustré sur la figure 1.12, plus la surface sous cette courbe est grande, plus le test diagnostique est globalement “efficace”. Ainsi, dans le cas idéal, lorsque cette courbe possède une plus grande surface sous courbe (courbe A en trait gras), on peut séparer de façon optimale tous les positifs des négatifs, sans faux positif, ni faux négatif. B et C sont des courbes schématiquement plus réalistes pour les examens diagnostiques. Quel que soit le seuil, B a une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité que C.

En plus de Se et Sp , deux mesures permettent d’évaluer la probabilité de la maladie en fonction du résultat de test. Ce sont des paramètres beaucoup plus liés au futur diagnostic en clinique, parce qu’elles définissent la fiabilité du test :

- La Valeur Prédictive Positive (VPP) est la valeur prédictive d’un test positif. C’est-à-dire la capacité à prédire la présence d’une maladie,

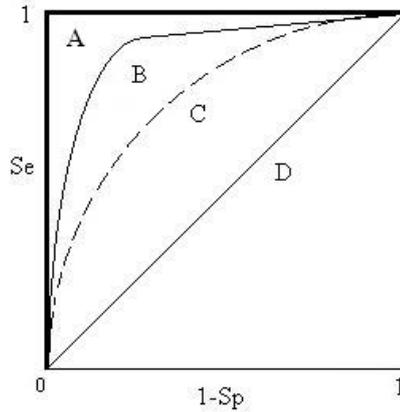


FIGURE 1.12 – Exemple de 4 courbes de ROC (A,B,C,D), avec Se la sensibilité et 1-Sp le taux de faux positif. Image adopté de [Landais and Jais, 2002]

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP} \quad (1.18)$$

– La Valeur Prédictive Négative (VPN) est la valeur prédictive d'un test négatif.

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN} \quad (1.19)$$

1.3 Méthodes de spectroscopie point par point appliquées au diagnostic tissulaire *in vivo*

Le développement de méthodes optiques pour le diagnostic non-invasif de tissus pathologiques est un enjeu actuel majeur en optique biomédicale. Les techniques optiques de diagnostic ont démontré leur fiabilité et leur capacité à fournir un diagnostic instantané de tissus malades. Les techniques spectroscopiques *in vivo* en photodiagnostic sont généralement utilisées pour obtenir et analyser le(s) spectre(s) d'intensité lumineuse collecté(s) par une sonde à fibres optiques sur une zone particulière d'un tissu. La figure 1.13 présente le schéma de principe de l'instrumentation de base utilisée pour la spectroscopie tissulaire. En général, une fibre ou plus conduit la lumière d'excitation jusqu'au tissu. Dans la plupart des configurations (résolutions spatiales et temporelles), plusieurs fibres optiques sont utilisées pour conduire la lumière réémise par le milieu jusqu'au système d'acquisition (spectromètre ou détecteur optique) pour la mesure spectrale. **L'intérêt de l'approche spectroscopique en clinique réside dans son caractère non-invasif et sa grande sensibilité à détecter des différences histologiques, même minimales [Zavadil *et al.*, 2005; Upile *et al.*, 2009].**

Les méthodes spectroscopiques développées pour l'étude des différents aspects tissulaires peuvent être classées en trois catégories : la spectroscopie résolue spatialement ("spatially resolved" ou en excitation continue), la spectroscopie résolue en temps ("time resolved" ou en

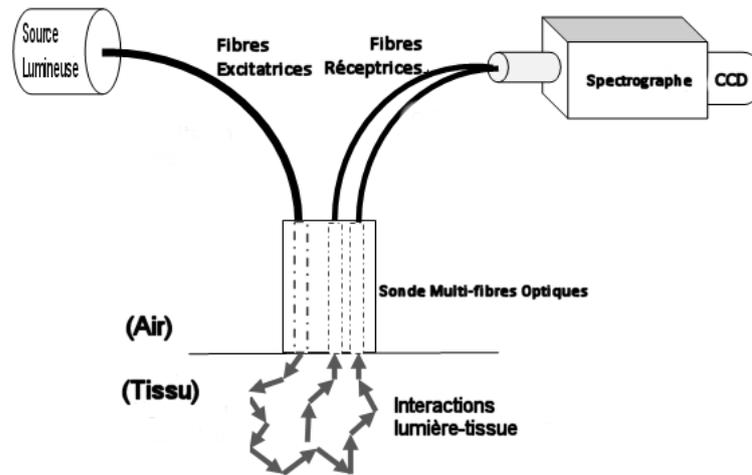


FIGURE 1.13 – Représentation schématique des principaux éléments constitutifs d’un système de spectroscopie fibrée résolue spatialement

excitation impulsionnelle) et la spectroscopie résolue en fréquence (“frequency resolved” ou excitation harmonique).

En spectroscopie résolue spatialement, une sonde multi-fibres est classiquement utilisée avec 1 fibre d’excitation (F_x : fibre excitatrice) et plusieurs fibres de réception (F_r). La position géométrique des fibres d’excitation et d’émission détermine différentes zones d’exploration dans le tissu (illustrée dans la figure 1.14), en fonction de l’ouverture numérique (ON) des fibres optiques. Schématiquement, dans le cas d’un milieu principalement absorbant, des zones coniques d’illumination/détection intersectent aux différentes profondeurs du tissu (les cônes A à la profondeur Pr_1 et B à la Pr_2 dans la figure), selon les distances interfibres les séparant. On estime alors que l’information recueillie est contenue dans ces zones d’intersection et que les profondeurs correspondantes déterminent donc la dimension d’exploration dans le tissu. En général, pour l’étude spectrale des tissus biologiques (absorbants mais surtout très diffusants) dans la bande visible, une distance interfibres de $250\mu m$ permet de détecter un signal d’intensité lumineuse ayant pénétré jusqu’à une profondeur de $100\mu m$.

Au contraire des mesures en régime d’excitation continue, la spectroscopie fibrée en résolution temporelle exploite souvent une seule distance entre les fibres d’excitation et d’émission. Le principe consiste à compter le nombre de photons arrivant à la fibre de réception au cours du temps et à en retirer de l’information (durée de vie de fluorescence, profil temporel de propagation des photons diffusés) liée à l’environnement biologique où les photons se sont créés (autofluorescence) ou propagés (diffusion élastique). Il s’agit d’une mesure de type réponse impulsionnelle. Pour générer cette impulsion de lumière de très courte durée, une source laser impulsionnelle est utilisée (pico-seconde) permettant une mesure relativement indépendante des parasites lumineux présent dans l’environnement. L’autre avantage des mesures temporelles est leur indépendance par rapport aux valeurs absolues d’intensité, car la mesure du profil temporel de fluorescence est plutôt liée à la durée de vie de fluorescence (un paramètre caractéristique de fluorophore). Donc, les mesures sont moins influencées par la variation inter- ou intra-individuelle [Ramanujam, 2000]. Cependant, la mesure des profils temporels d’intensité nécessite des capteurs très rapides (caméra à balayage de fente, capteur monophotonique [Wagnieres *et al.*, 1998]) et des sources d’excitation

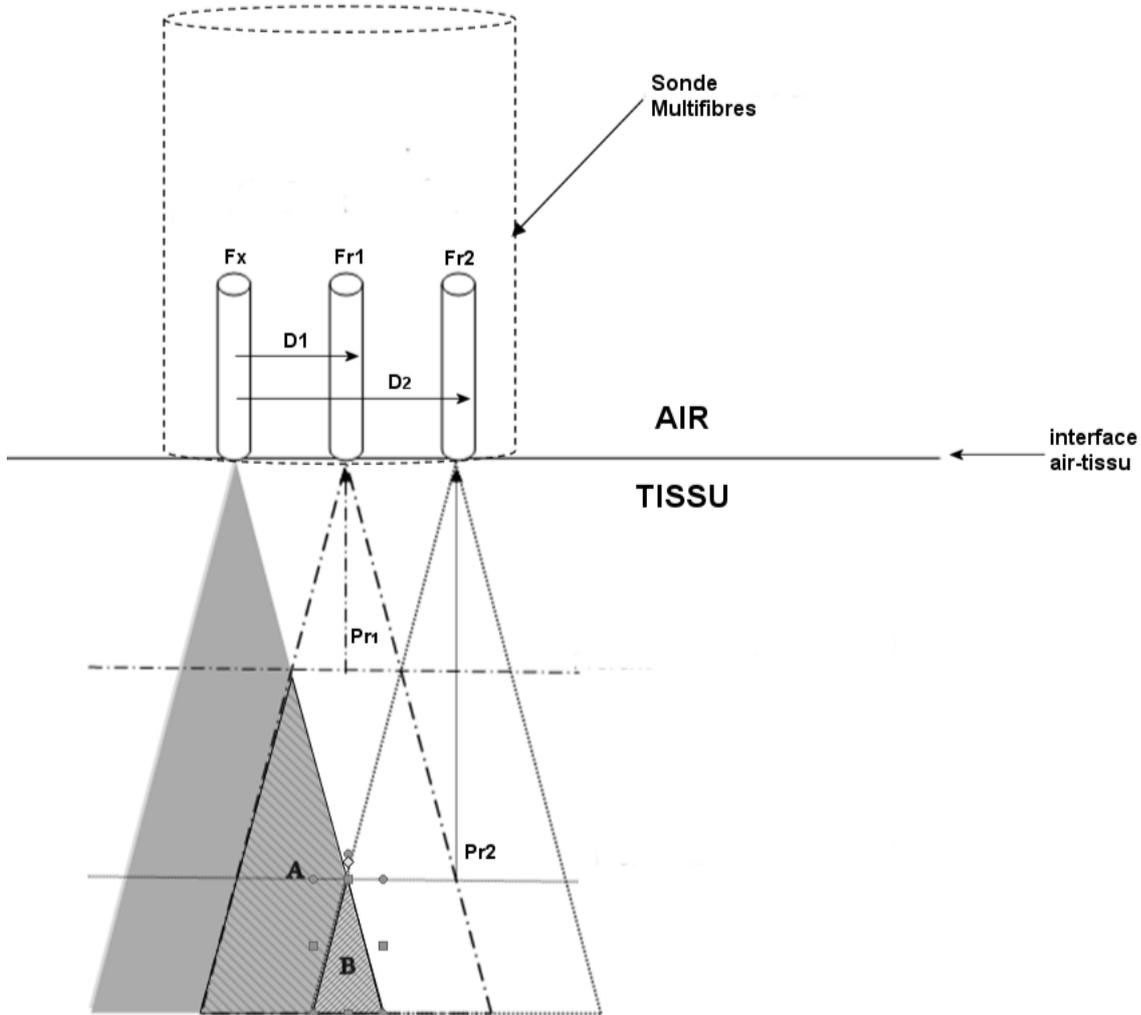


FIGURE 1.14 – Schéma illustrant les multiples zones d’exploration (les cônes A et B situés respectivement aux profondeurs de Pr_1 et Pr_2) permises par l’utilisation de plusieurs distances (D_1, D_2) entre fibre excitatrice (F_x) et fibres réceptrices (F_{r1}, F_{r2})

ultra-rapides qui sont beaucoup plus coûteuses que ceux utilisés pour la spectroscopie en excitation continue.

Enfin, quant à la spectroscopie fréquentielle, elle est utilisée pour estimer le changement en paramètre optique dans un milieu diffusant [Tuchin, 2007]. Le principe consiste à envoyer une lumière modulée en intensité et à analyser la réponse en amplitude et en phase du milieu à l’aide d’une transformation de Fourier [Arridge *et al.*, 1992; Tuchin, 1994; Chance *et al.*, 1998]. Pour détecter la variation de flux de photons arrivant au détecteur au cours du temps, des photomultiplicateurs sensibles à la phase (“phase-sensitive photomultiplier”) sont nécessaires.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons à la méthode résolue spatialement en considérant ses avantages de coût et de simplicité d’instrumentation. En revanche, en vue de développer un système associant plusieurs modalités pour avoir un diagnostic plus précis (c’est

à dire l'exploitation des différents phénomènes photophysiques), des contraintes techniques et technologiques doivent être envisagées.

Dans le domaine des pathologies cutanées, la plupart des travaux expérimentaux en spectroscopie ont été menés en Spectroscopie d'Autofluorescence (SAF ou "Light Induced Fluorescence Spectroscopy", LIF), Spectroscopie de Réflectance Diffuse (SRD ou "Diffuse Reflectance Spectroscopy", DRS) et Spectroscopie par Diffusion Simple (SDS ou "Light Scattering Spectroscopy", LSS) qui exploitent chacune un phénomène bio-optique dans des bandes spectrales spécifiques [Georgakoudi *et al.*, 2003]. Dans la section suivante, nous présentons le principe et l'application de chacune de ces méthodes dans la caractérisation tissulaire *in vivo*.

1.3.1 Spectroscopie d'autofluorescence

La spectroscopie de fluorescence induite par la lumière est l'une des techniques les plus utilisées sur le plan clinique et en sciences fondamentales. Elle est largement utilisée pour la localisation des lésions et la caractérisation des tissus biologiques *in vivo* en exploitant la présence des fluorophores endogènes ou exogènes.

Les fluorophores exogènes possèdent certains avantages, tels que des caractéristiques spectrales parfaitement connues et souvent un rendement quantique relativement élevé qui facilite la détection. Certains fluorophores exogènes après fixation préférentielle sur les tissus pour lesquels ils sont désignés, par exemple les tissus cancéreux, permettent de créer des zones contrastées entre les tissus sains et tumoraux, pour mieux les localiser. En revanche, l'emploi de fluorophores exogènes ou l'induction de fluorescence endogène par des molécules exogènes sont limités par la toxicité potentielle de ces molécules pour le corps humain. En comparaison, les fluorophores endogènes, qui sont l'une des cibles de notre étude, offrent une concentration et un rendement de fluorescence moins importants. Par contre, l'avantage de cette approche qui ne nécessite aucune injection de marqueur est qu'elle permet une procédure diagnostique véritablement et totalement non-invasive.

La fluorescence émise par ces fluorophores endogènes est appelée autofluorescence, dont la forme et l'amplitude de l'intensité spectrale sont fonction du tissu examiné. [Wagnieres *et al.*, 1998] ont mentionné que le spectre d'autofluorescence détecté sur la surface tissulaire dépend :

- de la concentration et la distribution spatiale des fluorophores,
- du statut métabolique,
- du microenvironnement biochimique et/ou biophysique du tissu,
- de la longueur d'onde d'excitation décidant quel type de fluorophore est ciblé,
- de l'architecture du tissu,
- de l'absorption de la lumière de fluorescence due à la variation de concentration et de distribution des chromophores, tels que l'hémoglobine et la mélanine.

Toutefois, tous les facteurs mentionnés ci-dessus peuvent varier significativement pendant le développement pathologique au sein d'un même type tissulaire, ce qui donne lieu à des expressions spectrales particulières pour les tissus sains et pathologiques. Le principe du diagnostic par spectroscopie d'autofluorescence repose donc sur cette relation (spectre-tissu), afin de détecter dans les spectres d'intensité d'AF des modifications liées à des anomalies tissulaires, même lorsque celles-ci sont encore invisibles pour l'œil humain.

1.3.1.1 Fluorophores endogènes des tissus biologiques

Parmi les fluorophores endogènes, quelques-uns sont plus particulièrement ciblés dans le diagnostic précoce des tissus épithéliaux pathologiques (notamment cancéreux) :

- Porphyrines : les porphyrines sont synthétisées chez les mammifères à partir de l'acide 5-aminolévulinique. Elles entrent dans la composition de l'hémoglobine et sont impliquées dans le transport de l'oxygène, donc jouent un rôle important dans la chaîne respiratoire de la cellule. Les porphyrines peuvent émettre de la fluorescence dans le rouge avec deux pics d'émission caractéristiques à environ 635 et 690nm. Leur excitation maximum se situe à peu près au même endroit de la bande de 'Soret' (la bande principale d'absorption de l'hémoglobine à 420nm). L'intensité de fluorescence émise par les porphyrines est déterminée principalement par la longueur d'onde d'excitation, mais varie aussi en fonction de la valeur de pH de l'environnement dans lequel elles se situent (une concentration importante de produits halogénés peut entraîner l'extinction de la fluorescence créée). De plus, les pics d'émission peuvent se décaler vers les longueurs d'onde plus hautes lors de l'hydrogénation de l'anneau pyrrole qui constitue leur structure moléculaire de base.[Wolfbeis, 1985; Stryer, 1995]
- Aminoacides : les aminoacides peuvent fluorescer dans la bande 320 – 360nm après absorption de lumière dans la bande UV (270 – 310nm). Deux fluorophores dans ce groupe, tyrosine et tryptophane, peuvent donner des signaux d'amplitude assez importante pour le diagnostic (extinctions molaires respectives $1500\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ et $6000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). L'intensité de leur fluorescence est aussi pH-dépendante et fonction de la température. Donc, elles sont utilisées pour sonder des ions (bromure, iodure et nitrate). Comme mentionné dans la section 1.2.3.1, ces deux fluorophores contenus dans la majorité des protéines se trouvent principalement dans les premières couches de la peau humaine, organe choisi pour notre étude.
- Protéines structurales : Les protéines structurales extra-cellulaires, comme le collagène et l'élastine, constituent des fluorophores majeurs dans le corps humain, parce qu'elles sont présentes dans quasiment tous les types de tissu [Richards-Kortum and Sevick-Muraca, 1996; Wagnieres *et al.*, 1998]. Les fibres de collagène sont formées de protéines rigides largement distribuées dans la peau, les os, les dents, etc. Elles absorbent la lumière du proche UV au bleu et fluorescent à des longueurs d'onde plus lointaines [Richards-Kortum and Sevick-Muraca, 1996]. Les fibres d'élastine sont des protéines flexibles dont l'absorption maximum se situe aux alentours de 350nm [Stryer, 1995]. Beaucoup de phénomènes pathologiques peuvent provoquer des changements de concentration de ces deux fluorophores, qui sont donc des indicateurs très importants pour le diagnostic.

- Flavines : les flavines sont des transporteurs d'électrons destinés à la réaction d'oxydation dans les organismes aérobique. Un dérivé de cette molécule, la Flavine Adénine Di-nucléotide, peut fluorescer dans sa forme oxydée. Les flavines constituent un groupe de fluorophores qui absorbent la lumière dans la bande spectrale entre 300 et 500nm. La fluorescence des flavines peut diminuer lors de la réaction avec, par exemple, le tryptophane ou certaines protéines de fixation, ce qui permet d'évaluer des mécanismes biologiques par la mesure spectrale. Cependant, compte tenu du fait que les bandes d'excitation et d'émission sont étendues et chevauchantes et mélangé avec celles d'autre fluorophores, la fluorescence des flavines n'est pas très exploitable pour discriminer différents types de tissus. [Wolfbeis, 1985; Stryer, 1995; Richards-Kortum and Sevick-Muraca, 1996]
- NADH et NADPH : les Nicotinamide Adénine Di-nucléotide (NAD) et Nicotinamide Adénine Di-nucléotide Phosphate (NADP) sont d'autres molécules fluorescentes présentes dans la mitochondrie et impliquées dans le métabolisme cellulaire. Au contraire des flavines, la forme réduite de ces molécules (NADH et NADPH) fluoresce après absorption de lumière, dont le pic maximal se situe à 340nm. [Wolfbeis, 1985] a rapporté que l'émission de fluorescence de NADH et NADPH provient de la moitié nicotinamide, mais pas de celle d'adénine. La fluorescence de ces éléments moléculaires peut être utilisée pour l'étude cinétique des réactions déshydrogénases ou pour doser les ions métalliques ou substrats entrant dans ces réactions. Par ailleurs, lorsqu'elles sont liées à certaines protéines, leur maxima d'excitation et d'émission peuvent significativement changer. Des maxima de 325/440nm et 365/478nm (excitation/émission) sont publiés dans la littérature [Andersson-Engels and Wilson, 1992; Ramanujam, 2000].

Le tableau 4.4 ci-après recense les fluorophores endogènes parmi les plus étudiés dans la littérature. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont données en fonction des études réalisées, sachant que les bandes totales d'absorption et d'émission des fluorophores sont relativement larges (quelques dizaines à centaines de nanomètres). Les figures 1.15.1 et 1.15.2 représentent les spectres d'excitation et d'émission mesurés pour différents fluorophores montrant la largeur de leurs bandes spectrales.

Dans le cadre de notre étude sur la peau humaine ou animale, les fluorophores d'intérêt sont le collagène, l'élastine, les FAD, le NADH et la kératine. Les acides animés ont été impliqués dans des études cutanées pour détecter la prolifération de la couche épidermique au cours de certaines pathologies, mais nécessitent des excitations dans la bande UV (260 – 290nm) qui posent éventuellement des problèmes de sécurité pour le patient (radiations d'UV mutagènes, dégagement de gaz ozone). Donc, nous les excluons de notre étude.

1.3.1.2 Avantages et limites des méthodes existantes

Dans la plupart des développements pathologiques, la composition biochimique du tissu est modifiée avant même que des changements morphologiques soient observables par des méthodes d'imagerie conventionnelles. La spectroscopie d'autofluorescence est sensible à ces changements biochimiques et permet donc de détecter des altérations tissulaires, même subtiles dès leurs états précoces. [Zavadil *et al.*, 2005]

TABLE 1.3 – 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] [Ramanujam, 2000]	275 220, 280	350 350
Protéines fibreuses et élastiques		
- Collagène [Andersson-Engels and Wilson, 1992] [Ramanujam, 2000] [Wu and Qu, 2006b]	340, 285, 270 325 349,457	395, 310, 395 400, 405 410, 540
- Élastine [Andersson-Engels and Wilson, 1992] [Ramanujam, 2000] [Wu and Qu, 2006b]	460, 425, 360, 260 290, 325 349,457	520, 490, 410, 410 340, 400 400, 510
Enzymes et coenzymes		
- FAD, flavines [Andersson-Engels and Wilson, 1992] [Ramanujam, 2000]	440 375 à 450	520 535
- NADH [Andersson-Engels and Wilson, 1992] [Ramanujam, 2000]	350 260, 351	460 440, 460
- NADPH [Ramanujam, 2000]	336	464
Lipides [Ramanujam, 2000]		
Phospholipides	436	540, 560
Lipofuscine	340 - 395	430 - 460, 540
Céroïde	340 - 395	430 - 460, 540
Porphyrynes et dérivatives		
[Andersson-Engels and Wilson, 1992] [Richards-Kortum and Sevick-Muraca, 1996] [Wu and Qu, 2006b]	400 400 - 450 457	610, 675 630 - 690 680
Keratine		
[Kollias <i>et al.</i> , 2002] [Wu and Qu, 2006b]	370 349,457	460 420,530

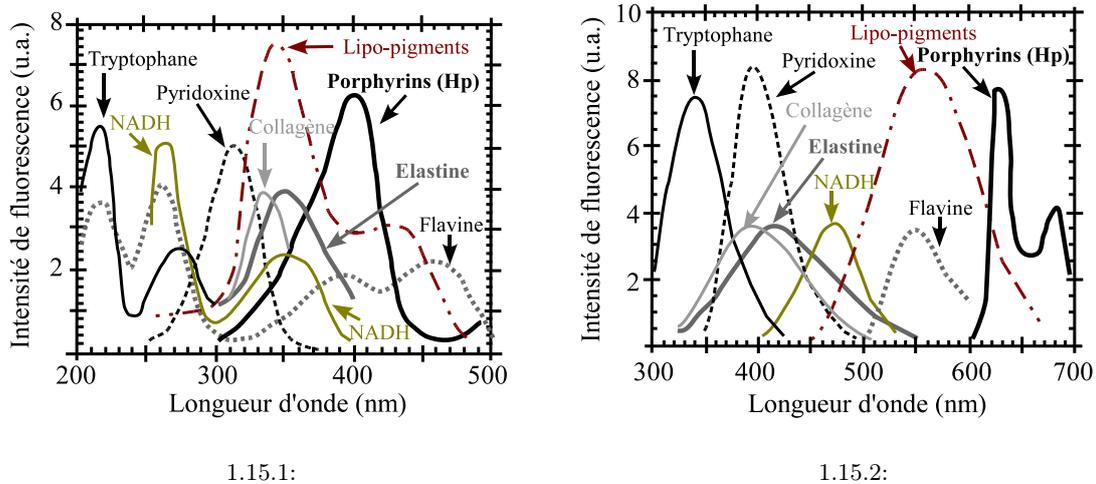


FIGURE 1.15 – Spectres d’absorption (Fig. 1.15.1) et d’émission (Fig. 1.15.2) de quelques principaux fluorophores endogènes (modifié de [Wagnieres *et al.*, 1998]).

Cependant, “la contrainte” de la méthode provient paradoxalement de sa richesse d’information. Le spectre d’intensité d’auto fluorescence mesuré sur le tissu est un mélange d’informations liées à chaque fluorophore. De plus, ce spectre peut être éventuellement modulé par la présence des chromophores non-fluorescents (hémoglobine, mélanine, etc.). Donc, l’interprétation quantitative des spectres pour connaître les mécanismes et l’origine des modifications pathologiques devient très difficile. Les critères de discrimination spectrale entre tissus sains et pathologiques sont souvent déterminés de façon empirique. **Un grand nombre de travaux de recherche actuels sont ainsi consacrés au développement d’algorithmes de traitement des signaux, soit pour séparer les informations afin d’analyser individuellement chaque fluorophore, soit pour déterminer de manière analytique des indicateurs spectraux pour la classification. Les méthodes de classification sont détaillées dans la section 4.2 du chapitre 4.1.2.**

Depuis de nombreuses années, la spectroscopie d’auto fluorescence a gagné une place importante dans le diagnostic en clinique, plus spécialement en oncologie. La sensibilité de cette technique à la composition biochimique des tissus permet au clinicien de distinguer *in vivo* les tissus cancéreux de ceux normaux par une simple classification spectrale, sans entrer dans le détail du mécanisme carcinogène.

De nombreux travaux ont été menés dans le domaine du diagnostic du cancer dans divers organes du corps humain, tels que la bouche [Mallia *et al.*, 2008; Muller *et al.*, 2003], le sein [Hage *et al.*, 2003], la vessie [Anidjar *et al.*, 1998] et la peau [Diagaradjane *et al.*, 2005; Heintzelman *et al.*, 2000; Li and Xie, 2005; Panjehpour *et al.*, 2002; Na *et al.*, 2000].

L’accessibilité directe de la peau humaine lui confère une grande adaptabilité pour le diagnostic par cette méthode d’auto fluorescence. [Brancaleon *et al.*, 2001] ont utilisé des excitations d’AF à 295 et 350nm en vue de diagnostiquer les cancers cutanés sur 18 patients atteints de lésions non-mélaniques (“Non-Mélanoic Squamous Carcinoma”, NMSC). Les résultats montrent que par rapport aux tissus sains, les spectres d’AF de NMSC ont des amplitudes plus importantes à une excitation à 295nm, mais significativement diminuées pour une excitation à 350nm. Les

auteurs ont attribué ces modifications spectrales d'une part, à l'hyperprolifération cellulaire au sein de l'épithélium générant une fluorescence augmentée liée au tryptophane et d'autre part, à la dégradation de la matrice extracellulaire diminuant significativement l'intensité de fluorescence liée au collagène.

[Kollias *et al.*, 2002] ont également appliqué la SAF en dermatologie préclinique. Ils ont comparé les spectres acquis sur la peau de deux groupes de souris albinos âgées respectivement de 6 semaines et 6 mois. Ils ont trouvé que la fluorescence liée au tryptophane (pic d'excitation à 295nm) diminue avec l'âge, tandis que celle liée au collagène digestible par pepsine (pic d'excitation à 335nm) augmente en fonction de l'âge. L'observation de cette relation entre les spectres d'autofluorescences et le vieillissement ouvre une voie au test de produits cosmétiques anti-âge *in vivo*.

La fluorescence a également été utilisée pour examiner et/ou caractériser la condition de tissus cutanées, telles que le psoriasis et le vieillissement. En utilisant un spectrofluorimètre équipé d'un laser à 442nm, [Bissonnette *et al.*, 1998] ont constaté qu'un pic de forte émission de fluorescence *in vivo* autour de 635nm était lié à l'apparition des plaques psoriasiques chez 45% de 75 patients (atteints de psoriasis). Ce pic absent de la peau d'apparence normale des patients psoriasiques et aussi de la peau de 66 patients atteints d'autres maladies dermatologiques a été utilisé par les auteurs pour diagnostiquer le psoriasis. Après une correction de l'intensité d'autofluorescence par rapport à la pigmentation de la peau et des rougeurs, [Na *et al.*, 2001] ont montré une augmentation annuelle de 2% en intensité spectrale à 375nm (excitation à 330nm). Selon les auteurs, cette observation est probablement due à une augmentation des produits terminaux de la glycoyse des protéines liée à l'âge, et intervient dans la formation du réseau de collagène [Haus *et al.*, 2007].

Toutefois, il faut noter que l'application actuelle de la spectroscopie d'autofluorescence seule en clinique est parfois limitée : d'une part, par sa sensibilité aux modifications inflammatoires (pouvant entraîner des faux positifs), et d'autre part, par le mélange d'informations d'origines biochimiques et morphologiques sur les spectres d'intensité d'AF. Pour résoudre ces problèmes, les approches développées depuis plus d'une dizaine d'années concernent essentiellement [Drezek *et al.*, 2001; Georgakoudi *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2003] :

- la modélisation des interactions de la lumière (excitation et émission d'AF) avec les tissus afin d'en déduire des méthodes de correction des spectres d'AF et d'extraction des spectres de fluorescence intrinsèque ;
- **l'exploitation et la combinaison de données spectrales issues d'autres modalités utilisables simultanément pour compléter le diagnostic, l'axe de recherche des travaux de la présente thèse.**

1.3.2 Spectroscopie de diffusion simple

1.3.2.1 Principe

La Spectroscopie de Diffusion Simple (SDS ou "Light Scattering Spectroscopy", LSS) consiste à analyser la rétro-diffusion de la lumière par les tissus, mais pour les photons qui ne changent qu'une seule fois de direction pendant leur propagation dans le milieu. En analysant cette partie

de photons “mono-diffusés”, des informations quantitatives liées à la morphologie des particules diffusantes constituant le tissu biologique peuvent être extraites. Parce que la plupart de ces particules (structures nucléaires ou sub-nucléaires) possède une taille d’ordre de grandeur similaire aux longueurs d’onde de la lumière blanche (UV-Visible), la théorie de Mie peut être utilisée pour expliquer le comportement de ces photons simplement diffusés. La théorie de Mie dit que la section efficace d’une particule de rayon r subissant la diffusion de Mie oscille à des valeurs d’environ deux fois sa section. Cette oscillation périodique en r/λ possède une période dépendant du rapport d’indices de réfraction entre la particule et le milieu environnant. Les changements de distribution de taille des cellules ayant lieu au cours du développement de la pathologie peuvent éventuellement modifier ce rapport d’indices et en conséquence changer la forme du spectre collecté.

La figure 1.16 montre l’efficacité de diffusion (la section efficace divisée par la section physique) de sphères (de 1 et $2\mu\text{m}$ en diamètre) en fonction de la longueur d’onde. Ces microsphères de polymère ($n \approx 1.5$) immergées dans un milieu aqueux ($n_{eau} = 1.333$) donnent un rapport d’indice de 1,128. Pour ces deux types de sphères, les efficacités de diffusion “oscillent” en fonction de la longueur d’onde avec une amplitude dont la valeur maximale est 2 fois plus grande que la minimale. En utilisant des modèles adéquats comme ceux de [Palmer *et al.*, 2003a], la taille et l’indice de réfraction des particules peuvent être estimés.

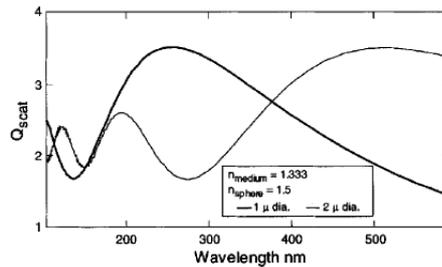


FIGURE 1.16 – Efficacité de diffusion (section efficace divisée par section physique) pour les phères de polymère de 1 et $2\mu\text{m}$ de diamètre [Mourant *et al.*, 1995].

1.3.2.2 Avantages et limites

L’obtention du spectre d’intensité relié à la partie de diffusion simple est assez délicate, parce que cette partie de photons en faible quantité est noyée dans la diffusion multiple. Deux techniques sont utilisées pour récupérer le spectre de cette partie de photons du spectre de réflectance globale (diffusion multiple et simple).

Une méthode consiste à utiliser un modèle de réflectance diffuse [Zonios *et al.*, 1999] pour restaurer le spectre de diffusion multiple. Ensuite, le spectre ainsi assimilé à la diffusion multiple est soustrait de celui mesuré sur le tissu pour obtenir le spectre de diffusion simple. Cependant, [Lau and Scepanovic, 2009] ont indiqué que le spectre résiduel obtenu par la soustraction entre les spectres mesuré et modélisé ne pouvait pas représenter la partie de diffusion simple par l’épithélium. En effet, l’amplitude de ce spectre est largement supérieure à celle pour le spectre de

diffusion simple réel et ne dépend pas périodiquement de la longueur d'onde (comme décrit par la théorie de Mie). Les auteurs ont attribué cette incohérence à l'imperfection du modèle utilisé qui ne prend pas en compte la distribution inhomogène de l'hémoglobine. En considérant ce facteur les auteurs ont induit un modèle avec agglomération du sang ("vessel packing"), et sont arrivés à obtenir des spectres plus périodiques avec une amplitude plus proche de la réalité.

Une autre méthode pour obtenir le spectre de diffusion simple est d'utiliser la lumière polarisée [Backman *et al.*, 1999; Sokolov *et al.*, 1999]. Cette méthode est basée sur le fait que la lumière simplement diffusée peut garder sa polarité, tandis que la partie multi-diffusée la perd après plusieurs changements de direction de propagation des photons. Ainsi, en utilisant des filtres polarisant, on peut "marquer" les photons et distinguer la portion de diffusion simple à la sortie du tissu par leur polarité. Toutefois, cette méthode nécessite des modifications instrumentales au niveau de la source lumineuse et de la partie de réception de lumière, ce qui complique la conception du système.

Une autre limitation de la SDS est sa profondeur d'exploration, du fait que les photons simplement diffusés sont réfractés par les structures nucléaires des cellules qui se situent naturellement dans les couches très superficielles. A cause de ces difficultés et de la complexité pour obtenir un spectre de diffusion simple, la méthode SDS reste globalement moins exploitable et nous semble donc moins "intéressante" pour l'instant.

1.3.3 Spectroscopie de Réflectance Diffuse

La Spectroscopie de Réflectance Diffuse est une méthode de mesure de l'intensité spectrale de la lumière émise par un milieu diffusant (diffusion élastique) soumis à une lumière d'irradiation large bande (typiquement entre 350 et 800nm).

1.3.3.1 Principe

Les tissus biologiques tels que les muqueuses ou la peau sont des milieux optiquement absorbants et très diffusants. Lorsqu'un tissu biologique est illuminé à l'aide d'une source lumineuse large bande, les photons entrant dans le tissu s'y propagent en étant diffusés et absorbés. La diffusion dite élastique s'opère sans perte d'énergie (les photons gardent la même longueur d'onde tout au long de leur propagation). Une partie des photons ressortant du tissu est captée par des instruments de mesure spectroscopique ; en configuration métrologique de réflexion, la mesure est effectuée sur le même plan que celui d'incidence de la lumière d'excitation. La quantité de photons qui sort du tissu dépend des paramètres optiques du milieu biologique, qui peut notamment s'exprimer sous la forme des coefficients de diffusion (μ_s), d'absorption (μ_a) et d'anisotropie (g). Donc, la mesure de l'intensité de lumière rétro-diffusée donne une information sur ces 3 paramètres caractéristiques des tissus à une échelle macroscopique.

En outre, beaucoup de facteurs, comme la taille et l'indice de réfraction variés des particules diffusantes (cellules, organites subcellulaires, fibres de collagène), la présence et le taux d'oxygène de l'hémoglobine modifient les spectres de RD mesurés. Les changements d'amplitude et de forme de ces spectres peuvent ainsi être utilisés pour distinguer les tissus sains et anormaux et être corrélés aux modifications tissulaires (morphologie cellulaire et vascularisation).

1.3.3.2 Exploitation des données et applications

Le principal avantage de la technique de SRD est la forte intensité du signal de diffusion (plusieurs ordres de grandeur supérieur au signal d'AF) qui permet d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit (RSB ou "Signal to Noise Ratio", SNR) pour la détection. Le dispositif instrumental est simple et peu coûteux. La mesure est rapide (quelque microsecondes).

La SRD est sensible aux changements de structure sub-cellulaire, tels que la taille des noyaux et des mitochondries, le ratio noyau-cytoplasme et la densité cellulaire qui constituent des paramètres d'intérêt pour l'analyse histopathologique [Mourant *et al.*, 1995]. Elle est aussi sensible aux modifications pathologiques non détectables par les méthodes conventionnelles, car elle permet d'explorer des changements "ultrastructuraux" au dessous de la résolution maximale ou résolution d'Abbe (à l'échelle entre $1\mu m$ et $400nm$ [Mccutchen, 1967]) donnée par la microscopie optique [Upile *et al.*, 2009].

En général, le spectre d'intensité de réflectance diffuse $R(\lambda)$ (la réponse spectrale du tissu à la lumière incidente) est obtenu en divisant le spectre d'intensité retro-diffusée du tissu biologique par celui mesuré sur un "standard de diffusion" comme référence (Eq. 1.20).

$$R(\lambda) = \frac{I(\lambda)_{tissu} - I(\lambda)_{tissu\ background}}{I(\lambda)_{ref} - I(\lambda)_{ref\ background}} \quad (1.20)$$

où $I(\lambda)_{tissu}$ et $I(\lambda)_{ref}$ sont les spectres d'intensité mesurés sur le tissu et le standard respectivement. $I(\lambda)_{background}$ est une mesure sur l'intensité du "fond". Pour distinguer des tissus sains et pathologiques, différents indicateurs sont extraits des spectres $R(\lambda)$.

Plusieurs études sur les tissus du colon [Zonios *et al.*, 1999; Koenig *et al.*, 1998], de la vessie [Koenig *et al.*, 1998; Péry *et al.*, 2005], du sein, de la bouche et de la peau [Dawson *et al.*, 1980; Wallace *et al.*, 2000a; Diaz, 2009] ont montré des résultats prometteurs dans l'application de cette technique pour le diagnostic *in vivo* en cancérologie.

Par exemple, un modèle semi-empirique a été développé par [Dawson *et al.*, 1980] pour décrire la peau humaine. Dans ce modèle, la peau est considérée comme constituée de 4 couches possédant chacune des propriétés optiques différentes. En supposant que la quantité de lumière réfléchie par la première couche soit négligeable, ils ont trouvé que :

$$\log\left(\frac{1}{R(\lambda)}\right) = \sum_{i=1}^{n=3} A_i(\lambda) + \log(R_4(\lambda)) \quad (1.21)$$

où $\log\left(\frac{1}{R(\lambda)}\right)$ est Logarithme de l'Inverse du Spectre Réflectance (LISR). A_i signifie l'absorbance d'une des trois premières couches du modèle optique de la peau humaine, et $\log(R_4(\lambda))$ est la réflectance de la dernière couche (plus profonde). Utilisant les valeurs de la courbe LISR à plusieurs longueurs d'onde (510, 543, 560, 576 et $610nm$), les auteurs ont calculé un indice d'érythème qui permet de quantifier la concentration en hémoglobine du tissu cutané. En plus, une

correction approximative a été apportée sur le calcul de cet indice afin de prendre en compte l'influence de la mélanine sur le résultat. Bien que les indices obtenus dépendent de la saturation en oxygène dans le sang, ils peuvent être utilisés comme paramètres de caractérisation de diverses pathologies liées à la variation vasculaire.

Brièvement, un autre modèle établi sur la base de l'analyse du LISR a été reporté par [Koenig *et al.*, 1998]. Le modèle était utilisé pour décrire la réflectance diffuse mesurée sur la vessie et le colon. En bref, le spectre de réflectance est tout d'abord converti en absorbance par l'équation 1.6. Puis, une ligne est ajustée à la courbe spectrale entre la bande 640 – 820nm (ajustement linéaire). Cette ligne ainsi trouvée représente approximativement la contribution de la diffusion optique au spectre d'absorbance dans cette bande. Ensuite, cette ligne est prolongée vers les longueurs d'onde UV par extrapolation linéaire, afin de couvrir toute la bande spectrale. Cette droite est alors soustraite du spectre d'absorbance initial pour obtenir une courbe reliée uniquement au phénomène d'absorption. La concentration du sang est estimée à partir des intensités spectrales à 555 et 577nm, qui sont deux pics d'absorption pour déoxy- et oxy-hémoglobines. Ces paramètres trouvés sont utiles pour la discrimination diagnostique entre les tissus néoplasiques et non-néoplasiques, avec des taux de sensibilité et spécificité de 91% et 60% respectivement. Les auteurs ont imputé la basse spécificité à la grande quantité de sang présente au niveau du tissu inflammatoire pendant la néoplasie.

[Zonios *et al.*, 1999] ont développé un modèle théorique pour décrire la réflectance diffuse mesurée, en fonction des coefficients d'absorption μ_a et de diffusion μ_s . Partant de l'approximation de diffusion de l'équation de transfert radiatif, les auteurs déduisent une équation qui lie la réflectance mesurée aux coefficients optiques et aux paramètres définies par la géométrie de la sonde optique utilisée. Ces paramètres sont des valeurs fixes pour une sonde donnée, et sont déterminés *a priori* par des procédures de calibrage sur fantôme. Utilisant ce modèle, ils reconstruisent des spectres de RD en cohérence avec ceux mesurés sur les tissus sains et adénomateux du colon. Ce modèle a été aussi utilisé dans des problèmes inverses pour calculer des coefficients optiques ou la concentration d'un ou deux chromophores dans les tissus du col de l'utérus, de la bouche et de l'oesophage de Barrett. Tous les paramètres obtenus par le modèle peuvent être utilisés comme indicateurs pour distinguer les tissus anormaux de ceux normaux.

[Wallace *et al.*, 2000a] ont extrait des paramètres quantitatifs liés à la forme des courbes de RD (surfaces sous courbe, pentes, intensités spectrales pour certaines bandes spectrales) comme indicateurs discriminants entre des mélanomes et des lésions bénignes. En utilisant un algorithme de classification par réseau de neurones artificiels, ils ont atteint des valeurs de spécificité de 51% et de sensibilité de 80%.

1.3.4 Approches de spectroscopies multi-modalités

Les techniques spectroscopiques précédemment décrites sont sensibles chacune à des modifications complémentaires d'un aspect tissulaire (composition biochimique, propriété optique et morphologique). La combinaison de ces techniques peut éventuellement augmenter la performance du diagnostic en termes de sensibilité et spécificité, parce qu'avec les informations données par chaque méthode, le clinicien a une vue plus globale sur la modification pathologique et peut effectuer un diagnostic plus précis.

Depuis plus d’une décennie, des études ont été mesurées en spectroscopie multimodale et ont permis d’obtenir des résultats très convaincants. [Georgakoudi *et al.*, 2001] ont utilisé une Spectroscopie Trimodale (STM ou “Trimodal Spectroscopy”, TMS) pour diagnostiquer les tissus dysplastiques dans le cas de l’oesophage Barret. Les résultats ont été obtenus en analysant les spectres mesurés sur 56 sites (16 patients sains, 26 Non-Dysplastiques (ND), 7 Dysplastiques de Basse Grade (DBG), 7 Dysplastiques de Haute Grade (DHG)) avec 3 types de spectroscopies (SAF, SRD et SDS). En combinant les informations provenant de chacune de ces techniques différentes, la spécificité est accrue de 5% pour distinguer les tissus DHG des tissus non-DHG et les tissus ND des tissus dysplastiques (DHG et DBG).(Tab. 1.4)

TABLE 1.4 – Performance de différentes techniques spectroscopiques pour la classification des tissus Non-Dysplastiques (ND), Dysplastiques de Basse-Grade(DBG) et de Haute-Grade (DHG) dans l’oesophage de Barrett (modifié de [Georgakoudi *et al.*, 2001]).

	HGD vs (LGD and NDB)		(LGD and HGD) vs NDB	
	Sensibilité	Spécificité	Sensibilité	Spécificité
Autofluorescence(SAF)	100%	100%	79%	88%
Réflectance Diffuse(SRD)	86%	100%	79%	88%
Lumière Diffusée Simple(SDS)	100%	91%	93%	96%
Trimodale(TMS)	100%	100%	93%	100%

La même amélioration a été observée pour les études du cancer précoce du col de l’utérus avec le même système [Georgakoudi *et al.*, 2002]. Un plus grand nombre d’échantillons (96 sites dont 50 sains (“Normal Squamous Ectocervical”, NSE), 5 bénins (“Benign”, B), 16 métaphasiques (“Squamous Metaplasia”, SQM) et 13 cancéreux (“Squamous Intraepithelial Lesion”, SIL)) a été inclu dans cette étude et une méthode de validation croisée a été utilisée pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (Tab. 1.5). Les auteurs sont parvenues à distinguer les tissus SILs de ceux non-SILs avec des valeurs de sensibilité et spécificité supérieures à 90%.

TABLE 1.5 – performance des différentes techniques spectroscopiques pour séparer les SIL de non-SIL (modifié de [Georgakoudi *et al.*, 2002]).

	Non-SILs Biopsie vs. SILs		Non-SILs vs. SILs	
	Sensibilité	Spécificité	Sensitivité	Spécificité
SAF	62%	67%	62%	92%
SRD	69%	57%	62%	82%
SDS	77%	71%	77%	83%
STM	92%	71%	92%	90%

[Palmer *et al.*, 2003b] et [Breslin *et al.*, 2004] utilisent la combinaison de SAF à plusieurs longueurs d’onde d’excitation et de la SRD pour distinguer des tumeurs bénignes et malignes de sein *in vitro*. Les mesures d’autofluorescence sont effectuées entre 310 et 600nm avec une excitation dans l’intervalle 300 – 460nm (par pas de 20nm). Les spectres d’intensité de réflectance diffuse sont enregistrés entre 300 et 600nm. Ces chercheurs ont utilisé l’approche diagnostique en analysant les formes des spectres à l’aide d’algorithmes de type Machine à Vecteur de Support (MVS ou “Support Vector Machine”, SVM) et d’Analyse en Composantes Principales (ACP ou “Principal Component Analysis”, PCA) [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.

Malgré certains cas où la spectroscopie multimodalité ne fournit pas une grande augmentation en termes de sensibilité et spécificité pour la classification biclasse, plusieurs modalités exploitant différents aspects tissulaires (donc possédant des sensibilités variées aux tissus différents) peuvent augmenter l'efficacité du diagnostic multiclassé. Dans une étude menée sur le col de l'utérus, [Chang *et al.*, 2005] ont observé que la SAF en multi-excitation donne dans la plupart des cas une meilleure performance de détection des tissus précancéreux, alors que la SRD permet de mieux détecter les lésions intraépithéliales de haut grade.

1.4 Objectifs des travaux de thèse

Les trois sections précédentes du chapitre 1 ont permis de poser les problèmes liés au diagnostic de maladies dermatologiques, et plus particulièrement des cicatrices hypertrophiques, à l'aide de méthodes conventionnelles. Pour répondre à ces problématiques clairement posées en clinique, nous avons présenté les avantages et les principes de plusieurs techniques spectroscopiques pour le diagnostic *in vivo* et non invasif. L'étude bibliographique nous permet de définir précisément les objectifs des travaux de notre sujet de thèse : développement d'une méthode de diagnostic tissulaire par spectroscopie bimodale en multi-excitation d'AF et de RD résolue spatialement et son application pour l'identification de lésions hypertrophiques *in vivo* suivant trois grands axes :

- Mise en point d'instrumentation ;
- Validation expérimentale de notre système à ce genre de test diagnostique ;
- Traitement de données spectroscopiques multi-dimensionnelles en vue d'une classification automatique de types de tissu.

1.4.1 Développement instrumental

L'objectif est de poursuivre le développement du dispositif instrumental existant au laboratoire pour améliorer ses performances et pour qu'il soit adapté à notre expérimentation. Les points d'amélioration concernent : 1) la source d'excitation afin d'augmenter l'intensité et/ou élargir la bande d'excitation ; 2) la sonde fibrée pour optimiser le couplage optique et augmenter aussi la puissance d'excitation en particulier en dessous de $400nm$; 3) la partie de réception afin de raccourcir les temps de mesure et d'améliorer la qualité du signal mesuré. Plus précisément, le cahier des charges défini pour le développement de notre système vise les modifications suivantes :

- Fournir des pics d'excitations dans la gamme spectrale UV-visible (spécifiquement entre 350 et $450nm$) suffisamment étroits et puissants pour obtenir ensuite un bon RSB des spectres d'intensités d'AF mesurés (en particulier pour les longueurs d'onde d'excitation inférieure à $380nm$) et une excitation à large bande "unique" ($350 - 700nm$, cf. chapitre suivant) pour la mesure de réflectance diffuse ;
- Améliorer le couplage optique pour l'injection de la lumière de la source dans la ou les fibre(s) d'excitation ;

- Gérer de façon automatique la synchronisation entre les différentes excitations et les acquisitions spectrales ;
- Intégrer tous les éléments des chaînes d’excitation et d’acquisition dans un rack mobile, en vue de la future utilisation en clinique ;

Suite aux améliorations techniques apportées au système, plusieurs étapes méthodologiques (réglage, calibrage) sont encore nécessaires afin d’obtenir des résultats précis de mesure (justes et fidèles), tout en corrigeant ou en compensant les variations/déviations intrinsèques du système au cours des expérimentations.

1.4.2 Validation expérimentale

Un des objectifs de cette thèse est d’évaluer la capacité de la spectroscopie bimodale pour la caractérisation *in vivo* de cicatrices hypertrophiques et de tissus cicatriciels normaux. Préalablement à une étude en clinique, un modèle pré-clinique capable de fournir des échantillons représentatifs dans ce type d’étude dermatologique pour la mesure spectroscopique, est un élément crucial pour valider expérimentalement les performances. En outre, un protocole expérimental doit assurer le bon déroulement de l’expérimentation et, à certain niveau, la répétabilité des résultats obtenus.

Les réflexions concernant le modèle animal et le protocole mis en oeuvre sont détaillés dans le chapitre 3. De plus, les résultats des analyses histologiques des lames de coupes de tissus prélevés sont aussi donnés dans ce chapitre.

1.4.3 Traitement des signaux et des données

Notre objectif final est de développer et de valider une méthode automatique de classification de tissus cutanés (non cicatriciels et cicatriciels ou hypertrophiques et non hypertrophiques) en analysant les données spectrales. Pour atteindre cet objectif, les algorithmes développés doivent être capables de répondre aux problèmes suivants :

- Correction de la forme des spectres,
- Débruitage ou lissage des spectres en conservant leurs principales caractéristiques de forme générale,
- Normalisation des spectres par rapport aux variations de puissance de la source d’excitation,
- Analyse des spectres acquis et élimination automatique de spectres “erronés”,
- Extraction automatique de caractéristiques spectrales représentant la forme de chaque groupe de spectres,
- Sélection d’un jeu de caractéristiques discriminantes pour une classification efficace (optimale),
- Validation du modèle de classification en donnant un résultat de performance de façon la moins biaisée possible.

Basé sur une étude bibliographique des méthodes utilisées aux différentes étapes de classification (prétraitement, extraction, sélection de caractéristique et classification), la solution

méthodologique développée et les résultats obtenus sont présentés en chapitre 4.

2

Développement Instrumental

Ce chapitre présente tout d'abord un état de l'art bibliographique des principales solutions technologiques développées et mises en œuvre en termes de source d'excitation, de sonde fibrée et système de détection spectroscopique par différentes équipes dans le monde pour réaliser des mesures spectroscopiques *in vivo* multimodalités. Ensuite, les caractéristiques principales du système instrumental de spectroscopie fibrée développé au laboratoire sont présentées, ainsi que les modifications et les améliorations apportées pour répondre aux besoins spécifiques de notre étude expérimentale.

2.1 Etat de l'art des solutions technologiques pour les systèmes de spectroscopie optique fibrée *in vivo*

Dans le chapitre précédent, nous avons expliqué l'intérêt de combiner plusieurs modalités spectroscopiques pour obtenir de meilleures performances diagnostiques. Cette combinaison ne réside pas seulement sur une réunion simple de données spectrales, mais sur une véritable intégration des mesures spectroscopiques, qui nécessite le développement instrumental d'un système polyvalent.

La caractéristique primordiale d'un tel système est d'assurer que le site de mesure soit identique pour toutes les modalités. En effet, si l'on ne peut assurer l'identité du site de mesures, les informations obtenues par différentes modalités ne peuvent plus être associées de façon compatible entre elles.

En tant que méthodes de mesure point-à-point, la SAF et la SRD possèdent des mises en œuvre instrumentales proches ou similaires. L'idée et la possibilité de combiner ces méthodes de mesure spectroscopique dans un même système sont basées sur le schéma de principe illustré dans la figure 1.13 (cf. p. 25 dans la section 1.3). En général, un tel système est composé de 3 parties principales : a) une source d'excitation, b) un système d'acquisition spectrale et c) une sonde multi-fibres optiques. Dans les sections qui suivent, nous présenterons les différentes solutions techniques et/ou technologiques issues de la littérature pour chacune de ces parties constitutives (source, capteur et sonde) pour des mesures en autofluorescence et en réflectance diffuse.

2.1.1 Sources d'excitation

2.1.1.1 Excitations simple et multiple pour l'autofluorescence

Comme mentionné dans la section précédente (Section 1.3), les tissus biologiques sont constitués de molécules biochimiques dont certaines peuvent émettre de la fluorescence après une excitation lumineuse adéquate. Les fluorophores intrinsèques possèdent des bandes de longueurs d'onde d'excitation spécifiques, larges et qui pour certaines se recouvrent. En général, ces molécules sont excitées dans la bande UV-visible (250 – 450nm).

Afin de cibler les bandes d'excitation propres à certains fluorophores à étudier, la source doit être capable de fournir une lumière "quasi-monochromatique" (de largeur de bande de longueur d'onde étroite) et avec une énergie suffisante. Deux types de sources lumineuses sont principalement utilisés : LASER ou lampe filtrée.

Les sources LASER ("Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation" ou Amplification de la Lumière par Emission Stimulée de Rayonnement) fournissent une grande énergie dans des bandes spectrales étroites (quelques nm), ce qui permet des excitations précises si l'on veut étudier des fluorophores séparément. De plus, le faisceau LASER cohérent et parallèle permet aussi une meilleure injection de lumière dans les fibres et augmente ainsi l'efficacité d'excitation. En synchronisation avec la partie acquisition, le LASER fonctionnant de manière impulsionnelle permet d'éviter au maximum les parasites lumineux entrant dans la mesure. Par contre, les principaux inconvénients de cette solution sont le coût et l'encombrement. Quelques équipes ont utilisé les sources LASER pour leurs études spectroscopiques *in vivo*. Par exemple, [Cothren *et al.*, 1990] ont utilisé un LASER à colorant (370nm) pompé par un LASER Azote (337nm), dans une étude pour discriminer les tumeurs (bénignes) des tissus gastro-intestinaux. [Ramanujam *et al.*, 1994] ont utilisé un LASER 337nm pour discriminer des tumeurs du col d'utérus. [Panjehpour *et al.*, 2002] ont utilisé un LASER à colorant (410nm) pompé par un LASER Azote (337nm), pour discriminer différents types de carcinomes cutanés. [Mallia *et al.*, 2008] ont utilisé un LASER à 404nm pour discriminer des tumeurs précancéreuses de tissus sains oraux humains. [Pery, 2007] a mise en oeuvre une diode laser à $415 \pm 5nm$ pour l'excitation d'autofluorescence dans son étude *in vivo* sur tumeurs de vessie de rats.

Les lampes à arc, quant à elles, sont des sources beaucoup moins coûteuses, mais doivent être accompagnées de filtres passe-bande pour fournir une bande de largeur suffisamment réduite (environ 15 – 20nm), ce qui ne convient pas forcément aux études visant des fluorophores ayant des bandes d'excitations proches (collagène et élastine, par exemple). Par contre, un avantage important apporté par un système à base de lampe "filtrée" est sa flexibilité à générer différentes bandes d'excitation avec une source unique. Ceci permet une conception d'instrument plus compact. Plusieurs études en spectroscopie de fluorescence avec une lampe filtrée ont été réalisées pour obtenir des excitations quasi monochromatiques (6nm de large, centré à 366nm) [Lohmann and Paul, 1988; Lohmann *et al.*, 1991] à l'aide d'un filtre passe-bande (366/11 Schott, Mainz) pour détecter et différencier des mélanomes de peau humaine.

A côté de ces deux principales sources, [Hart and JiJi, 2002] ont développé un système de spectroscopie avec une source d'excitation constituée d'une série de 7 diodes électroluminescentes (370, 430, 470, 505, 530, 590 et 636nm). La source à LED permet un prix de fabrication moins élevé et d'encombrement plus réduit. Les LEDs choisies avec des bandes de longueurs d'onde

d'émission spécifiques permettent d'éviter l'utilisation de filtres pour obtenir une excitation quasi monochromatique. Cependant, du fait d'autres contraintes optiques (efficacité de collimation et d'injection limités) et d'optimisation de la puissance d'excitation (FWHM relativement large, voir (Fig.2.1)), ce type de source reste très peu utilisé dans les études d'autofluorescence.

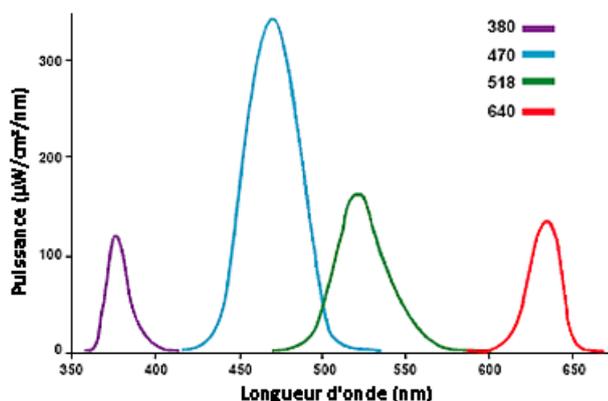


FIGURE 2.1 – Exemple de spectres d'intensité d'émission par sources LEDs (LS-450, Ocean Optics) de longueurs d'onde centrales 380, 470, 518 et 640nm. Les largeurs à mi-hauteur sont respectivement 20, 44, 35 et 28nm.

Une autre solution alternative consiste à utiliser une lampe mercure filtrée par une série de filtres passe-bande pour donner un ensemble de raies d'excitation plus fines qu'avec une lampe à arc filtrée. La figure (2.2) montre le spectre typique d'une lampe mercure-argon (HG-1, Ocean Optics), caractérisé par des raies spectrales très fines dans la bande de 200 – 1000nm. En choisissant des filtres passe-bande adéquats, certaines de ces raies peuvent être conservées pour l'excitation de différents fluorophores. Or, le problème principal lié à l'utilisation de ce type de lampe mercure provient du gaz qu'elle dégage (ozone), et qui présente des risques pour la santé tant pour le manipulateur que pour le patient.

Pour une caractérisation plus complète des tissus biologiques dans le cadre du diagnostic clinique, plusieurs longueurs d'onde d'excitation ciblant différents fluorophores sont nécessaires. Dans ce but, quelques équipes ont développé des instruments, dits en "multi-excitation d'AF", capables de fournir successivement dans le temps des pics d'excitations à des longueurs d'onde centrales différentes.

La solution à base de lampe filtrée est la plus flexible en termes de réglage et la plus économique. [Diagaradjane *et al.*, 2005] ont utilisé une source d'excitation composée d'une lampe Xénon à arc (150W) couplée à un monochromateur pour sélectionner des excitations entre 280 et 460nm tous les 10nm. [Senga and Minami, 1991] ont également développé un spectrofluorimètre compact dont la source est constituée d'une lampe à arc de Xénon (150W) et d'un monochromateur à réseau holographique (Jobin-Yvon, H20-VIS) couplé à un moteur pas-à-pas pour sélectionner automatiquement la longueur d'onde d'excitation voulue (entre 300 et 550nm).

Quant aux sources multi-excitation à base de LASER, leur mise oeuvre est plus compliquée et beaucoup plus coûteuse. Une première approche consiste à utiliser plusieurs sources LASER. [Ramanujam *et al.*, 1996] ont utilisé deux diodes LASER (380 et 460nm) pour exciter le colla-

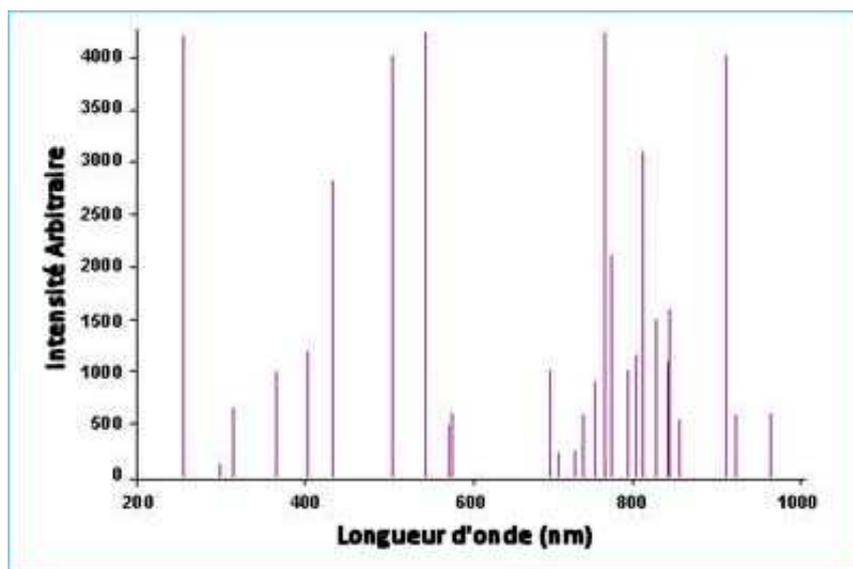


FIGURE 2.2 – Exemple d'intensité spectre caractéristique d'une lampe mercure-argon (HG-1, Ocean Optics).

gène et le NADH dans le col d'utérus afin de différencier *in vivo* les tissus sains et cancéreux. De même, [Wu and Qu, 2006a] ont utilisé des excitations à l'aide de 4 sources LASER (trois LASERs solides à 355, 457 et 473nm, et un LASER Ti : Saphir doublé réglable entre 375 et 435nm) pour investiguer les caractéristiques de fluorescence des tissus oraux et œsophagiens de lapin et du col de l'utérus humain.

Inspirée du principe de lampe filtrée, une autre approche de source multi-excitation LASER consiste à utiliser une source LASER unique pour pomper différents colorants. [Tunnell *et al.*, 2003] et [Zângaro *et al.*, 2006] ont adopté ce principe et construit une source d'excitation LASER à 9 colorants (entre 442 et 480nm) disposés sur une roue rotative et pompés par un LASER XeCl excimer à 308nm.

2.1.1.2 Excitation pour réflectance diffuse

La spectroscopie de réflectance diffuse consiste à mesurer et à étudier le spectre d'intensité d'une lumière large bande (typiquement entre 300 et 1000nm) rétro-diffusée par un milieu après absorption et diffusion multiple. Pour ce type de mesure, une lampe à arc Xénon peut classiquement être mise en œuvre. Par exemple, [Marin *et al.*, 2005] et [Mirabal *et al.*, 2002] ont utilisé une lampe Xénon (150W) suivie de filtres passe-bande pour réaliser des mesures entre 355 et 650nm dans une étude pour distinguer tissus normaux, précancéreux et tumoraux du col de l'utérus. D'autres équipes, comme celle de [Murphy *et al.*, 2005], ont utilisé une lampe tungstène-halogène suivie d'un filtre passe-bande pour réaliser des mesures dans la bande spectrale 550 – 1000nm afin de différencier des nævus communs dysplasiques et des mélanomes de la peau.

2.1.1.3 Sources d'excitation multi-modalité

Un système spectroscopique bimodalité (couplant SAF et SRD) intègre les sources d'excitation respectivement pour la mesure d'AF et de RD dans une même unité. Deux solutions ont été proposées jusqu'à présent par quelques équipes : soit deux sources distinctes destinées séparément aux différentes mesures ; soit une lampe large bande équipée de filtres passe-bande pour moduler la bande d'excitation selon les exigences expérimentales (bande étroite pour l'AF et large pour la RD). Pour la deuxième solution, une lampe Xénon est le plus souvent utilisée, grâce à sa bande plus étendue dans la gamme UV-visible-IR et sa longue durée de vie.

La première solution peut fournir une meilleure qualité d'excitation pour la mesure d'autofluorescence, bien que la gestion et l'injection de lumière des deux sources dans une même fibre deviennent compliquées. [Zângaro *et al.*, 2006] ont développé un système de mesures combinant autofluorescence et réflectance diffuse ; ce système a été amélioré par [Tunnell *et al.*, 2003]. Cet instrument dispose d'une lampe Xénon 300W pour l'excitation en réflectance diffuse (300 – 800nm) et de dix excitations LASER (entre 308 – 480nm) pour la fluorescence dont 9 sont des LASER à colorant (entre 442 – 480nm) disposés sur une roue et pompés par un LASER XeCl excimer à 308nm (8nm FWHM).

En revanche, la plupart des systèmes de spectroscopie bimodale décrits dans la littérature a adopté la deuxième méthode plus simple à mettre oeuvre et donne une dimension plus compacte. [Zheng *et al.*, 2003] ont étudié les propriétés optiques de la peau humaine normale et anormale *in vivo*, en utilisant la combinaison de mesures en autofluorescence et en réflectance diffuse. Ils ont utilisé une lampe Xénon (1000W, 200 – 1100nm) suivie d'un monochromateur donnant des excitations en bandes étroites pour la mesure d'AF. L'excitation en réflectance diffuse est obtenue en disposant le monochromateur en ordre zéro laissant passer la lumière blanche, suivi d'un filtre passe-haut coupant la lumière UV. [Zuluaga *et al.*, 1999] ont développé un système de mesures en réflectance diffuse (entre 380 et 950nm) résolue spatialement et en fluorescence (excitations entre 330 et 550nm, bande d'émission entre 380 – 700nm). Ils ont utilisé une lampe à arc Xénon (150W) munie d'un réflecteur sphérique suivi de deux lentilles de couplage vers un monochromateur. Un moteur pas-pas est utilisé pour sélectionner les longueurs d'onde d'excitation et trois bandes de longueurs d'onde ont été utilisées pour l'excitation en réflectance diffuse, sur la base d'une roue à filtres passe-bande (350 – 628, 500 – 778 et 700 – 978nm). Dans le cadre des travaux de recherche menés au sein de notre laboratoire, [Diaz, 2009] a développé un système bimodal sur la base d'une lampe filtrée. Les améliorations apportées à ce dispositif dans le cadre de la présente thèse sur tissus cicatriciels hypertrophiques seront présentées plus loin dans le chapitre 2.

2.1.2 Sondes fibrées

La sonde à fibres optiques est un élément clé pour la mesure spectroscopique, parce que la forme géométrique de la sonde détermine non seulement la profondeur de l'exploration dans le tissu, mais aussi la portion de photons à détecter (diffusion simple ou multiple, polarité, angle de réception, etc.). Plusieurs caractéristiques doivent être prises en compte pour la conception de la sonde : l'ouverture numérique des fibres, leur diamètre, la géométrie de la sonde et les distances inter-fibres si la sonde est utilisée à des fins de mesures résolues spatialement.

2.1.2.1 Spectroscopie de réflectance diffuse

Le premier élément à considérer pour la conception d'une sonde en SRD est l'ouverture numérique des fibres. Pour cause de la différence en indices de réfraction entre les matériaux constituant le coeur et la gaine de fibres optiques, les photons incidents sont injectés dans le tissu avec des angles aussi restreints qu'ils sont collectés. En général, cet angle d'incidence/d'acceptance de lumière est représenté par Ouverture Numérique (ON), qui est définie comme le sinus de l'angle d'entrée maximal de la lumière θ_{max} :

$$\sin \theta_{max} = \sqrt{n_c^2 - n_g^2} \quad (2.1)$$

où n_c et n_g sont respectivement les indices réfractifs des matériaux constituant le coeur et la gaine de fibre optique.

En pratique, un faisceau de lumière le plus collimaté et perpendiculaire possible est souhaité pour éviter de collecter les réflexions de Fresnel ; donc une ouverture numérique de 0,22 donnant un angle divergent de 17° est la plus utilisée dans la littérature.

Pour la configuration de mesures en rétrodiffusion (mesures d'intensités du même coté du tissu que celui d'injection de lumière d'excitation) l'intensité mesurée $R(\lambda)$ peut être approximativement décrite par l'équation 2.2, et sa distribution dans l'espace est schématisée par une forme de "banane" montrée dans la figure 2.3 [Tuchin, 2007].

$$R(\lambda) = \frac{z_o A}{2\pi} \left[\frac{\mu_e f f}{r_{sd}^2 - z_o^2} - \left(\frac{1}{r_{sd}^2 - z_o^2} \right)^{\frac{3}{2}} \right] \exp \left[-\mu_e f f (r_{sd}^2 - z_o^2)^{\frac{1}{2}} \right] \quad (2.2)$$

où r_{sd} représente la distance entre la fibre d'excitation (source d'illumination) et une fibre de détection (réception ou collection). $z_0 = \frac{K}{\mu_s}$ est la distance d'extrapolation, K est une constante dépendant du coefficient d'anisotropie g et de l'indice de réfraction à la surface du tissu. A est la surface de la section de fibre de détection.

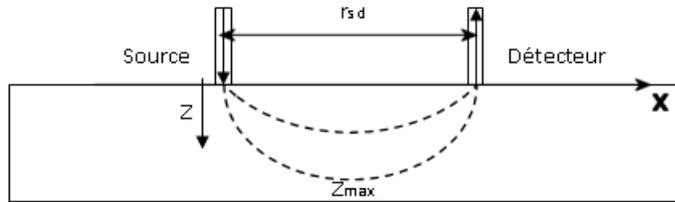


FIGURE 2.3 – Présentation schématique de la distribution spatiale des photons ("Banana Shape") dans un milieu semi-infini. [Tuchin, 2007]

Si l'absorption du milieu est faible comparativement à la diffusion, cette zone "banane" correspond aux profondeurs z où les photons captés par la fibre de détection se sont propagés avec

la plus grande probabilité depuis leur point d'injection (fibre d'excitation) tel que :

$$z = \left[\frac{1}{8} (\{ [x^2 + (r_{sd} - x)^2]^2 + 32s^2 (r_{sd} - x)^2 \}^{\frac{1}{2}}) - x^2 - (r_{sd} - x)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2.3)$$

où $x \in [0, r_{sd}]$. Ainsi, la profondeur maximale z_{max} (où $x = \frac{r_{sd}}{2}$) qu'une paire de fibres peut explorer est donnée par l'équation 2.4.

$$z_{max} = \frac{r_{sd}}{2\sqrt{2}} \quad (2.4)$$

Donc, en disposant une série de couples de fibres excitatrice-réceptrice espacées de distances différentes, il est possible de sonder les propriétés optiques des couches situés à différentes profondeurs dans les tissus.

De plus, des distances inter-fibres variables permettent d'étudier la diffusion et l'absorption des photons selon leur longueur d'onde. Par exemple, une grande distance inter-fibre est adéquate pour étudier des propriétés optiques de tissus dans les bandes spectrales rouge et NIR, tandis qu'une distance inter-fibre plus courte est plus adaptées aux mesures dans les couches superficielles des tissus et/ou pour des bandes de longueur d'onde plus basses (UV et NUV).

Cependant, à cause de la complexité structurelle des milieux tissulaires à étudier, une distance optimale unique est difficile à déterminer, le cas échéant, empiriquement à l'aide de simulations (Monte Carlo). [Papaioannou *et al.*, 2004] ont étudié, expérimentalement (avec excitation à 337nm) et par simulation, les effets de la géométrie de trois types de sondes différentes et des distances entre sonde et tissu sur l'efficacité de collection de la réflectance diffuse. Les auteurs ont conclu que les photons collectés par une sonde avec une distance source-détecteur grande pénètrent plus profondément dans le tissu que ceux collectés par une sonde avec une faible distance inter-fibre. Néanmoins, la lumière collectée est moindre et l'efficacité d'une telle sonde (avec une plus grande distance) plus faible. Par ailleurs, l'étude montre que le contact direct de la sonde fibrée avec le tissu donne une intensité maximale.

2.1.2.2 Spectroscopie d'autofluorescence

En SAF également, la géométrie de sonde peut influencer de même manière la forme et l'intensité du spectre. Tout d'abord, le modèle "Banana Shape" est aussi applicable pour représenter la distribution spatiale de la lumière d'excitation dans le tissu. Le nombre de photons d'excitation distribués dans l'espace associé au nombre de fluorophores excités détermine l'intensité et la forme des spectres mesurés.

Même si [Richards-Kortum *et al.*, 1989] indique que la meilleure sonde fibrée est celle utilisant une fibre unique pour exciter et collecter les photons d'autofluorescence (parce que le spectre ainsi mesuré ne dépend pas de la géométrie de la sonde), l'utilisation de multiple fibres semble plus utile pour le diagnostic. En effet, les fluorophores situés dans différentes couches du tissu nécessitent des excitations de lumière pénétrant plus ou moins profondément. [Papaioannou *et*

al., 2003] et [Zhu *et al.*, 2003] ont prouvé qu'une sonde multi-fibres augmente significativement la spécificité et la sensibilité pour leurs études diagnostiques.

Au contraire de la SRD, une ouverture numérique de fibre plus élevée est préférable pour capter des photons d'autofluorescence. La raison ne vient pas seulement du fait que la génération de fluorescence est isotrope dans l'espace, mais que l'on s'intéresse à une plus grande zone superposée entre les cônes d'illumination et de réception qui sont définis par l'ouverture des fibres. [Pfefer *et al.*, 2002] a montré qu'en augmentant l'ON des fibres utilisées, l'intensité de fluorescence augmente significativement sans affecter le libre parcours moyen des photons de fluorescence, sous réserve que l'ON ne dépasse pas 0,8.

2.1.3 Systèmes d'acquisition spectroscopique

Cette partie de l'instrument doit permettre d'effectuer une acquisition spectroscopique de la lumière émise par le tissu (autofluorescence et diffusion élastique) avec des résolutions optiques et dans des bandes de longueur d'onde données. La configuration est celle d'un spectrographe imageant comportant 3 parties : 1 entrée avec fente et bundle de fibres en ligne, 1 système spectrométrique composé de miroirs et réseau de diffraction, un détecteur matriciel (CCD).

Les anciens spectrographes utilisant un prisme simple ne donnaient que des spectres dans le domaine visible avec des résolutions limitées par les propriétés optiques du matériau du prisme. Les spectrographes actuels sont tous munis d'un réseau de diffraction et d'une fente ajustable permettant de sélectionner la bande spectrale à explorer et donnant des résolutions améliorées [Ramanujam, 2000].

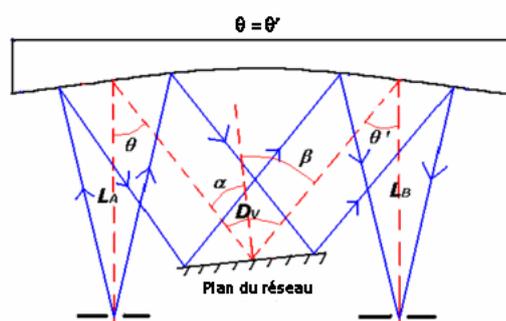
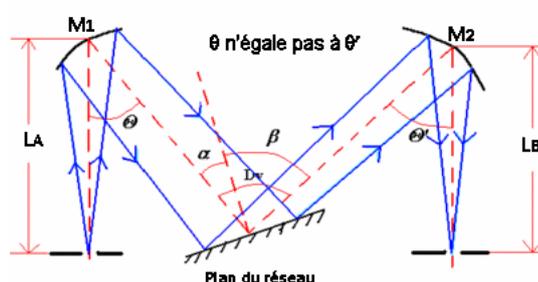
Plusieurs configurations optiques existent pour la conception d'un spectrographe à réseau. La configuration Fastie-Ebert (Fig.2.4) consiste en un seul miroir sphérique et un réseau de diffraction. Le miroir se charge à la fois de collimater la lumière entrant (L_A) par la fente (F_1) pour frapper le réseau et de focaliser la lumière diffractée (L_B) vers la fente de sortie (F_2). Cette conception peut donner un coût de fabrication réduit, mais au prix d'une moindre qualité d'image hors axe (la ligne pointillée sur le schéma) dûe aux phénomènes optiques (aberration sphérique¹ et effet coma²).

Une autre configuration, dite Czerny-Turner, consiste à utiliser deux miroirs sphériques (M_1 et M_2) pour collimater séparément les lumières d'entrée (L_A) et de diffraction (L_B) (Fig. 2.5). Ces miroirs peuvent être conçus séparément pour éliminer l'effet coma. En outre, cette configuration est plus flexible en termes de géométrie de miroir. En effet, la position des miroirs peut être modifiée en s'adaptant à différents réseaux de diffraction utilisés. Le spectrographe utilisé pour notre étude est de type Czerny-Turner, équipé de 3 réseaux de diffraction pour disposer de différentes résolutions spectrales.

Une attention particulière doit être portée au type de mesures à effectuer, lorsque l'on

1. L'aberration sphérique correspond aux rayons éloignés du centre de l'optique qui ne se focalisent pas au même point que ceux qui passent à proximité du centre, ce qui rend l'image flou

2. L'effet coma en optique est la distortion de l'image d'une source ponctuelle hors axe, qui produit un trait dispersé ressemblant à celui d'une comète. Ce phénomène est principalement dû à l'imperfection de fabrication des éléments optiques

FIGURE 2.4 – Diagramme de la configuration Fastie Ebert (*HORIBA*[®])FIGURE 2.5 – Diagramme de la configuration Czerny Turner (*HORIBA*[®])

choisit un détecteur (mesure mono-canal ou multi-canaux). En effet, différents éléments opto-électroniques (photomultiplicateur, photodiode et CCD) peuvent effectuer la détection de photons dans la bande UV-visible-IR. Dans le cadre de mesures résolues spatialement, un capteur CCD matriciel répond mieux au besoin. A l'entrée du spectrographe, les fibres réceptrices de la sonde sont rangées en ligne. Puis, chaque spot lumineux correspondant à chaque fibre est dispersé et réfléchi sur le CCD. Le capteur CCD est positionné de sorte que la dispersion soit "parallèle" à l'axe X (horizontal) du CCD. Ainsi, chaque colonne de pixels (direction Y) mesure l'intensité lumineuse pour une longueur d'onde donnée (après calibrage); tandis que les lignes de pixels (en X) illuminées (par exemple, les lignes 35 – 55, 60 – 80 et 85 – 105 dans la figure 2.6) sont utilisées pour mesurer l'intensité des spectres provenant des différentes fibres réceptrices. La correspondance entre les pixels en colonne et les longueurs d'onde de lumière mesurée est déterminée via des procédures de calibrage présentées ci-après.

2.2 Instrumentation existante

La première version de système bimodal (Fig.2.7) développée au CRAN, le fut initialement par Emilie Péry au cours de sa thèse [Pery, 2007] pour des études de caractérisation tissulaire dans la vessie *in vivo* et sur des tissus artériels *ex vivo*. Cet instrument, combinait les spectroscopies d'autofluorescence (en mono-excitation à 410nm) et de réflectance diffuse (dans la bande 400 – 800nm).

Ce système comprenait :

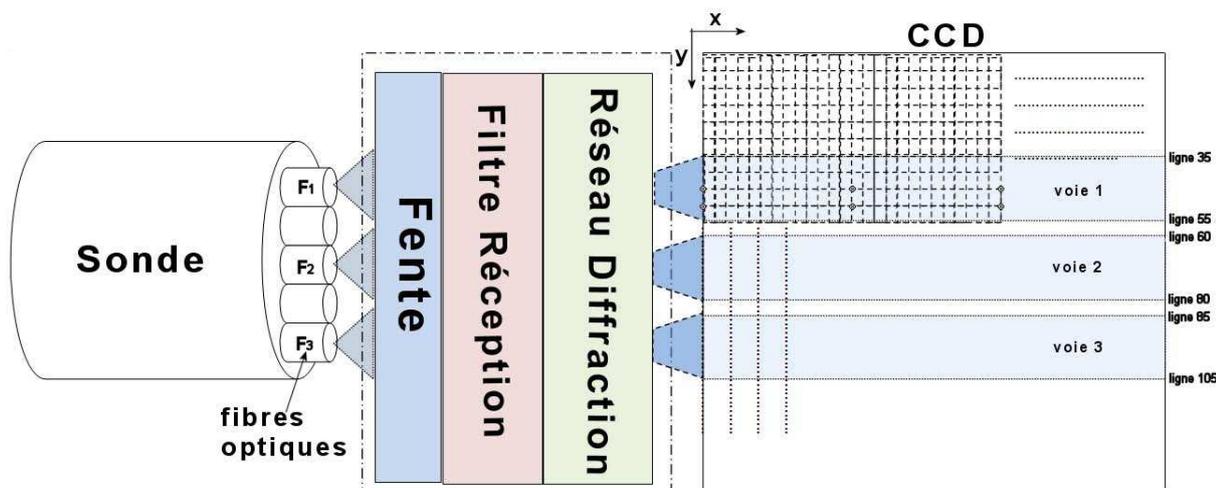


FIGURE 2.6 – Représentation schématique illustrant la formation des images spectrales pour trois fibres réceptrices et le découpage en zone de la matrice CCD. Par exemple, la lumière issue de la fibre 1 (F_i), après filtrage, est projetée sur le réseau de diffraction qui la disperse en fonction des longueurs d’onde sur toute la largeur du CCD dans une zone située environ entre les lignes 35 et 55. Les fibres réceptrices et les lignes de pixels doivent être choisies de telle sorte que les images des voies soient largement séparées.

- un spectrographe imageant (iHR 320, Jobin Yvon) muni d’une tourelle positionnable comprenant 3 réseaux de diffraction (pour disposer de 3 résolutions spectrales différentes) et d’un capteur CCD rétro-éclairé, sensible dans l’UV (Symphony 2048x512),
- deux sources d’excitation distinctes, une diode LASER de longueur d’onde centrale $410(\pm 5)nm$ avec une puissance maximale de $60mW$ (Laser 2000, France), et une lampe deutérium-halogène $380 - 940nm$ (Ocean Optics),
- une sonde à 37 fibres optiques (silice/silice, diamètre de coeur $200\mu m$, $ON=0,22$),
- une carte électronique d’activation et de contrôle de puissance de la diode LASER,
- un logiciel de configuration et d’acquisition des mesures spectroscopiques.

Une deuxième version d’instrumentation a été développée par Gilberto Diaz et Marine Amouroux pour l’adapter à leur étude de caractérisation des tissus hyperplasiques et dysplasiques UV-induits sur la peau de souris. L’amélioration majeure de ce nouveau système concernait la source d’excitation. Au lieu d’utiliser deux sources séparées pour l’excitation d’AF à une seule longueur d’onde et l’excitation large bande pour la RD, une solution à base de lampe à arc filtrée a été mise en œuvre (cf. schéma Fig.2.8). Une lampe Xénon munie d’un miroir parabolique fournit un faisceau de lumière collimatée qui est filtré par des filtres anti-calorique (F1) et passe-bande (F2) pour limiter la bande spectrale d’intérêt ($350 - 800nm$) pour nos études. Une lentille plan-convexe (L1) focalise à l’entrée de la fibre excitation la lumière de la source dont le profil spectral d’intensité est configuré par un couple de filtres optiques linéairement variables (FL1 et FL2) selon les besoins d’excitation. Cependant, la taille de point focal de cette

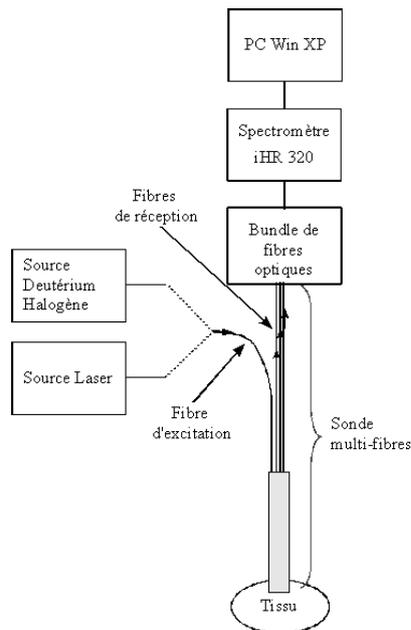


FIGURE 2.7 – Représentation schématique du système spectroscopique bimodal réalisé [Pery, 2007]

lentille (4mm en diamètre) est relativement grand devant le calibre de fibre optique (F_{ex} , $200\mu\text{m}$, ON 0, 2), ce qui fait que moins de 0.3% d'énergie lumineuse soit injectée dans la fibre d'excitation.

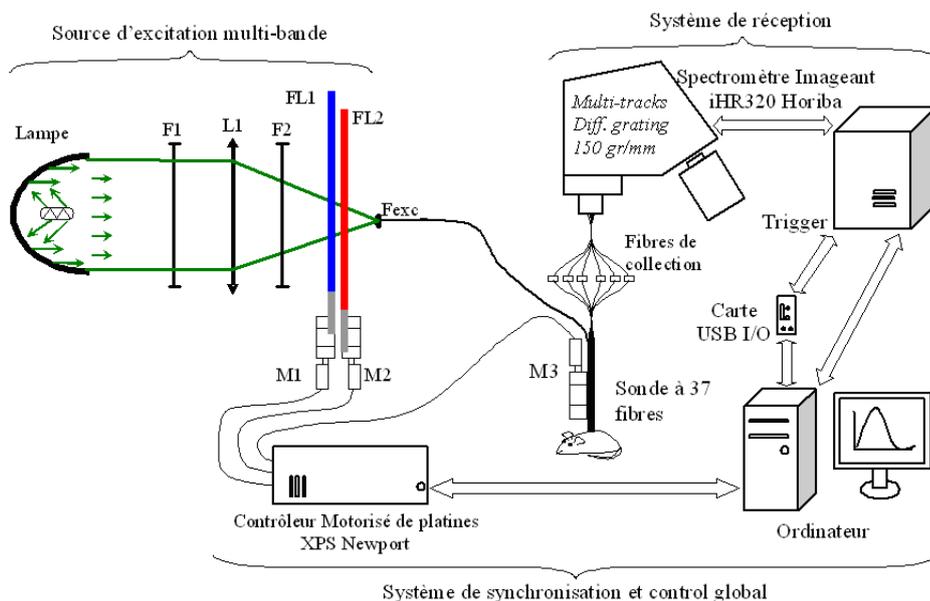


FIGURE 2.8 – Représentation schématique de synthèse de l'instrumentation développée pour la spectroscopie bimodale. Lampe à arc court (Xénon 300W, PE300BF, Perkin Elmer optoelectric); F_1 = Filtre anti-calorique; L_1 = Lentille plan-convexe; F_2 = Filtre passe-bande; FL_1 et FL_2 = Filtres optiques variables linéairement passe-bas et passe-haut; F_{ex} = Fibre optique d'excitation; M_1 , M_2 et M_3 = platines de déplacement linéaire motorisés. [Diaz, 2009]

La figure Fig. 2.9 montre la disposition géométrique des fibres à l'extrémité de la sonde optique utilisée par [Diaz, 2009]. Une fibre parmi les 37 est choisie en bord de sonde pour l'excitation (par exemple fibre 32) et 6 fibres de réception sont choisies à différentes distances de la fibre d'excitation (par exemple, les fibre 8, 16, 19, 26, 30, 33).

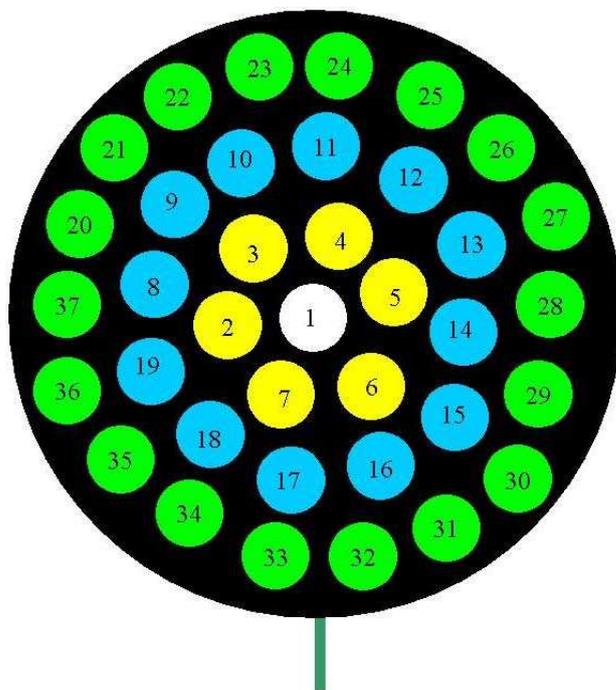


FIGURE 2.9 – Schéma de la disposition géométrique des fibres à l'extrémité de la sonde utilisée par [Diaz, 2009]

La base de la partie de réception, quant à elle, reprend les éléments utilisés dans [Pery, 2007]. Elle est constituée d'un bundle de fibres rangées en ligne, et d'un spectrographe imageant (iHR320, Jobin Yvon) muni d'une caméra CCD (Symphony 2048x512) pour l'enregistrement spectral (cf. Fig. 2.8). En configuration multivoies, des zones de détection sont définies horizontalement sur le CCD pour mesurer les spectres d'intensité de lumière provenant de chaque fibre de réception séparément. Une roue à filtres intégrée dans le spectromètre est utilisée pour positionner les filtres passe-haut adéquats pour couper l'intensité de rétrodiffusion des différentes excitations lors des mesures en AF. L'acquisition spectroscopique est entièrement pilotée par une console (Symphony, HORIBA, Jobin Yvon) via un logiciel dédié (Synergy). Le tableau 2.1 récapitule les caractéristiques techniques essentielles pour la partie réception développée.

Afin de développer un système automatique pour l'acquisition de spectres, [Diaz, 2009] ont utilisé des platines motorisées pour actionner le déplacement relatif des filtres FL1 et FL2. Ainsi, le profil de la lumière d'excitation (FWHM et longueur d'onde centrale) peut être configuré à l'aide d'un contrôleur informatique (XPS, Newport) et d'un programme de commande développé en C++ pour paramétrer les positions de FL1 et FL2 et pour synchroniser les parties d'excitation et de réception.

Lors des mesures expérimentales, l'opérateur doit initialiser les parties d'excitation et de

TABLE 2.1 – Caractéristiques techniques du système d’acquisition spectroscopique

Détecteur	caméra CCD back-illuminated sensible dans l’UV (iHR320, HORIBA, Jobin Yvon), surface : 2048x512 pixels
Réseaux de diffraction	1200 traits/mm étendu à 62 nm, 600 traits/mm étendu à 124 nm, 150 traits/mm étendu à 496 nm
Résolution spectrale	$\leq 0,15nm$ (réseau 1200), $\leq 0,3nm$ (réseau 600), $\leq 1,2nm$ (réseau 150)
Bundle de connexion optique	15 fibres optiques avec embout d’insertion des fibres alignées (linéaire)
Entrée/ Sortie	BNC pour déclenchement externe du shutter ; RS123 pour contrôle des filtres inernes ; USB 2.0
Logiciel	Synergy

réception respectivement par le programme développé et le logiciel Synergy. Puis, les platines déplacent un couple de Filtres Optiques Linéairement Variables (FOLV) aux positions définies par les paramètres entrés par l’opérateur. Aussitôt que le faisceau de lumière est généré, un signal TTL externe généré par la carte USB I/O (cf. Fig.2.8) active le déclenchement des mesures sur le spectromètre (iHR320). Après que les mesures pour une excitation soient terminées, le manipulateur doit entrer des paramètres de configuration du système pour générer l’excitation suivante, et les mesures spectroscopiques recommencent de la même manière. Ces actions sont répétées autant de fois que le nombre d’excitations nécessaires pour le protocole expérimental.

2.2.1 Cahier des charges pour la poursuite du développement instrumental

2.2.1.1 Puissance d’excitation pour l’autofluorescence

Une des limitations du système précédent concerne la faible puissance disponible en sortie de la fibre d’excitation, en particulier pour les pics d’excitation étroits d’AF entre 360 et 400nm.

En effet, pour pouvoir effectuer une mesure de spectre d’intensité d’autofluorescence avec un bon rapport de signal sur bruit et en un temps suffisamment court (quelques centaines de microsecondes) compatible avec une caractérisation *in vivo*, plusieurs dizaines de μW de puissance lumineuse sont nécessaires pour l’excitation [Diaz, 2009]. La configuration optique de la source précédente fournissait des pics d’intensité de largeur spectrale FWHM de 15 à 20 nm pour des valeurs de puissance limitées (18 – 20 μW). Ce problème de puissance lumineuse disponible peut être éventuellement lié à des facteurs tels que la réponse spectrale des filtres utilisés, l’efficacité d’injection de lumière dans la fibre d’excitation. Donc, des modifications techniques peuvent être envisageables pour améliorer l’efficacité d’injection et ainsi augmenter le rendement de puissance destinée à l’excitation.

2.2.1.2 Excitation large bande pour réflectance diffuse

La figure 2.10 montre un exemple des 3 profils d’intensité spectrale générés pour l’excitation de RD. En effet, à cause de contraintes mécaniques imposées par les platines transportant les filtres linéairement variables (FL_1 et FL_2), [Diaz, 2009] ont été obligés de créer trois bandes successives pour couvrir la bande totale (350 – 750nm) pour l’excitation de RD. Cela pose des

problèmes en termes de durée d'expérimentation (temps d'acquisition multiplié par 3 pour un site de mesure). Or, la durée de mesure est un paramètre clé pour l'application *in vivo* d'une méthode diagnostique. Réduire au maximum la durée de mesure est une étape préliminaire pour pouvoir transférer la technique en clinique.

De plus, un point important pour que la combinaison des mesures multi-modalités soit viable, est d'assurer la colocalisation de ces mesures sur le site tissulaire, ce qui est difficilement le cas lorsque la manipulation expérimentale est longue. Ainsi, effectuer la mesure de RD en une fois sur toute la bande spectrale NUV-Vis-NIR est indispensable pour construire un système spectroscopique bimodal efficace et applicable en clinique.

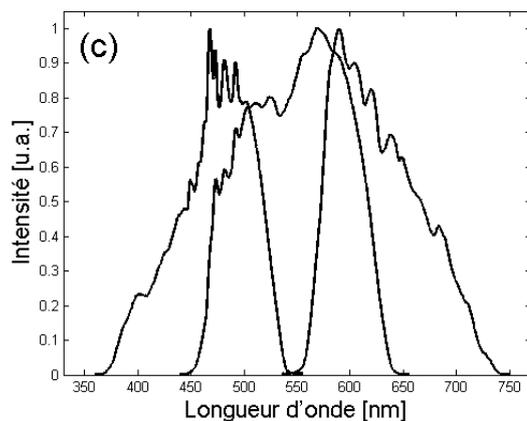


FIGURE 2.10 – Exemple de 3 profils d'intensité spectrale combinés pour la mesure spectroscopique en RD (365 – 545nm, 450 – 640nm et 550 – 740nm)

2.2.1.3 Automatisation complète des mesures

Le système développé par [Diaz, 2009] n'était pas entièrement automatisé :

- deux interfaces logicielles distinctes gèrent séparément le fonctionnement de différentes parties du système : un programme développé en C++ pour la partie d'excitation, et un logiciel commercial ("Synergy") pour la partie d'acquisition spectrale,
- les parties excitation et réception ne communiquent pas pour synchroniser leur fonctionnement et lancer une séquence de mesure (en multi-excitation) de manière automatique,
- le filtre passe-bande inséré entre la lentille (L1) et les FOLV (FL1) doit être changé manuellement pour différentes excitations. Ces contraintes techniques doivent être résolues pour que le système parvienne à un niveau complètement automatique.

2.2.1.4 Objectifs de développement

Après avoir analysé les différents points faibles du système existant, nous avons défini un cahier des charges pour orienter notre développement comme suit :

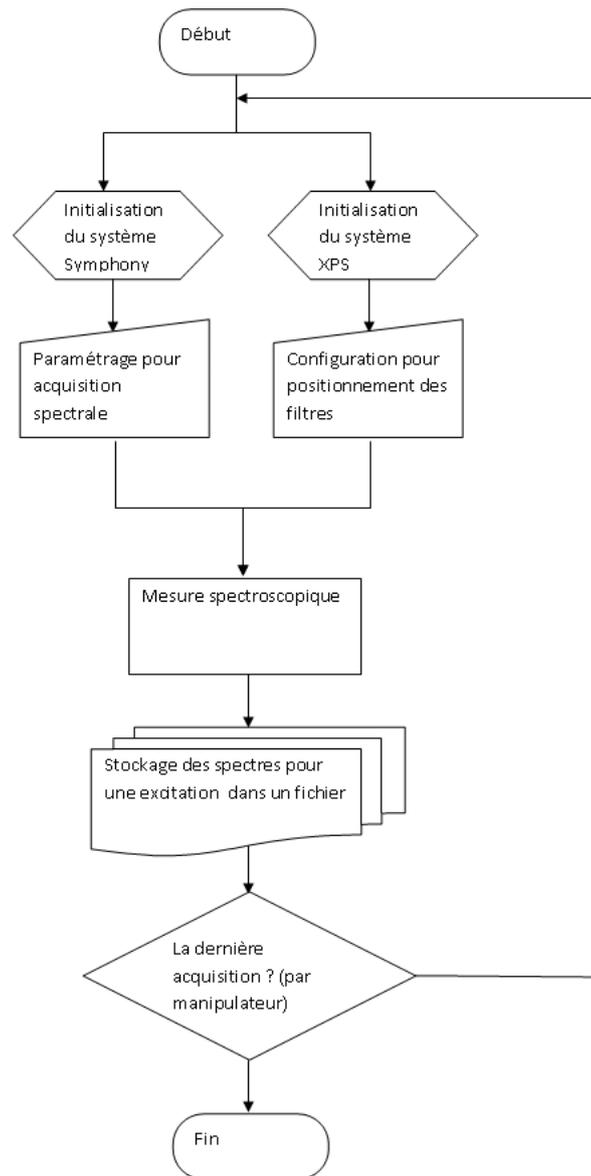


FIGURE 2.11 – Schéma-bloc illustrant le fonctionnement pour le système développé par [Diaz, 2009]

- Mettre en œuvre des modifications techniques (optiques) pour augmenter la puissance d'excitation AF tout en réduisant la largeur spectrale des pics pour l'excitation d'AF ;
- Effectuer la mesure de RD en une fois avec une bande unique ;
- Etablir/renforcer la communication entre les parties d'excitation et de réception, afin qu'elles soient totalement synchronisées et permettent des séquences de mesures entièrement automatiques (multi-AF et RD) ;
- Optimiser le positionnement des pièces optiques (filtres, lentilles et fibres optiques) et in-

tégrer la totalité du système dans un rack mobile pour une future utilisation en clinique.

2.3 Travaux réalisés : améliorations apportées sur le système instrumental

2.3.1 Optimisation de la puissance de lumière incidente (sur le tissu)

Trois facteurs peuvent notamment influencer la quantité de photons arrivant au bout de la sonde fibrée pour exciter le tissu : la puissance de la lampe, l'efficacité de l'injection optique de la lumière dans le fibre d'excitation, plus particulièrement l'ouverture numérique de la fibre optique.

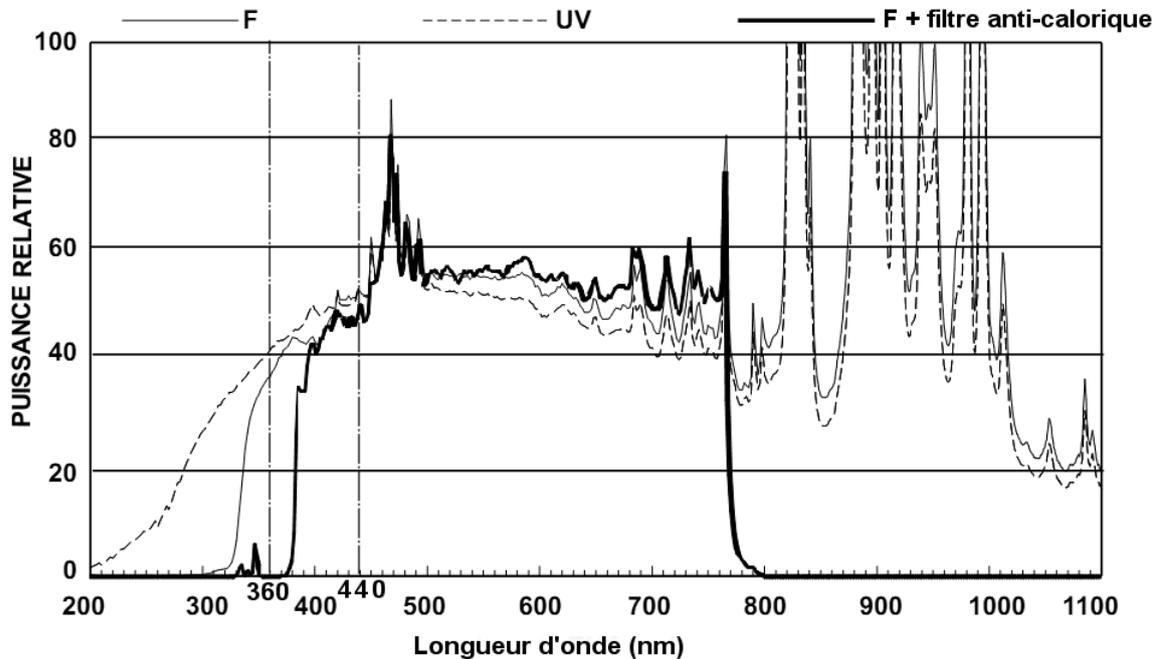


FIGURE 2.12 – Spectres d'intensité des lampes Xénon classique ("F") avec filtre anti-calorique ("F+filtre") et étendu dans l'UV ("UV")(PE300BUV, Perkin Elmer, optoelectric)

Ainsi, nous avons tout d'abord commencé par remplacer la lampe existante par une nouvelle lampe Xénon (PE300BUV, Perkin Elmer, optoelectric) avec des intensités spectrales légèrement plus élevées entre 360 – 440nm (6,6W pour $\lambda_{em} < 380nm$). Cependant, ce changement ne nous a pas permis d'augmenter significativement la puissance en sortie de fibre excitatrice pour la bande spectrale d'intérêt (360 – 430nm). Ceci est principalement dû au fait que la lentille et la fibre optique possèdent respectivement des valeurs d'ouverture numériques (ON) non-compatibles. En effet, pour que la totalité de lumière injecte dans la fibre, la lentille utilisée doit répondre à deux critères :

- la taille de point focal doit être inférieur au calibre de la fibre ;

– l'ON est inférieure à celle de la fibre optique.

[Greivenkamp, 2004] a mentionné que l'ON caractérisant le cône d'observation d'une lentille est calculée par la division de la diamètre de lentille D par 2 fois de la distance focale f , en prenant en compte l'indice optique du milieu n ($n = 1$ pour les pièces retrouvées dans l'aire) :

$$ON = n \frac{D}{2f} \quad (2.5)$$

Dans notre cas, la lentille ($\emptyset 5cm$) présente une distance focale de $5cm$ (cf. Fig. 2.13). Ceci correspond à une ON de $0,5$, supérieur à celui de la fibre optique ($0,2$). Donc, l'injection de lumière n'est pas optimale.

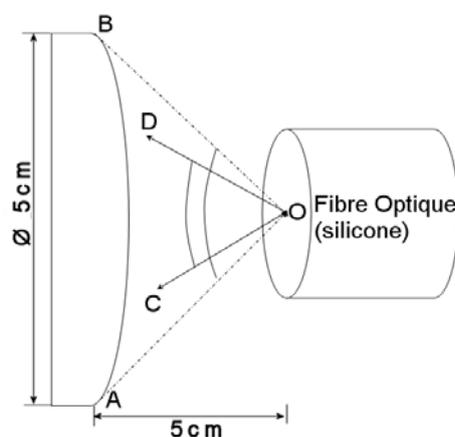


FIGURE 2.13 – Schéma illustrant la partie d'injection de lumière de la source dans la fibre optique d'excitation à l'aide de l'ancienne lentille, tel que $\angle AOB > \angle COD$, où $\angle AOB$ est l'angle de convergence de lentille et $\angle COD$ est l'angle d'acceptance de la fibre excitatrice

Pour que la plus grande partie de lumière soit injectée dans la fibre, nous avons remplacé une autre lentille avec une distance focale plus longue ($f = 20cm$, cf. Fig.2.14), donc une ON plus petite ($0,125$). La surface de cette lentille est traitée spécialement pour augmenter l'efficacité de transmission de la lumière UV.

Cette nouvelle lentille présente donc un plus gros point focal ($20mm$) à l'entrée de la fibre excitatrice, ce qui fait que seule la partie centrale de lumière focalisée est injectée dans la fibre. Donc, nous n'avons pu obtenir une augmentation de puissance assez satisfaisante.

Une autre solution consistait à augmenter la surface d'injection en utilisant plusieurs fibres d'excitation. Une nouvelle sonde a été sous-traitée par la société SEDI (cf. Fig.2.15). La principale innovation est qu'elle intègre 16 fibres indépendantes de diamètres de cœur $200\mu m$ (ON $0,2$) et 3 bundles de 7 fibres chacun ($200\mu m$, ON $0,2$) qui peuvent être utilisés pour l'excitation ou la réception avec une surface équivalente d'injection multipliée par 7. Ainsi, Cette nouvelle sonde

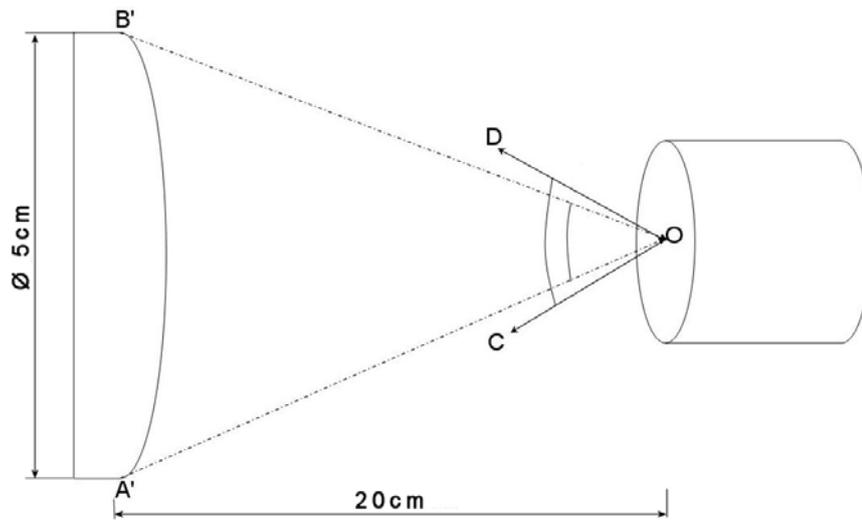


FIGURE 2.14 – Schéma illustrant la partie d’injection de lumière de la source dans la fibre optique d’excitation à l’aide d’une nouvelle lentille, tel que $\angle A'OB' > \angle COD$, où $\angle A'OB'$ est l’angle de convergence de la nouvelle lentille

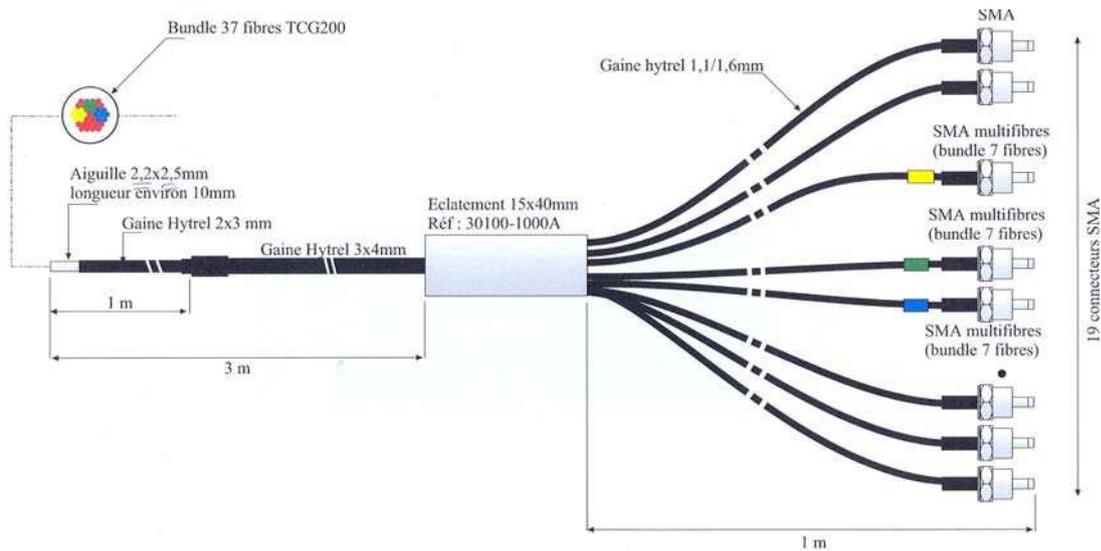


FIGURE 2.15 – Schéma technique de la sonde fibrée utilisée pour notre étude

(taux d’injection = 0.06) nous permet d’obtenir des pics d’excitation plus étroits ($FWHM$ 2 – 10nm) et d’augmenter la puissance en sortie de sonde environ de 3 à 10 fois plus élevées (cf. Tab.2.2).

Les positions relatives de chaque fibre et les distances inter-fibres précises sont calculées à partir d’une image réelle de l’extrémité de la sonde obtenue en microscopie (Fig. 2.16).

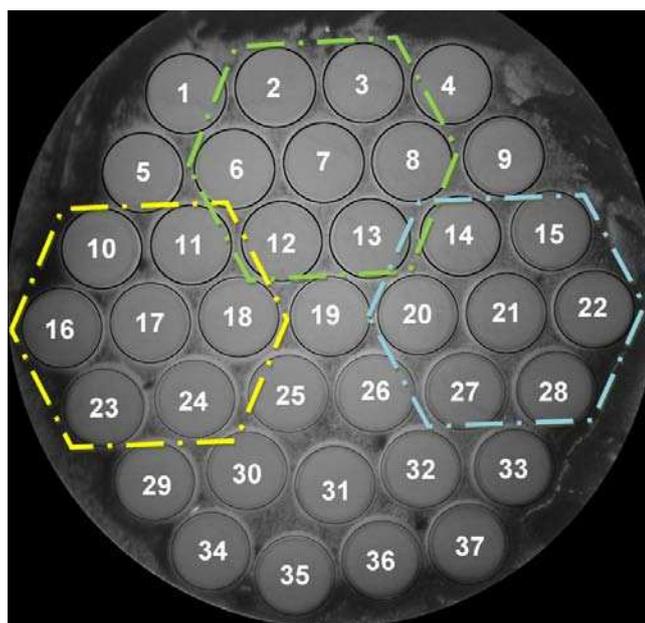


FIGURE 2.16 – Photographie de l'extrémité distale de la sonde multi-fibres prise au microscope, montrant la disposition réelle des fibres et leur numérotation associée. Les 3 bundles de fibres regroupées sont indiqués par les hexagones

TABLE 2.2 – Comparaison de puissance P à la sortie de fibre d'excitation avant et après les modifications apportées

$\lambda_{ex}(nm)$ ^a	360	370	380	390	400	410	420	430	440
$P_{avant}(\mu w)$	40,9	77,3		20	19,3	20	16,2	10	
$P_{aprs}(\mu w)$	220	123	115	109	120	120	101	103	103
$FWHM_{avant}(nm)$	25	25		15	15	15	15	16	
$FWHM_{aprs}(nm)$	18	15	13	13	13	13	13	13	13

a. Les valeurs de RD ne sont pas comparables, à cause du nombre incohérent des bandes d'excitation (cf. Section 2.2.1.2)

2.3.2 Solution technique pour une bande d'excitation unique en RD

La course des platines ne permet pas de dégager complètement les FOLV du chemin optique entre la lampe et l'entrée de la fibre excitatrice, ce qui limite la bande spectrale à disposition. Pour surmonter ce problème, nous avons modifié le montage mécano-optique en rajoutant une troisième platine de translation linéaire et rallonger ainsi la course de déplacement des filtres. Cette solution technique simple et efficace nous permet de disposer d'une configuration matérielle fonctionnant en bande unique de 350 – 750nm pour l'excitation RD, donc une durée de mesure pour la SRD divisée par 3.

2.3.3 Solution logicielle pour une Interface utilisateur unique

Comme mentionné en section 2.2, les parties sources et acquisition sont pilotées respectivement par deux contrôleurs (XPS et Symphony) via deux programmes différents. Ces modules actuellement non-communicants (au niveau à la fois des connexions physiques et de l'application)

et donc non-synchronisés ne permettent qu'un fonctionnement semi-automatique. nous avons développé un programme de contrôle intégral de ces modules sous LabView (National Instrument) afin de pouvoir réaliser chaque cycle de mesure de façon totalement automatique. Des modules "VI" (Virtual Instrument) fournis par les fabricants du contrôleur XPS et de la console Symphony permettent d'intégrer les fonctions élémentaires de chaque système dans une plateforme unique(cf. Fig. 2.17) :

- initialisation des positions des platines,
- programmation des déplacements,
- contrôle de la fente du spectromètre, de la position de la roue à filtre, de la tourelle des réseaux,
- paramétrage de la caméra CCD pour faire une séquence d'acquisitions.

Le programme développé n'est pas seulement une interface unique pour faciliter le contrôle des deux parties du système (parties source et acquisition), mais assure également un fonctionnement automatique pour les mesures de multi-excitation : les paramètres de configuration pour chaque excitation sont ainsi préalablement enregistrés dans un fichier de configuration (text ou Excel, cf. Fig. 2.18). Lors de la séquence de mesures, le programme charge ligne par ligne ces données aux contrôleurs (XPS et Symphony) et lance automatiquement l'acquisition ; une fois toutes les acquisitions terminées, le programme enregistre les données dans une matrice 3D dont chaque matrice 2D correspond aux données acquises à une excitation donnée.

2.3.4 Intégration du système et rack transportable

Comme le montre les figures 2.19 et 2.20, une partie de nos travaux (en parallèle du protocole expérimental mené) a été consacré à intégrer le système entier de spectroscopie multi-modalités dans un rack mobile, en collaboration et sous-traitance avec la société Kaluti SA (Paris). Tous les éléments optiques sont regroupés dans ce châssis en optimisant leurs positions relatives pour limiter les contraintes mécaniques et la présence de parasites lumineux (Fig. 2.20.1 et 2.20.2) : compartiments séparés, source isolée, alignements optiques réglables en façade et goulote de protection pour les fibres. Un plan de travail est disponible à hauteur d'utilisateur sur lequel peuvent être disposés l'ordinateur portable pilotant l'ensemble du système et la sonde fibrée. En outre, les roulettes en bas du châssis permettent de déplacer le système pour une utilisation versatile.

2.4 Caractérisation métrologique et calibrage de l'instrumentation

L'établissement et l'application de procédures de calibrage ou d'étalonnage sont indispensables pour assurer l'obtention de spectres expérimentaux à un niveau exploitable pour l'analyse. Les raisons pour lesquelles ces procédures de correction doivent être implémentées sont : 1) les résultats de mesures se déroulant sur de longues périodes de temps (plusieurs semaines dans le cas de notre protocole pré-clinique) sont susceptibles d'être influencés par des variations de puissance de la source, de parasites lumineux ambiants, d'efficacité du détecteur, etc. Des incidents, tels que des pannes et le remplacement de certains composants instrumentaux, peuvent éventuellement survenir sur le système. La prise en compte de ces variations est donc une étape

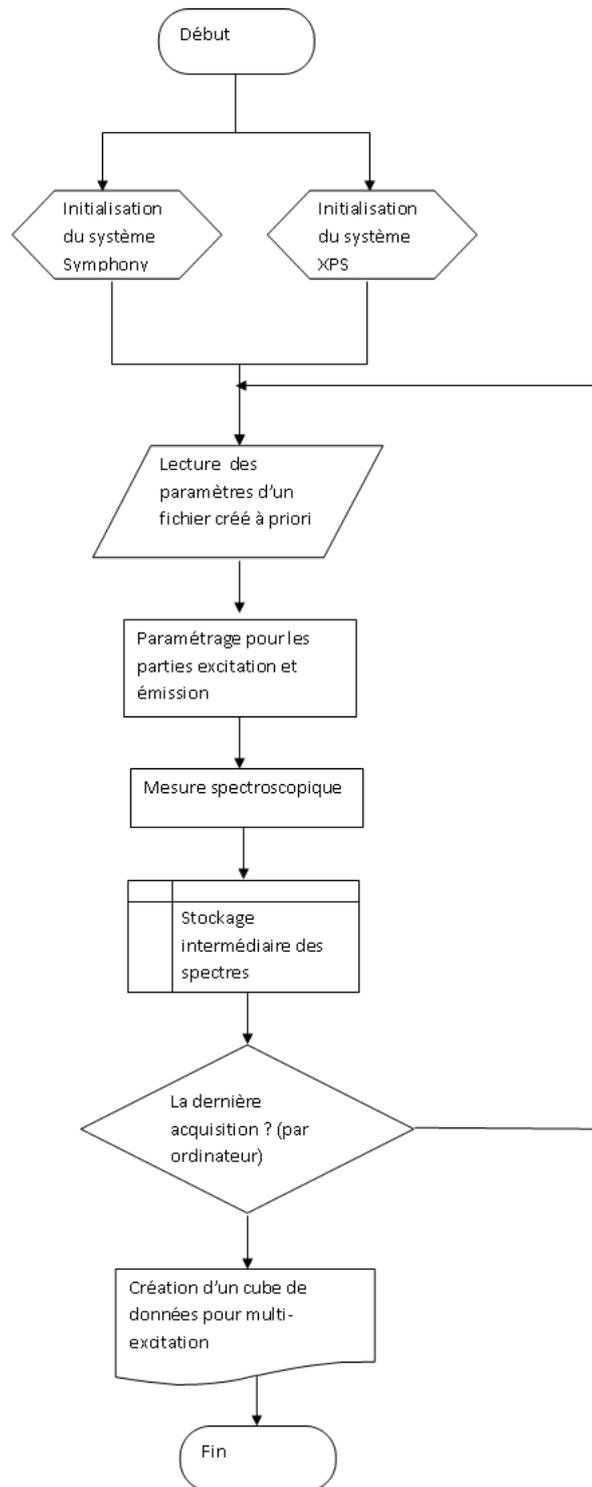
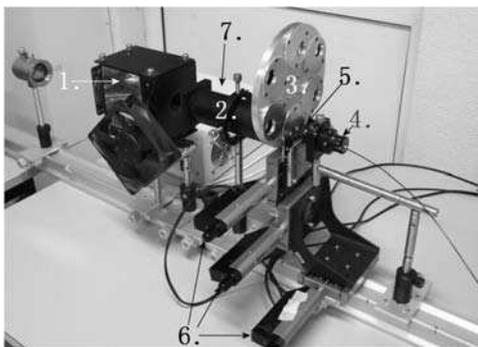


FIGURE 2.17 – Schéma-bloc illustrant le fonctionnement pour le nouveau système développé

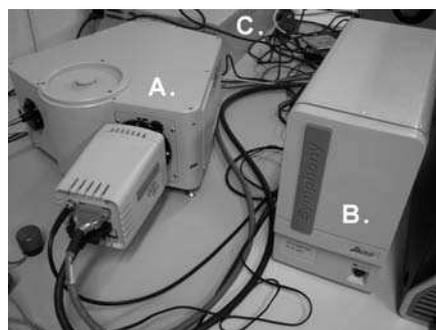
indispensable pour que les résultats de mesure acquis puissent être comparés ultérieurement et pour en extraire des caractéristiques discriminantes. Ensuite, les différents éléments optiques et opto-électroniques du système d'acquisition utilisé pour notre expérimentation possèdent des

H2											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1		M1	M2	F _{ex}	ADC	Gain	Accu	T	F _{recept}	Slit	M3
2	diffu 1	50	0	0	0	0	3	3	1	0.1	45
3	360nm	16.51	24.03	60	0	0	3	500	3	0.5	28.5
4	370nm	18.05	25.17	60	0	0	3	500	3	0.5	28.5
5	380nm	19.21	25.22	60	0	0	3	500	4	0.5	28.5
6	390nm	20.35	25.4	60	0	0	3	500	5	0.5	28.5
7	400nm	21.41	25.06	120	0	0	3	500	5	0.5	28.5
8	410nm	22.61	25.12	120	0	0	3	500	5	0.5	28.5
9	420nm	24.92	24.86	120	0	0	3	500	6	0.5	28.5
10	430nm	24.91	24.87	120	0	0	3	500	6	0.5	28.5
11	440nm	26.54	24.49	120	0	0	3	500	6	0.5	28.5
12											
13											
14											
15											
16											
17											

FIGURE 2.18 – Exemple de contenu d’un fichier de configuration pour le système. M_1, M_2, M_3 et F_{ex} = les valeurs pour le positionnement des filtres F_2, FL_1 et FL_2 (cf. schéma 2.8); ADC = la fréquence d’échantillonnage pour le convertisseur analogique-numérique; Gain, amplification du signal sortant de convertisseur analogique-numérique; Accu = nombre d’acquisition; T, temps d’exposition pour CCD; F_{recept} , position de la roue à filtres pour chacun des 6 filtres réception; Slit, largeur de la fente d’entrée du spectrographe.



2.19.1:



2.19.2:

FIGURE 2.19 – Photographie des parties du système avant leur intégration : partie d’excitation (2.19.1) comprenant : 1) Lampe Xénon PE300BF, 2) Tube intégrant le filtre anti-calorique et la lentille, 3)Roue à filtre, 4)fibre d’excitation et son support, 5)couple de filtres linéairement variable, 6)Platines motorisées, 7)Alimentation de la lampe; et partie acquisition (2.19.2)

constituée de : A)spectromètre + CCD, B)contrôleur Symphony, C)contrôleur XPS.

réponses spectrales non-linéaires, qui modifient la forme réelle des spectres d’intensité mesurés. Une correction adéquate pour calibrer les intensités mesurées en valeurs absolues est donc indispensable.

[Marin *et al.*, 2006] a proposé différentes séries de mesures à effectuer pour le calibrage de 3 systèmes spectroscopiques situés dans 3 sites cliniques différents. L’étude menée par [Marin *et al.*, 2006] a prouvé la nécessité et l’utilité de ces procédures pour corriger les spectres à un niveau comparable, en prenant en compte des facteurs expérimentaux différents (réponse du sys-



FIGURE 2.20 – Photographies des parties du système après leur intégration dans un rack transportable

tème, environnement, source, etc.). En nous inspirant de cette étude et selon nos propres critères d'exigence, des mesures d'étalonnage et de calibrage ont été définies puis appliquées au début de notre protocole d'expérimentation et à chaque jour de manipulation. Ces mesures et procédures sont décrites ci-après.

2.4.1 Etalonnage du détecteur en longueur d'onde

L'objectif de cette étape est de mettre en correspondance les 2048 colonnes de pixels du capteur CCD et les valeurs de longueur d'onde (dans la bande diffractée correspondante). Pour ce faire, le spectre d'intensité d'une lampe Mercure (Hg(Ar) Lampe, LSP035, LOT) est acquis au début de l'expérimentation. La figure 2.2 (cf. Section 2.1.1) montre le spectre typique d'une lampe mercure qui possède des raies d'intensité très étroites avec des pics de longueurs d'onde précises. Le calibrage du CCD en longueur d'onde consiste à repérer la position de ces pics de longueurs d'onde connues sur la ligne de pixels CCD puis d'interpoler les valeurs de longueur d'onde intermédiaires sur l'ensemble des pixels de la ligne. L'emploi de la lampe Ar-Me doit avoir lieu dans un espace bien ventilé, pour évacuer au maximum le gaz d'ozone dégagé par les radiations ultraviolettes émises par la lampe. De plus, pour éviter des déviations de mesure dues à la température, la mesure doit être effectuée après un certain temps de fonctionnement (30 minutes, typiquement).

2.4.2 Correction de la réponse spectrale du système

Le système d'acquisition est constituée d'une série de composants optiques et opto-électronique (fibre-spectrographe) ayant des réponses spectrales qui leur sont propres. Ces réponses caractéristiques peuvent être linéaires, **mais dans la plupart des cas non linéaires**, ce qui a pour effet de déformer le spectre recueilli à la surface du tissu. Pour corriger le spectre mesuré, on doit identifier la réponse globale du système et en déduire une fonction transfert du système.

En effet, la configuration optique de chaque fibre de réception peut être considérée comme un système d'acquisition indépendant. Les réponses spectrales de ces voies d'acquisition peuvent varier d'une fibre à l'autre et en fonction des caractéristiques des éléments optiques utilisés (filtres de réception, réseau de diffraction, etc.). Le calibrage doit donc être effectué individuellement pour chaque voie d'acquisition .

Le principe consiste à acquérir le spectre d'intensité d'une lampe de calibration (DH-2000, Ocean Optics, Duiven Netherlands) dans la configuration expérimentale prévue pour l'étude préclinique (fibres de réception et combinaison d'éléments optiques : filtres d'émission, réseaux de diffraction, CCD). La lampe fournit un spectre d'intensité étalonnée et garanti par le fabricant. La réponse spectrale peut être déterminée en divisant le spectre mesuré par celui d'étalonnage (cf. Fig.2.21).

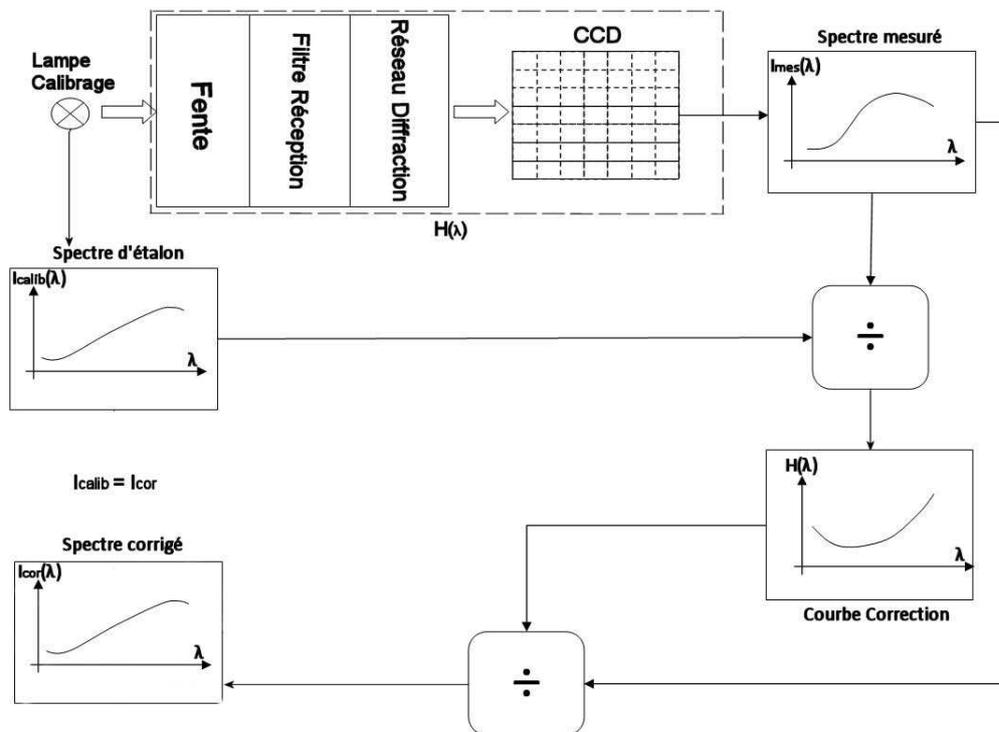


FIGURE 2.21 – Principe de la correction par rapport à la réponse spectrale non-linéaire du système, appliquée à chaque voie (fibre) de mesure

$$I_{mes}(\lambda) = H(\lambda) \times I_{calib}(\lambda) \quad (2.6)$$

où $I_{calib}(\lambda)$ est la courbe d'intensité étalonnée et $I_{mesure}(\lambda)$ est le spectre d'intensité mesuré. $H(\lambda)$ est la fonction transfert du système.

La figure 2.22 montre les courbes des facteurs de correction en fonction de la longueur d'onde, obtenues pour les 6 fibres de réception utilisées pour notre expérimentation. Ces courbes ont été acquises en utilisant un réseau de diffraction 150 et un filtre d'émission à 400nm. On peut voir qu'elles dépendent de la longueur d'onde. Lors de la correction du spectre mesuré ultérieurement

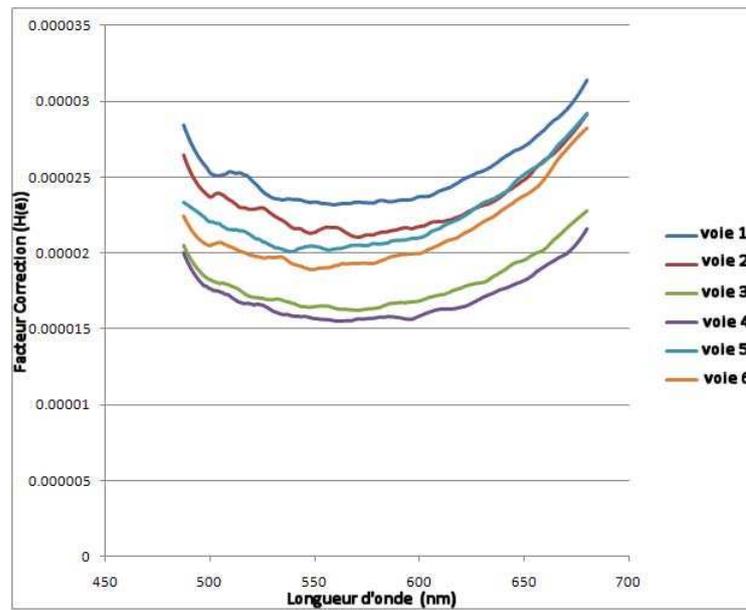


FIGURE 2.22 – Facteurs de correction de la réponse spectrale du système configuré pour l’acquisition à l’excitation de 360nm (appliqués à chaque voie d’acquisition)

sur le tissu, il suffit de diviser ce dernier point par point par la courbe de correction correspondant à la même configuration instrumentale.

2.4.3 Normalisation de la puissance de la source d’excitation

Afin que les valeurs absolues d’intensité d’AF mesurée ne dépendent que des propriétés optiques liées aux milieux biologiques à explorer, il est nécessaire de normaliser les spectres par rapport à la variation de la puissance de la source d’excitation. En effet, la source d’excitation (lampe Xénon 300W) présente une diminution relative de puissance en fonction du temps d’utilisation au cours des premières 50 heures (près de 25% de diminution, cf. la figure 2.23), puis faible et à tendance linéaire ensuite (-2,5% entre 50-100 heures ; -4.5% entre 100-500 heures).

Pour corriger nos spectres par rapport à cette diminution de puissance, nous avons effectué des mesures quotidiennes de puissance lumineuse [Chang *et al.*, 2002; 2005; Marin *et al.*, 2006] au bout de la sonde pour chaque faisceau d’excitation d’AF en utilisant un puissance-mètre Newport 841-PE muni d’un capteur optique Newport 818-UV. Les spectres mesurés doivent être divisés par la puissance mesurée au même jour, afin de tenir compte de cette variation.

2.5 Conclusion du chapitre

Vis-à-vis des limitations techniques du système d’instrumentation existant, nous avons effectué plusieurs améliorations :

- Augmentation (facteur de 3 – 10) de la puissance lumineuse en sortie de fibre excitatrice par optimisation des réglages mécano-optique pour l’injection du faisceau source dans la

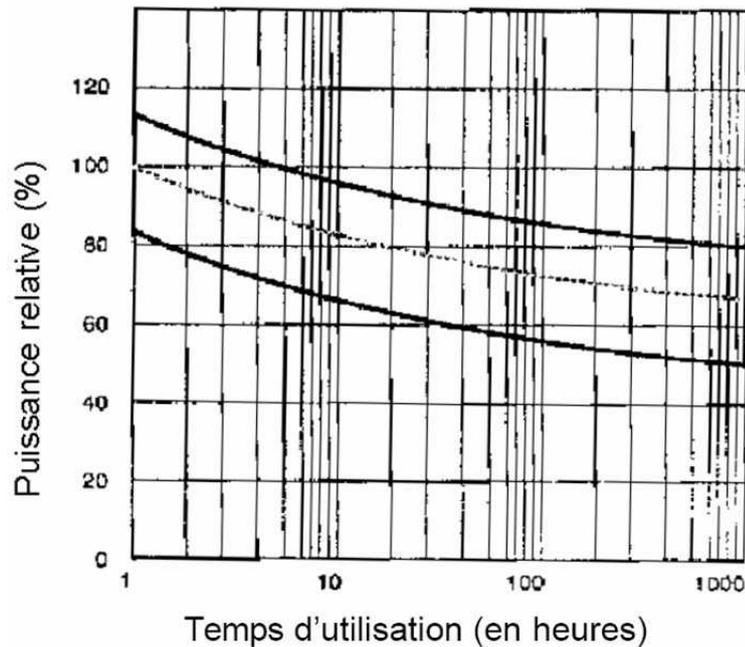


FIGURE 2.23 – Courbes typiques moyenne (trait pointillé), minimale et maximale (traits pleins) de variation de la puissance relative au cours du temps d'utilisation de la lampe Xénon 300W (<http://eurosep.com>)

- fibre et remplacement de celle-ci par une nouvelle sonde optique avec bundles de fibres ;
- Réduction du nombre de bande d'excitations nécessaires pour la mesure en RD, donc temps de mesure plus court (divisé par 3) ;
- Renforcement de la communication et de la synchronisation de chaque partie du système, ce qui permet une acquisition complètement automatique et un fonctionnement autonome à partir d'un fichier de configuration unique ;
- Intégration de la totalité du système dans un rack mobile en vue d'une future utilisation en clinique.

A la fin des travaux de développement instrumental, nous avons établi des procédures métrologiques spécifiques destinées à calibrer notre système de façon routinière pour notre expérimentation et aussi pour une future utilisation en clinique.

Les travaux envisageables à moyen terme pour étendre les performances du présent système peuvent être :

- Intégration d'une modalité temporelle apportant à la fois des informations qualitatives liée aux caractéristiques intrinsèques des fluorophores (durée de vie) et quantitatives liées au temps de vol des photons diffusés dans le milieu biologique ;
- Intégration d'un système mécanique de prélèvement, comme celui de "Biopsy Punch" (NA-

2105-030, medical solution gmbh, Rothusstrasse 23, 6331 Hünenberg) ou "Biopsie Punch stériles KAI" (LABODERM®, 14 rue Ferdinand de Lesseps, 95190 Goussainville) au bout de la sonde optique facilitant le prélèvement guidé et augmentant sa précision.

3

Étude préclinique *in vivo* sur tissus hypertrophiques

Ce chapitre présente l'étude expérimentale que nous avons menée sur un modèle animal de tissus cutanés hypertrophiques. L'objectif est de tester d'une part, l'efficacité de la spectroscopie multimodalités pour la caractérisation *in vivo* de tissus cicatriciels hypertrophiques, et d'autre part l'efficacité thérapeutique d'un produit anti-inflammatoire (Tacrolimus) pour la prévention et le traitement hypertrophiques. Après une présentation des éléments de choix du modèle pré-clinique de cicatrices hypertrophiques, nous détaillerons les contraintes de mesure liées au modèle que nous avons adopté et le protocole mis en place pour la fiabilité des résultats et la répétabilité des mesures. La classification des cicatrices (Hypertrophique (H) et Non-Hypertrophique (NH)) créées sur le modèle choisi à l'aide de plusieurs méthodes biomédicales (examen clinique, analyse anatomopathologique et étude microscopique en fluorescence). L'effet thérapeutique du produit peut être évalué par le nombre d'individus hypertrophiques présentés dans le groupe traité par Tacrolimus.

3.1 Modèle préclinique de cicatrice cutanée hypertrophique

3.1.1 Choix du modèle

L'étude expérimentale effectuée au cours de la première année de thèse a été menée en collaboration avec une chirurgienne du service de chirurgie maxillo-faciale de CHU de Nancy (H. Gisquet) dans le cadre de son stage de recherche de Master 2 portant sur "l'évaluation du traitement préventif des cicatrices hypertrophiques par injection *in situ* de Tacrolimus". L'objectif applicatif clinique est d'élargir les moyens thérapeutiques pour traiter la cicatrice hypertrophique/chéloïdienne, tout en diminuant le taux de récives et en facilitant l'administration aux patients. Pour notre étude, le mode d'administration adoptée est l'injection sous-cutanée d'une dose de Tacrolimus (*Prograf*® Astellas Pharma Inc., 2-3-11, Nihonbashi-Honcho, Chuo-Ku, Tokyo 103-8411, Japan) sur la plaie sensible au développement hypertrophique, ce qui permet d'agir localement et précisément sur la zone à traiter. Les lecteurs intéressés peuvent se reporter à la référence [Gisquet *et al.*, 2011] pour plus de détails concernant ce test pharmacologique. Le modèle choisi pour l'expérimentation doit prendre en compte à la fois les exigences posées par l'étude pharmacologique et par notre objectif de réaliser des mesures spectroscopiques *in vivo* sur tissus

sains et sur cicatrices hypertrophiques.

3.1.1.1 Modèles *in vitro* et *ex vivo*

Selon la littérature, jusqu'à présent, une cicatrice hypertrophique ou une chéloïde est très difficile à créer en culture cellulaire et tissulaire *in vitro* [Khorshid, 2005; Ramos *et al.*, 2008]. Plus précisément, la réduction de tension cutanée au niveau de la plaie semble responsable de l'échec de formation hypertrophique *in vitro*. [Akaishi *et al.*, 2008]

Cependant, il est possible de conserver une cicatrice hypertrophique humaine en milieu de culture environ 60 jours pour une étude *ex vivo* ou *in vitro*. En général, les études réalisées, l'ont été sur des fibroblastes de chéloïdes mis en culture, ce qui ne permet pas de mettre en évidence les modifications liées à la réaction inflammatoire qui nécessite des médiateurs (cytokine et lymphocytes) provenant de la circulation sanguine.

Ces approches ne conviennent pas pour notre étude qui vise à une validation *in vivo* d'efficacité du produit pharmacologique et de notre méthode diagnostique sur des cicatrices hypertrophiques les plus proches possible de la réalité physiologique.

3.1.1.2 Modèles *in vivo*

Les animaux ne font pas de cicatrice chéloïdale spontanée et un modèle animal de cicatrice hypertrophique est difficile à mettre au point [Khorshid, 2005; Ramos *et al.*, 2008] .

Seuls les chevaux présentent des cicatrices hypertrophiques aux pattes. Elles s'apparentent aux chéloïdes humaines, mais histologiquement n'en sont pas. La greffe de chéloïde humaine sur la souris nude a également été validée [Kischer *et al.*, 1989]. Mais ce modèle ne convient pas pour une étude visant à évaluer en parallèle l'effet d'un traitement immuno-modulateur sur la formation de cicatrice hypertrophique.

Cependant depuis une vingtaine d'années, quelques équipes ont réalisé des tests pharmacologiques sur des plaies de face ventrale d'oreille de lapin qui semble être aujourd'hui un modèle établi pour étudier les cicatrices hypertrophiques [Xie *et al.*, 2008b; Xie. *et al.*, 2008a; Kloeters *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 2008].

Les cicatrices hypertrophiques obtenues ainsi réagissent de la même manière que les cicatrices hypertrophiques humaines : elles sont plus fréquentes sur lapins jeunes que sur lapins âgés (cohérent avec l'incidence chez l'homme). Ce modèle donne des réponses thérapeutiques équivalentes à celles chez l'humain : elles diminuent avec un traitement par corticoïde, par plaque de silicone [Berman *et al.*, 2009], par inhibiteur de synthèse de collagène et par blocage du Facteur de Croissance Transformant Beta (FCTB ou "Transforming Growth Factor beta", ($TGF - \beta^2$)). Les données de la littérature n'indiquent pas le taux de cicatrices hypertrophiques effectivement obtenue par rapport au nombre de plaies, mais il semble qu'il s'agisse d'un pourcentage élevé puisque ce modèle a été choisi par plusieurs équipes.

2. $TGF - \beta$: une protéine qui contrôle les proliférations et divisions cellulaires dans la plupart de cellules

Bien que l'histologie des chéloïdes humaines et celle des cicatrices hypertrophiques de lapin ne soient pas exactement les mêmes (épaisseur des couches, pigmentation, etc.), ce modèle unique constitue un support privilégié pour l'acquisition de données spectroscopiques *in vivo* sur des cicatrices normales et hypertrophiques. Si l'efficacité de notre approche est validée pour la caractérisation tissulaire sur ce modèle, des modifications instrumentales (source d'excitation plus puissante, distances inter-fibres plus grandes) pourront ensuite être envisagées afin de l'adapter à la profondeur d'exploration et aux caractéristiques histologiques de la peau humaine.

Par ailleurs, le lapin est aussi le modèle de référence pour la recherche sur l'épithélium de cornée, et la plupart des études dermatologiques.

3.1.2 Technique d'induction de cicatrice hypertrophique

Selon la littérature [Xie *et al.*, 2008b; Xie. *et al.*, 2008a; Kloeters *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 2008], les cicatrices hypertrophiques peuvent être créées sur les oreilles de lapin. Dans ces étude, des plaies d'au minimum 7mm de diamètre sont réalisées sur la face ventrale des oreilles de lapin, emportant épiderme, derme et périchondre, ce qui entraîne un retard d'épithélialisation de deux semaines environ, afin de favoriser l'apparition de cicatrices hypertrophiques. Une perte de substance d'un diamètre inférieur pourrait amener les tissus de la plaie à se contracter et il n'y aurait pas de retard d'épithélialisation. Le fait de prélever le périchondre entraîne un retard de cicatrisation qui va être à l'origine de la réaction hypertrophique de la cicatrice. D'autre part, le type de collagène du cartilage élastique constituant le pavillon de l'oreille (collagène II) est différent de celui de la peau (collagène I), ce qui favorise la réaction inflammatoire.

L'épaisseur du derme et du cartilage n'étant pas la même d'un bout à l'autre de l'oreille, l'apparition des cicatrices hypertrophiques est favorisée dans la partie inféro-interne de l'oreille [Zhu *et al.*, 2008]. En pratique (Fig. 3.1), nous avons réalisé 2 plaies circulaires par oreille en prélevant le tissu cutané de 1cm² (à bistouri). Une taille de plaie plus grande que celle mentionnée dans la littérature nous a permis d'injecter plus facilement le Tacrolimus et de disposer d'échantillons en nombre suffisant pour les expertises (histopathologique et dosage de TGFb) réalisées ultérieurement. Les plaies créées sont distantes de 4cm afin de limiter les interactions potentielles. Elles étaient situées sur la face ventrale au bout ou à la base des oreilles et emportaient le périchondre. Le prélèvement a été réalisé sous anesthésie générale. Le protocole d'anesthésie générale comportait une injection intramusculaire de kétamine (45mg/kg) et xylazine (7mg/kg). Le protocole d'anesthésie ainsi que celui de la cicatrisation ont été approuvés par le comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale de Nancy/Lorraine/Nord-Est. Il a permis une durée d'anesthésie d'environ 30 minutes pour chaque animal, suffisante pour réaliser les prélèvements.

La perte de substance n'était pas refermée mais recouverte d'un pansement auto-collant de type Tegaderm® qui était changé autant de fois que nécessaire afin d'éviter toute surinfection de la plaie ou dessèchement du cartilage. Une fois la plaie épithélialisée, les pansements n'étaient plus nécessaires. D'après la littérature et nos propres observations, la cicatrice s'épithélialisait environ 2 semaines après le prélèvement et la cicatrice hypertrophique apparaissait dans les 28 jours.

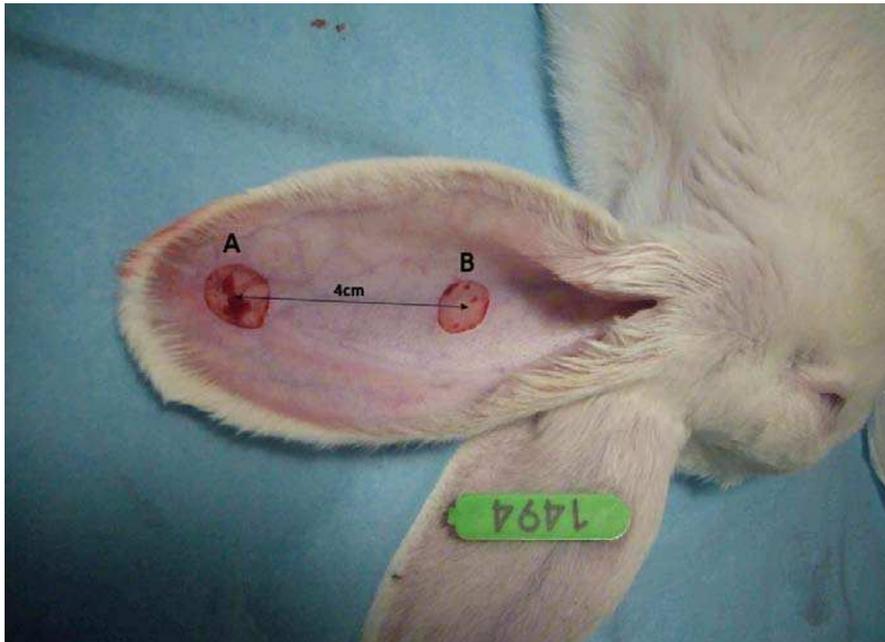


FIGURE 3.1 – Photographie de plaies réalisées sous anesthésie générale sur la face ventrale d'une oreille de lapin au niveau de l'extrémité (A) et de la base (B)



FIGURE 3.2 – Photographie illustrant un exemple de cicatrice hypertrophique avec des croûtes 28 jours après le prélèvement au niveau de la base de l'oreille

3.1.3 Mise au point du modèle et du protocole

3.1.3.1 Etude préliminaire et validation du modèle

Afin de mettre au point le modèle et le protocole associé (induction, suivi, mesures, analyses), nous avons réalisé une étude préliminaire sur 4 lapins. Le protocole décrit précédemment est appliqué à l'extrémité et à la base des oreilles de chaque lapin. Les cicatrices créées à 28 jours après la perforation ont été soumises aux expertises histopathologiques pour caractériser leur nature. Les examens réalisés sont les suivants :

- Evaluation clinique selon les échelles de valeurs de l'érythème, et de l'élévation cicatricielle ;

- Analyse histologique en microscopie des prélèvements collectés à J28. Nous avons mesuré pour toutes les plaies, à J28, l'épaisseur de l'épiderme, du derme, du cartilage et du périchondre, la densité cellulaire au grossissement x40, et l'Indice d'Élévation Cicatriciel (IEC, cf. Fig. 3.3) qui représente la différence de hauteur entre l'épaisseur maximale de la cicatrice et celle de la peau normale adjacente, en prenant comme seuil le plan du cartilage ;

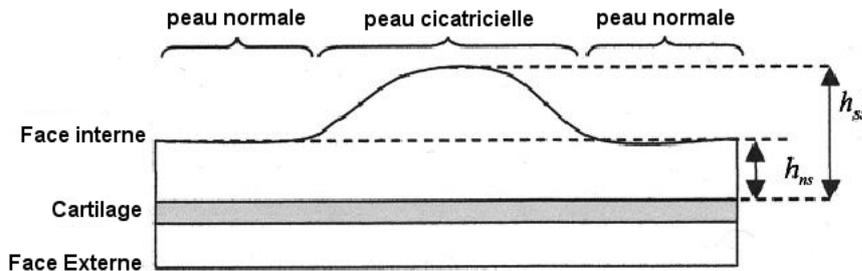


FIGURE 3.3 – Schéma représentant les épaisseurs mesurées pour le calcul de l'indice d'élévation cicatricielle. $IEC = \frac{h_{ss} - h_{ns}}{h_{ns}}$

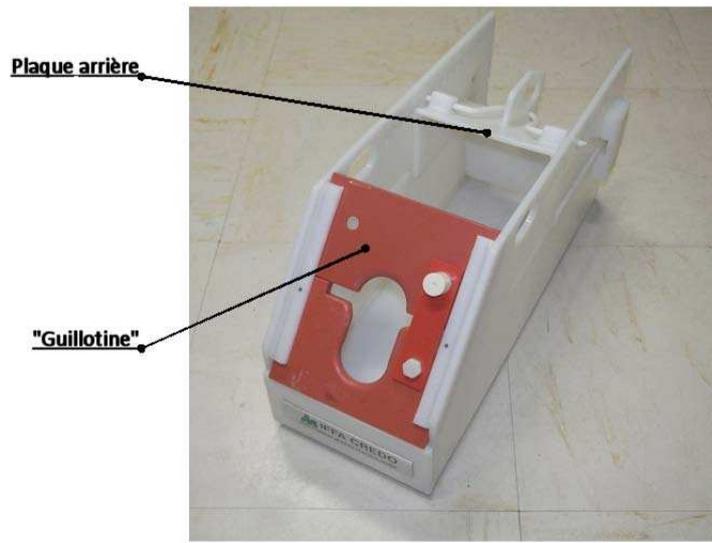
- Etude en imagerie microscopique confocale, qui permet de visualiser le réseau de fibres de collagène, leur densité et leur orientation, sachant que plus le réseau de collagène est bien organisé, plus il apparaît fluorescent.

Au final pour cette étude préliminaire sur 4 lapins, 4 sites sur 16 n'ont pas produit de cicatrice hypertrophique. Ces 4 sites où la création de cicatrice hypertrophique a échoué concernent les oreilles gauches de deux lapins ; nous supposons que l'efficacité de cette méthode d'induction de cicatrice hypertrophique est éventuellement âge-dépendante, comme mentionné dans la section 1.2.4.1. Donc, une stratégie d'organisation d'expérimentation doit être appliquée dans notre étude principale afin de tester sans biais l'efficacité du Tacrolimus en traitement de cicatrice hypertrophique (cf. Section 3.2.1 ci-après). En revanche, l'apparition des cicatrices hypertrophiques sur les 12 autres sites n'était pas significativement dépendante de leur localisation anatomique (extrémité ou base de l'oreille).

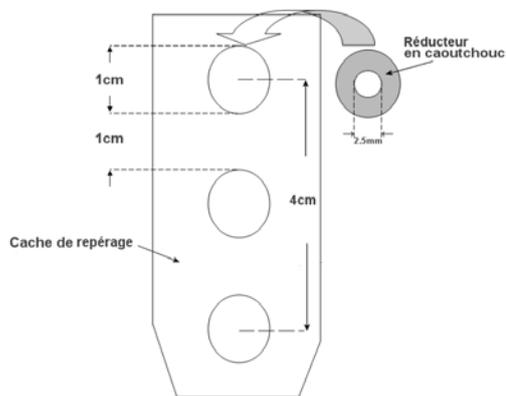
3.1.3.2 Difficultés liées aux mesures spectroscopiques

Le second objectif de cette étude préliminaire était d'anticiper les problèmes techniques éventuellement liés aux mesures spectroscopiques *in vivo* sur le modèle adopté. La littérature mentionne que les lapins sont fragiles face à l'anesthésie. L'anesthésie est donc faisable uniquement si des mesures de sécurité sont bien mises en place (agents anesthésique adéquats, dosage correct, procédures pré-anesthésique respectées, etc.). De plus, la fourniture de produits anesthésiques est strictement contrôlée par l'état, donc la quantité de produits attribuée pour notre étude était juste suffisante pour les prélèvements tissulaires prévus. Les mesures spectroscopiques devaient donc être réalisées sans anesthésie. Or, le comportement incontrôlable des animaux, surtout soumis au stress d'une situation inconnue, entraîne des mouvements imprévisibles provoquant des artefacts de mesure.

Pour réduire l'influence du problème de mouvement, nous avons utilisé des "cages" de contention afin d'immobiliser au maximum le lapin pendant les mesures spectroscopiques. La photographie dans la figure 3.4.1 montre une de ces boîtes. Elles sont classiquement utilisées pour des tests pyrogène, l'injection et la prise de sang. La structure de la boîte est spécifiquement conçue pour optimiser la contention du lapin en protégeant son dos et son cou. La pièce de "guillotine" supérieure permet d'immobiliser facilement la tête du lapin, tandis qu'une plaque arrière sert à bloquer le corps tout en s'adaptant aux différentes tailles de lapins.



3.4.1:



3.4.2:



3.4.3:

FIGURE 3.4 – Pièces d'accessoires utilisées pour l'expérimentation : la cage de contention servant à immobiliser le lapin au cours des mesures 3.4.1 ; cache utilisé pour le repérage/positionnement de la sonde fibrée 3.4.2 ; La figure 3.4.3 montre l'utilisation du cache conçu pour la fixation/repérage de la sonde pendant des mesures spectroscopiques

Les cicatrices créées mesurent environ 1cm de diamètre et leur état évolue au cours du temps, ce qui nécessite de repérer le site de mesure spectroscopique de façon suffisamment précise et reproductible. Afin d'assurer des conditions optimales de répétabilité de nos mesures, un cache de repérage a été fabriqué (atelier de l'ENSEM) pour assurer le bon positionnement de la sonde fibrée (cf. Fig. 3.4.2). Il est composé de deux plaques en PVC dont la forme est conçue pour bien s'adapter à l'anatomie de l'oreille des lapins. L'oreille est maintenue (légèrement serrée) entre ces 2 plaques. Trois trous de 1cm de diamètre (espacés de 2cm) se trouvent sur la plaque supérieure fixée sur la face ventrale de l'oreille. Lors de la mesure, le cache est attachée sur l'oreille du lapin en alignant les bordures des cicatrices et les trous sur la plaque (cf. Fig. 3.4.3). Un bouchon en caoutchouc noir obture le trou au niveau du site de mesure et empêche la lumière ambiante de pénétrer le site de mesure. La fibre optique est introduite par un trou situé au milieu du bouchon jusqu'à ce qu'elle vienne en contact avec le tissu. Ce montage nous assure que le site de mesure est toujours le même sur la cicatrice au cours de toute l'expérimentation.

3.2 Expérimentation

3.2.1 Organisation des expérimentations

Pour l'accord du protocole, un dossier décrivant le déroulement a été transmis au comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale de Nancy/Lorraine/Nord-Est. Après examen du dossier, le protocole d'étude a été approuvé en janvier 2009 avant le commencement de l'expérimentation.

Pour cette étude, nous disposons de 20 lapins femelles de Nouvelle-Zélande de 2,5 à 4 kg. Les lapins ont été fournis par le C.E.G.A.V. SSC (Les Hautes Noës, 61350 ST Mars D'Egrenne). Ils étaient identifiés par tatouage ou boucle d'oreille. Les animaux ont été logés et nourris *ad libitum* à l'animalerie de la faculté de médecine de Nancy. Les lapins ont été pesés chaque jour d'expérimentation afin de contrôler leur santé et d'évaluer des effets secondaires liés à l'application de l'anti-inflammatoire.

A la fin de l'expérimentation, les lapins, au lieu d'être euthanasiés, ont été gardés dans l'animalerie pour une autre étude (Pr. F. Marchal au laboratoire de physiologie de la faculté de médecine de Nancy), avec l'accord du comité d'éthique.

Compte tenu des incertitudes d'apparition de cicatrice hypertrophique (cf. section 3.1.3.1) nous avons divisé le protocole d'expérimentation en 2 phases successives de 28 jours chacune (cf. Fig. 3.5).

PHASE 1 : A J0 (jour 0), les mesures spectroscopiques sont effectuées sur la peau intacte (au niveau de l'extrémité et de la base) en utilisant le "cache" de repérage. Puis, une des oreilles de chaque lapin est choisie aléatoirement pour créer 2 plaies. L'état général du lapin et l'évolution de la plaie sont ensuite surveillés après le prélèvement pendant 28 jours à l'animalerie.

A J28, nous avons évalué la nature de chaque cicatrice (cicatrice hypertrophique ou non-hypertrophique) à l'aide des critères cliniques (degré d'érythème et d'élévation). Ensuite, les

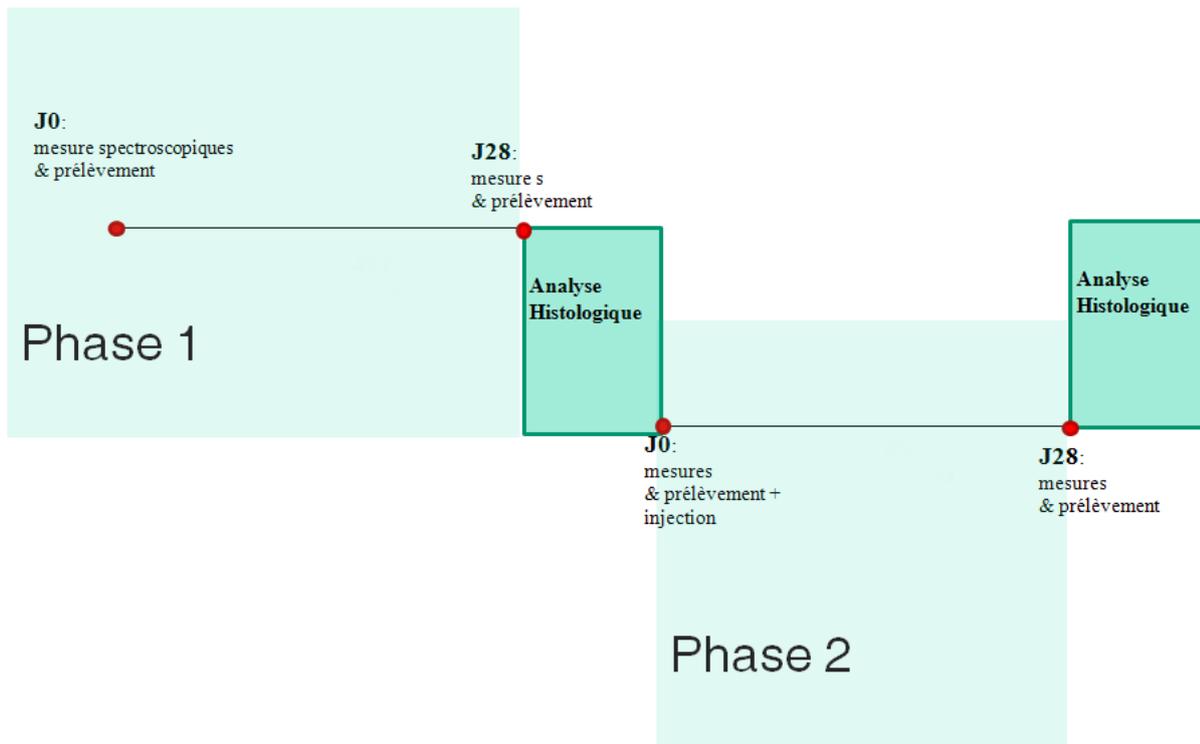


FIGURE 3.5 – Organisation chronologique de l'expérimentation

cicatrices emportant toute l'épaisseur de l'oreille ont été prélevées pour analyse anatomopathologique. Les résultats obtenus par ces méthodes nous ont permis de confirmer ou définir définitivement la nature de chaque cicatrice. Si les résultats étaient négatifs pour l'apparition de cicatrice hypertrophique, le lapin était exclu de la suite du protocole. Sinon, il était pris en compte pour la seconde phase de l'étude.

PHASE 2 : Pour les lapins ayant développé une cicatrice hypertrophique au cours de la première phase, la même technique d'induction cicatricielle a été appliquée sur l'autre oreille intacte, juste après la mesure spectroscopique. Pour cette seconde phase, une dose de Tacrolimus était injecté dans la plaie créée.

A J28 de la deuxième phase, les cicatrices ainsi traitées étaient prélevées sur toute leur épaisseur après mesures spectroscopiques.

Les résultats d'analyse anatomopathologique sur les prélèvements obtenus à J28 des deux phases étaient utilisés pour caractériser chaque cicatrice créée.

3.2.2 Mesures spectroscopiques

Préparation des sites de mesure Pour les mesures spectroscopiques, les lapins ont été transporté en salle d'expérimentation dans des cages à couvercle filtrant (cages de livraison, Charles River Laboratoires, Lyon, France).

Les procédures de calibrage décrites dans la section 2.4 sont effectuées chaque jour avant l'expérimentation, afin de corriger les spectres par rapport à la variation de puissance de la source. Une mesure en sphère intégrante dans la bande (350 – 800nm) est effectuée chaque jour pour le calcul de la réflectance diffuse.

Chaque oreille de lapin est préparée par application d'une crème dépilatoire et rinçage avec de l'eau distillée avant la mesure. Le cache PVC est attaché sur l'oreille pour tracer des ronds à l'aide des trous en haut et en bas du cache. Ces marquages au stylo dermatographique indélébile nous permettent de contourner ultérieurement le site pour le prélèvement. Les réducteurs en caoutchouc bouchent les trous pour cacher complètement le site. Ensuite, la sonde fibrée est introduite par le trou au centre du réducteur jusqu'à ce qu'elle touche le tissu. Ensuite, on charge les paramètres (cf. Fig.2.18) de configuration au système avant de lancer l'acquisition. Le tableau (3.1) énumère les paramètres utilisés pour nos mesures pendant l'expérimentation. Les acquisitions spectrales sont effectuées automatiquement en multi-excitation sur chaque site. A la fin de la mesure, les données spectrales sont enregistrées automatiquement dans un fichier Excel multi-pages pour post-traitement.

TABLE 3.1 – Paramètres utilisés pour la mesure spectroscopique *in vivo*

Excitation (<i>nm</i>)	Nombre d'acquisition	Temps d'intégration (<i>ms</i>)	Largeur de fente(<i>mm</i>)
AF(λ_{ex} 360, 370, ... 430)	3	500	0,5
RD(350 – 700)	3	3	0,1

Prélèvements cutanés Les biopsies de la peau intacte et/ou des tissus cicatriciels ont été réalisées à l'animalerie le même jour que les mesures spectroscopiques.

Pour les prélèvements de la peau intacte, le site de mesure marqué au stylo dermatographique est prélevé sous anesthésie générale, après désinfection à la chlorhexidine. Nous emportons la peau et le périchondre sans entamer le cartilage avec l'injection de 0,2ml de sérum physiologique dans la plaie. Ensuite, la pièce prélevée est coupée en deux : une partie congelée dans l'azote liquide transportée au Centre Alexis Vautrin (CAV), puis conservée dans un congélateur à -80 degrés pour analyse immuno-chimique ultérieure ; et l'autre partie punaisée sur un carton pour qu'elle garde sa taille d'origine et conservée avec fixateur AFA (Alcool Formole Acétique) avant d'être mise en bloc le même jour pour l'analyse histologique. La plaie laissée après le prélèvement est couverte par un pansement transparent qui nous permet de la surveiller pendant la cicatrisation

Pour les cicatrices créées à J28 dans les première et deuxième phases, toute l'épaisseur de l'oreille est prélevée. De même, la pièce est coupée en deux pour analyse histologique et immuno-chimique, respectivement. Le trou perforé est refermé par couture chirurgicale et couvert par une gaze.

3.3 Analyses histologiques

3.3.1 Matériels et méthodes

La lecture des lames de prélèvement a été réalisée au sein de l'unité de biologie des tumeurs du Centre Alexis Vautrin sous la direction du Dr. A. Leroux et du Pr. J.L.Merlin.

Les échantillons conservés dans l'AFA ont été mis en bloc de paraffine, puis colorés au trichrome de Masson. Chaque pièce a été coupée en lamelle de $4\mu m$ d'épaisseur avant d'être déposée sur lame pour la lecture. Toutes les lames ont été observées sous microscope (Axioskop, Zeiss, Allemagne) aux grossissements de $\times 1, 25$ à $\times 40$ et photographiées à l'aide d'une caméra CCD (DXC-390p, Sony, Japon). La figure (3.6) montre des images de coupes au grossissement $\times 40$ de tissus sains, cicatriciels hypertrophique et non-hypertrophique. D'après notre observation, la densité cellulaire est plus élevée pour les sites hypertrophiques que pour les tissus sains et cicatriciels normaux. En plus, pour les coupes de tissus hypertrophiques, l'endroit cicatriciel est visiblement plus épais par rapport à l'endroit non-cicatriciel adjacent. Ces observations sont toutes en cohérence avec les résultats publiés dans la littérature. Afin de quantifier ces observations qualitatives, nous avons mesuré l'épaisseur de chaque couche du tissu (épiderme, derme, cartilage et périchondre¹), ainsi que la densité cellulaire (grossissement $\times 40$) à l'aide des logiciels d'acquisition d'images (Tribvn ICS, Tribvn, France) et de traitement de données (Osiris, Unité d'Imagerie Numérique de l'Hôpital de Genève, Suisse). L'indice d'élévation cicatricielle (IEC) qui rend compte de la différence de hauteur entre l'épaisseur maximale de la cicatrice et celle de la peau adjacente a été calculé. Les résultats obtenus montrent que ces paramètres sont tous significativement plus élevés ($p < 0,05$ test de Fisher) pour les sites hypertrophiques ($n = 31$) que pour ceux non-hypertrophiques ($n = 28$).

TABLE 3.2 – Nombre de cicatrices hypertrophiques apparues dans l'étude

	n	Densité Cellulaire ($unit/\mu m^2$)	Epaisseur d'Élévation (μm)
Sain	80	0,5	-
Hypertrophique	31	4,35	1440
Non-Hypertrophique	28	2,60	470

3.3.2 Résultats

D'après la littérature, le dosage du TGF β est une méthode efficace pour observer la croissance cellulaire due à la synthèse fibroblastique du collagène, comme c'est le cas pour les cicatrices hypertrophiques. Cependant, après plusieurs essais de différents anticorps reconnaissant le TGF β , son dosage par méthode "Western Blot" ne nous a donné aucune réponse sur le tissu de lapin. Nous avons vérifié notre méthode de dosage sur le rat et prouvé que notre protocole d'extraction de protéine et les produits utilisés étaient corrects. Sans autre information exploitable de la littérature concernant le dosage du TGF β chez des lapins, cette technique n'a pas pu aboutir dans le cadre de cette étude.

1. périchondre : tissu conjonctif dense irrégulier, constitué du fibroblastes et d'une réseau dense de fibres de collagène

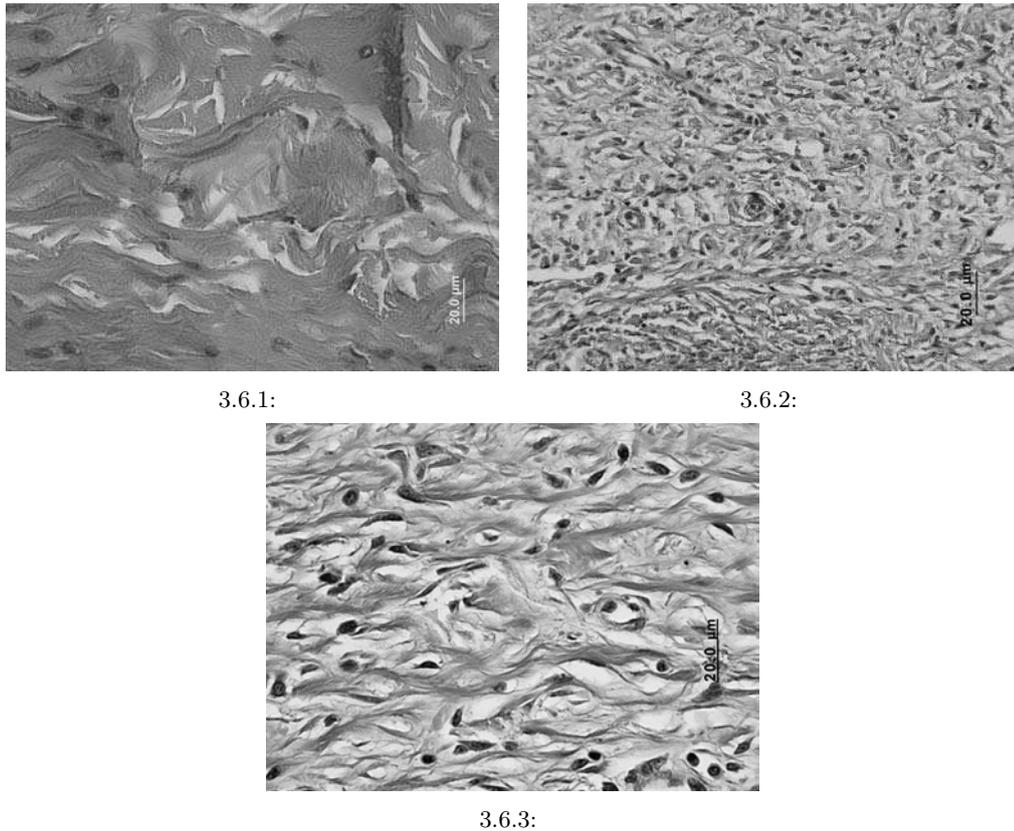


FIGURE 3.6 – Images de coupes illustrant les variations de Densité Cellulaire (au grossissement $\times 40$) entre les tissus sain (3.6.1), cicatriciel hypertrophique (3.6.2) et cicatriciel non-hypertrophique (3.6.3)

Seuls les paramètres mesurés en microscopie ont été pris en compte pour caractériser les tissus cicatriciels. Chaque cicatrice a été classée en classe hypertrophique (H) ou non-hypertrophique (NH) selon les données histologiques obtenues.

TABLE 3.3 – Nombre de cicatrices hypertrophiques apparues dans l'étude

	Hypertrophiques	Non-Hypertrophiques	Total
1 ^{ère} Phase	24	6	30
2 ^{ème} Phase	7	22	29
Totale	31	28	59

Pendant ce protocole expérimental, 5 lapins sur 20 n'ont pas produit de cicatrice hypertrophique pendant la première phase et ont donc été écartés pour la phase 2. Parmi les 15 lapins restants, 5 ont donné une cicatrice hypertrophique sur une des deux plaies mais pas sur l'autre, soient 24 cicatrices hypertrophiques au total pour la première phase (cf. Tab. 3.3). Dans la deuxième phase, après l'application du Tacrolimus sur les plaies créées, le nombre de cicatrices hypertrophiques a été réduit à 7. Pour ce modèle, le traitement des cicatrices hypertrophiques par Tacrolimus est significativement efficace ($p < 0,0001$, test Fisher sur les nombre de cas hypertrophiques entre phase 1 et 2).

dans le traitement préventif des cicatrices hypertrophiques/chéloïdales et d'autre part, les conditions et contraintes météorologiques prises en compte pour réaliser les mesures de spectres *in vivo*. La caractérisation tissulaire par classification spectrale est présentée dans le chapitre suivant.

Bien que nous nous soyons basés sur un protocole préclinique déjà décrit dans la littérature, le modèle expérimental n'a permis d'obtenir que 24 cicatrices hypertrophiques pour 40 plaies en phase 1 (non-traités par le tacrolimus), soit un taux de réussite de 60%. Etant donné que ce type de problème n'a été mentionné par aucune équipe utilisant ce modèle, nous pensons qu'il pourrait être dû à la dispersion des âges entre les lapins. Par exemple, chez l'humain, la cicatrice hypertrophique est plus fréquente dans la population jeune. Cette caractéristique épidémiologique pourrait peut-être exister chez les lapins.

Par ailleurs, d'après les résultats des tests statistiques, aucune différence significative n'a été constatée entre les sites anatomiques (base et extrémité) en terme d'apparition de cicatrice hypertrophique. Ce résultat ne confirme pas ceux publiés par [Zhu *et al.*, 2008].

Selon les données issues de l'analyse anatomopathologique, le produit testé a significativement diminué le nombre de cicatrices hypertrophiques pour les plaies créées sur le modèle, indiquant son efficacité potentielle dans le traitement préventif de cicatrices hypertrophiques.

Pour les mesures spectroscopiques, nous avons mis en place un protocole pour acquérir des spectres en multi-excitation sur un modèle animal sans anesthésie. Des pièces de contention/positionnement ont été fabriquées afin de résoudre les problèmes d'artéfacts liés aux mouvements de l'animal pendant la mesure. Les données spectroscopiques sont acquises sur chaque site cicatriciel avec un jeu de paramètres de configuration instrumentale (temps d'intégration, largeur de fente, nombre d'accumulation, etc.) adapté aux spécificités du modèle.

4

Sélection et classification de données spectroscopiques

Ce chapitre présente en première partie un état de l'art bibliographique concernant les problèmes de classification de données spectroscopiques multi-dimensionnelles. Elle rassemble toutes les étapes analytiques nécessaires et les méthodes proposées dans la littérature, pour extraire des paramètres discriminants, voire informatifs, pour une classification optimale.

A partir de cette étude bibliographique relativement exhaustive, nous proposons des méthodes plus adaptées aux spécificités de notre jeu de données et dont l'originalité reside dans une recherche automatique et systématique de caractéristiques spectrales discriminantes. Les résultats obtenus sont discutés en recherchant les corrélations possibles avec les aspects pathologiques liées à la progression hypertrophique.

4.1 Etat de l'art sur le traitement des données spectroscopiques en vue d'une classification tissulaire

Appliquée au diagnostic tissulaire, la classification tissulaire par spectroscopie optique consiste à chercher au sein des spectres d'intensités mesurés sur ces tissus (l'AF et/ou la RD notamment) des indicateurs spectraux permettant de les différencier en fonction de leurs propriétés photophysiques reliées aux états sains et pathologiques à diagnostiquer.

Pour ce faire, les différents algorithmes de traitement de données développés dans la littérature concernent 3 types d'approches : les techniques empiriques, statistiques ainsi que celles basées sur un modèle analytique.

Les techniques "empiriques" exploitent l'information d'intensité spectrale absolue ou des rapports d'intensités à certaines longueurs d'onde ou dans des bandes spectrales bien spécifiques [Georgakoudi *et al.*, 2003]. Cette approche est facile à mettre en œuvre, mais n'exploite pas les caractéristiques du spectre entier et donne rarement des informations quantitatives directement liées aux caractéristiques histologiques. Les approches statistiques, telle que l'Analyse en Composantes Principales basée sur la relation linéaire existant entre les intensités spectrales, analysent

des points de données projetées sur un espace orthogonal. Ces approches statistiques sont la plupart du temps mises en œuvre pour l'analyse de spectres dans leur totalité en améliorant la visualisation et le traitement de la distribution des données transformées dans le nouvel espace. Les caractéristiques extraites de ces données pour la classification sont des combinaisons (linéaires pour l'ACP) des intensités spectrales sur plusieurs longueurs d'onde. De ce fait, ces caractéristiques sont difficilement interprétées par rapport aux variations biophysiques qui découlent du développement pathologique.

Les méthodes analytiques permettent d'extraire des paramètres optiques (μ_a, μ_s , rendement quantique de fluorophore, etc.) à la base d'un modèle mathématique qui relie les propriétés du milieu biologique avec la quantité de lumière détectée. Les paramètres optiques obtenus de cette manière permettent au clinicien de caractériser la morphologie et/ou la composition biochimique du tissu, voire de donner des explications histopathologiques liées à la variation de ces grandeurs pour différents tissus.

Des algorithmes de reconnaissance de forme sont également appliqués avec comme objectif d'établir un modèle de séparation pour mieux distinguer les classes constituant le jeu de données. Un modèle idéal doit avoir une structure simple pour une classification efficace. Il est donc intéressant de traiter un jeu de variables de dimension plus réduite. Sélectionner de "meilleures" variables pour la construction d'un modèle optimal est une étape critique dans la classification. L'échantillon utilisé pour le développement du modèle (appelé jeu d'apprentissage) a, la plupart du temps, une taille limitée. Le modèle développé à partir de ce jeu d'apprentissage doit ensuite être testé sur un jeu de données plus grand pour valider ses performances. Cependant, dans certaines applications, en particulier biomédicales à cause du coût d'obtention des données expérimentales, ce test ne peut être effectué que sur un jeu de donnée unique. Une méthode de validation est donc nécessaire pour évaluer la performance du modèle avec un biais faible. Une fois le modèle validé, il peut être utilisé pour prédire l'appartenance de classe pour un nouvel élément, en fonction d'un nombre réduit d'indicateurs discriminants.

Par ailleurs, afin de maximiser l'exploitation des spectres mesurés et la découverte de différences significatives existant entre les spectres des différentes classes, une étape de prétraitement est indispensable pour rendre ces spectres totalement comparables. Ce prétraitement peut concerner des étapes méthodologiques, telles que le calibrage de l'instrument et l'application d'algorithmes de correction spectrale. La nécessité et les procédures de calibrage du système expérimental ont été mentionnées dans la section 2.4 du chapitre 2 (p. 60). Nous allons décrire dans la section ci-après les algorithmes de correction spectrale utilisés pour différentes études spectroscopiques dans la littérature. Les méthodes que nous avons choisies en fonction de nos besoins et des caractéristiques de nos mesures spectroscopiques sont également détaillées.

En résumé, un algorithme pour la classification tissulaire par spectroscopie optique est nécessairement composé de trois étapes algorithmiques successives dont un état de l'art est donné dans les parties suivantes :

- Prétraitement : corrections, filtrages, normalisations, etc.,
- Extraction et sélection de caractéristiques spectrales discriminantes,
- Classification supervisée par des méthodes d'apprentissage automatique.

4.1.1 Prétraitement des spectres

Comme la plupart des grandeurs physiques mesurées, les intensités spectrales obtenues par le système spectroscopique sont affectées par des artefacts expérimentaux provoquant des déviations sur les résultats mesurés. Ces imprécisions peuvent induire des erreurs d'analyse et des cas misclassifiés, car la variation d'intensité spectrale observée n'est alors plus uniquement due aux variations des propriétés optiques du tissu, mais partiellement aux facteurs expérimentaux entrant dans la mesure. Parfois, l'influence de ces facteurs est aussi importante que celle induite par le changement des propriétés optiques, ce qui masque les informations utiles pour la classification basée sur la recherche de différences entre les spectres intrinsèques des tissus. Restorer les spectres intrinsèques à partir des mesures expérimentales "globales" est une étape cruciale pour la classification.

En outre, une perspective de notre étude est de transférer la technique développée (spectroscopie bimodale) en clinique. Or, un des facteurs importants pour l'exploitation de cette technique en clinique est de procurer des mesures comparables sous différentes conditions cliniques [Marin *et al.*, 2006]. Sachant que le système en question sera utilisé sous différents protocoles et environnements cliniques, ces derniers entraînent des artefacts de mesure qui influencent le développement de l'algorithme de classification et les résultats obtenue dans la future application. Donc, des procédures, y compris le calibrage instrumental (voir la section 2.4) et des algorithmes de prétraitement des spectres bruts, sont effectuées avant de développer un algorithme robuste et donner des résultats fiables en classification.

Bien que différents algorithmes de prétraitement soient largement appliqués par de nombreuses équipes dans leurs études en spectroscopie [De Veld *et al.*, 2005; Heintzelman *et al.*, 2000; Palmer *et al.*, 2003a], l'article de [Marin *et al.*, 2006] nous semble la seule publication décrivant en détail les méthodes de prétraitement pour assurer la validité et la comparabilité des données spectrales acquises sous différentes conditions. La figure 4.1 montre les étapes de prétraitement proposées par [Marin *et al.*, 2006] pour corriger les spectres bruts mesurés à l'aide de deux instruments spectroscopiques distincts. Certaines de ces étapes sont liées à des procédures de calibrage de l'instrument qui doivent être effectuées régulièrement tout au long des mesures expérimentales.

Par ailleurs, il faut noter qu'un certain degré de variabilité des propriétés optiques existe aux différents endroits anatomiques pour un même type de tissu biologique. Par exemple, la peau exposée au soleil possède une plus grande concentration de mélanine, ce qui modifie la forme du spectre mesuré à cet endroit (une forme de courbe spectrale plus aplatie) par rapport à celui mesuré sur la peau non-exposée.

De plus, l'intensité de la source lumineuse peut diminuer significativement au cours du protocole d'expérimentation, ce qui se répercute sur l'intensité du signal mesuré. Pour éliminer l'influence de ces variations artéfactuelles, on effectue généralement une normalisation. Par exemple, la normalisation des spectres par rapport à la puissance mesurée à la sortie de la fibre d'excitation peut éliminer l'effet des variations d'intensité de la source d'excitation sur les spectres mesurés [Marin *et al.*, 2006; Heintzelman *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2005]. [Marchesini *et al.*, 1991] a normalisé les spectres de RD mesurés sur des mélanomes par ceux mesurés sur tissus sains adjacents de sorte à éliminer la variation spectrale due à la différence de concentration de

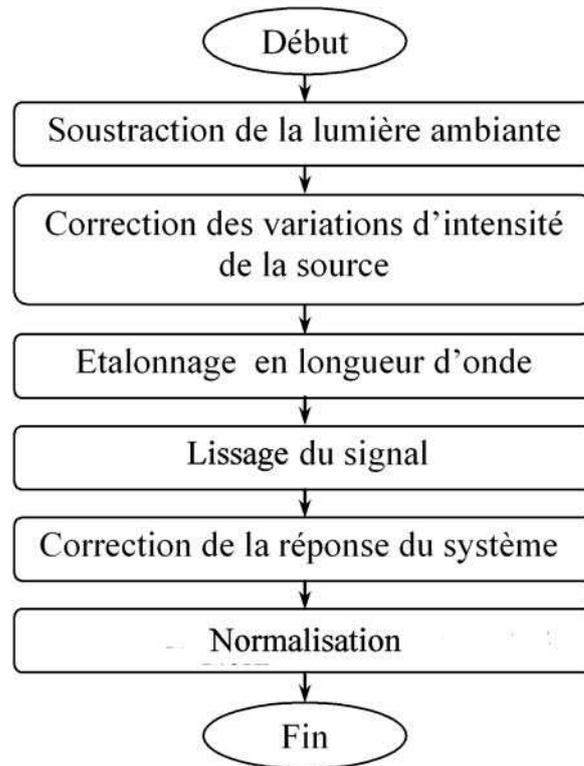


FIGURE 4.1 – Organigramme des fonctions de prétraitement implémentées pour nos spectres d'intensité d'autofluorescence

mélanine des divers sites anatomiques. Dans une étude de diagnostic du cancer oral menée par [Majumder *et al.*, 2005], les auteurs normalisent les spectres d'intensité en autofluorescence par rapport aux écart-types (de variation) de chaque groupe, après une soustraction du spectre moyen obtenu pour le tissu sain correspondant. Ceci permet d'accentuer la différence spectrale entre les tissus sains et cancéreux. [Bernard Panneton and Longchamps, 2008] ont mentionné la nécessité de normalisation pour conférer aux spectres mesurés des formes comparables. L'auteur a montré qu'il était préférable de normaliser les spectres en fonction d'une plage contenant peu de données utiles pour le problème considéré et présentant un rapport signal sur bruit suffisamment grand.

4.1.2 Classification

En statistique, la classification est une procédure algorithmique visant à assigner des objets à des classes (ou catégories) en fonction des valeurs d'attributs (ou caractéristiques) mesurées. Chaque caractéristique possède un domaine de variation défini par rapport à sa classe [Mitchell *et al.*, 1986]. En général, une caractéristique peut être soit nominale (c'est à dire un ensemble de valeurs discrètes non-ordonnées pour signifier des propriétés du sujet, comme un genre, un type, etc.), soit continue, un ensemble de valeurs réelles correspondants, par exemple, à des mesures physiques (dans notre cas des mesures de spectres d'intensité d'AF et de RD)[Diaz, 2009].

La théorie de classification statistique est basée sur le fait que les objets d'une même classe partagent des caractéristiques communes ayant des valeurs identiques (si de type nominale) ou proches (si de type continue) [Jurgen, 2004]. On distingue, parmi les méthodes de classification,

celles supervisées et celles non-supervisées [Budnyk, 2009].

Pour la classification non-supervisée (clustering), les sujets à classifier sont regroupés sans aucune connaissance *a priori* par rapport à leur appartenance à des classes prédéfinies [Michalski *et al.*, 1987]. Les méthodes non-supervisées sont la plupart du temps liées à l'exploration de données (data mining), qui essaie d'analyser la nature de la distribution et/ou des paramètres statistiques des données caractéristiques. Elles visent ensuite à regrouper les sujets ayant des valeurs statistiquement proches [Aggarwal and Yu, 1999; Brito *et al.*, 2007]. La classification non-supervisée nécessite donc l'exploration d'une grande quantité de données, afin d'en extraire des informations statistiques suffisamment significatives concernant la classe. Dans le cas de données expérimentales dont les coûts et durées d'obtention sont importantes (comme dans notre cas pour l'acquisition de spectres multimodalités *in vivo*), la classification non-supervisée n'est pas adaptée, car les tailles d'échantillons (ensemble de sujets tirés d'une population) sont trop réduites.

Au contraire de la classification non-supervisée, la méthode supervisée consiste à attribuer des classes aux sujets sur la base d'une connaissance catégorielle *a priori*. Le modèle obtient ainsi la connaissance catégorielle via l'apprentissage sur un échantillon dont les sujets sont *a priori* classifiés par une autre mesure dite de "référence" (dans notre cas une analyse anatomique et histologique *ex vivo* des coupes des tissus mesurés *in vivo*) afin de donner des exemples à l'apprentissage. L'apprentissage dit "supervisé" consiste à appliquer des méthodes analytiques ou statistiques aux variables caractéristiques de l'échantillon (données d'apprentissage), afin d'établir une règle de classification pour les sujets à venir. Nécessitant moins de données pour obtenir le modèle, cette approche plus adéquate est largement privilégiée dans les études spectroscopiques *in vivo* précliniques et cliniques. Cependant, le modèle obtenu à partir des données d'entraînement doit être validé sur un autre jeu de données, avant d'être appliqué à toute population.

En effet, la performance d'un modèle est affectée par plusieurs facteurs [Richard *et al.*, 2008] : 1) les données d'apprentissage (taille du jeu de données) 2) la méthode de sélection de caractéristiques discriminantes 3) l'algorithme choisi pour construire le modèle et 4) la méthode de validation pour correctement estimer la performance. Dans la partie suivante, ces quatre éléments clés sont regardés séparément avant d'établir le modèle de classification pour notre étude.

4.1.2.1 Jeux de données d'apprentissage

Le premier problème concernant le jeu de données pour l'apprentissage est sa dimensionalité. Pour la plupart de problèmes en classification tissulaire en spectroscopie, le jeu de données à l'issue des mesures spectroscopiques est généralement volumineux au sens où pour 1 individu, on recueille n (plusieurs centaines, voire plusieurs milliers) valeurs d'intensité spectrale indépendantes entre elles. D'un point de vue statistique, ce grand nombre de co-variables devant un petit nombre d'observations rend l'analyse discriminante difficile. Dans notre problème de classification supervisée, la variable dépendante (v.d.) est un vecteur Y de valeurs de catégories obtenue par expertise et/ou classification histologique, généralement utilisé comme référence ("gold standard") pour vérifier les résultats de classification. L'objectif (en classification supervisée) est donc de trouver une autre variable (parmi toutes celles obtenues par mesure physique) pour prédire la valeur Y_i pour un individu i parmi l'ensemble de n sujets étudiés. Les valeurs d'intensité (obtenues par mesure spectroscopique sur l'ensemble des sujets étudiés) constituent une énorme

matrice $X_{n,p}$ de p caractéristiques ou variables indépendantes (*v.i.*). On l'appelle variable indépendante parce qu'elle ne dépend pas de la classe de l'individu observé. Par exemple, pour la mesure de spectre d'autofluorescence, l'intensité spectrale acquise à une longueur d'onde (si elle est en dehors de la bande d'émission ou dans une bande où il y a peu de différence entre les sujets observés) ne dépend pas forcément de la classe des individus sur lesquels elle a été mesurée.

Pour contourner ce fléau de la dimensionalité (“curse of dimensionality” [Bellman, 1961]), nous devons réduire la dimension de la matrice $X_{n,p}$ par une extraction de quelques caractéristiques discriminantes. La méthode la plus simple consiste à calculer des paramètres, tels que des pentes, des ratios d'intensités ou des surfaces intégrale sous courbe, qui représentent leur formes de courbe. Par rapport à un grand nombre d'intensités spectrales, un jeu de paramètres “compacts” est plus pratique, comme signature de forme, pour reconnaître la catégorie d'appartenance d'un sujet mesuré. D'autres méthodes sont aussi couramment utilisées pour réduire la dimension des jeux de données spectroscopiques, telles que l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et la Transformé en Ondelette (TOD). L'objectif de ces méthodes est de trouver une transformation afin de représenter le mieux possible les données d'origine en variables indépendantes par un nombre réduit de caractéristiques, ce qui simplifie la structure du modèle et de faciliter l'observation de la distribution de classes.

Cependant, en fonction des points d'intensité inclus dans le calcul, certaines de ces caractéristiques restent indépendantes (ou partiellement-indépendantes) par rapport à la classe observée. D'où la nécessité de la sélection des caractéristiques que nous détaillerons plus loin.

4.1.2.2 Extraction de caractéristiques

Analyse en Composantes Principales (ACP) L'ACP est une méthode d'analyse factorielle largement utilisée dans le domaine de la réduction de la taille des jeux de données dans les études spectroscopiques pour le photodiagnostic [Heintzelman *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2005; Diaz, 2009]. Elle consiste à représenter les variables originales à l'aide d'un nombre plus réduit de variables décorréelées, dites Composantes Principales (CP).

Géométriquement, la première composante principale CP_1 est obtenue par la recherche d'un axe u_1 dont la direction maximise la dispersion des projections d'un nuage de n points P_i ($i \in [1, 2, 3, \dots, n]$) sur cet axe (Fig. 4.2). Chaque point P_i est un vecteur de données des p caractéristiques mesurées sur l'échantillon ($P_i = (x_{i1}, x_{i2}, x_{i3} \dots x_{ip})$). Afin de fixer cette droite, on impose qu'elle passe par le centre de la gravité g du nuage et conserve au mieux la distance entre les points projetés, afin de minimiser la distorsion de représentation par rapport au nuage initial. Pour la deuxième composante CP_2 , on cherche un autre axe u_2 orthogonal au premier u_1 au point g , qui maximise à son tour la dispersion des points projetés sur son axe. Pour la troisième CP_3 , elle doit être perpendiculaire aux deux axes précédentes (u_1 et u_2) telles que la variance des coordonnées sur l'axe soit maximale, et ainsi de suite. L'orthogonalité des axes assure que les composantes trouvées sont décorréelées entre elles.

Statistiquement, le principe de l'ACP est de trouver un axe u , issu d'une combinaison linéaire de tous les vecteurs colonne $X_{n,j}$ ($j \in [1, p]$), tel que la variance du nuage autour de cet axe soit maximale. Pour ce faire, les valeurs $x_{i,j}$ dans la matrice $X_{n,p}$ doivent être tout d'abord centrées et réduites (soustraction de la moyenne et division par l'écart-type pour chaque colonne $X_{n,j}$).

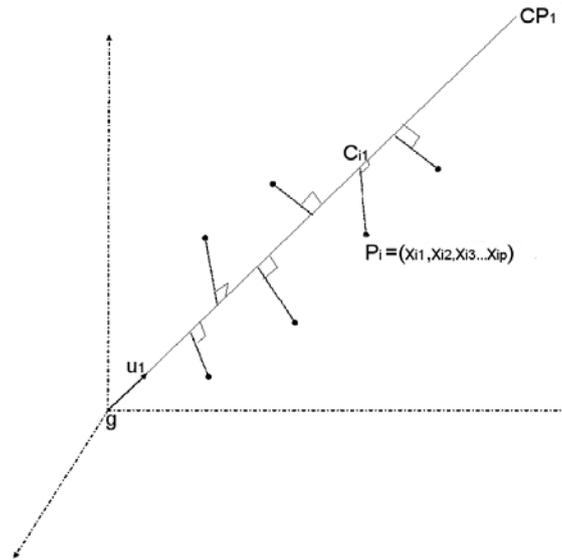


FIGURE 4.2 – Schéma illustrant la projection des données caractéristiques sur l'axe d'une composante principale CP_1 . P_i , un point de données dans l'espace de p dimensions dont chacune correspond à un vecteur de caractéristique $X_{n,j}$ ($j \in [1, p]$). C_{i1} , la coordonnée du P_i projeté sur l'axe déterminé par la première composante principale CP_1

La variance des données initiales peut donc s'exprimer par l'équation 4.1.

$$\sigma^2 = \frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (X_{i,p} - g)^T (X_{i,p} - g) \quad (4.1)$$

Ici, g (le centre de la gravité dans la figure 4.2) représente le vecteur des moyennes de chaque colonne de caractéristiques $X_{n,j}$. Ensuite, on définit un opérateur de projection orthogonale π , sur une droite de vecteur directeur unitaire u qui s'écrit par équation 4.2 :

$$\pi = uu^T \quad (4.2)$$

avec

$$u^T u = 1 \quad (4.3)$$

La variance des points projetés s'écrit donc :

$$\begin{aligned}
 \sigma_{\pi}^2 &= \frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n \pi((X_{i,p} - g)^T) \pi((X_{i,p} - g)) \\
 &= \frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n uu^T((X_{i,p} - g)^T) uu^T((X_{i,p} - g)) \\
 &= \frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (X_{i,p} - g)^T (uu^T uu^T) (X_{i,p} - g) \\
 &= \frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (X_{i,p} - g)^T uu^T (X_{i,p} - g) \\
 &= \frac{1}{(n-1)} u^T \left[\sum_{i=1}^n (X_{i,p} - g)^T (X_{i,p} - g) \right] u \\
 &= u^T \xi u
 \end{aligned}$$

où ξ est la matrice de covariance-variance de vecteur $X_{i,p}^c$ (vecteur centré de la colonne $X_{i,p}$). Maximiser cette variance des projections revient à résoudre un problème d'optimisation sous contrainte telle que :

$$\max_{\nu} (u^T \xi u) \quad \text{avec} \quad u^T u = 1 \quad (4.4)$$

$$(4.5)$$

On peut résoudre ce problème d'optimisation sous contrainte à l'aide de la méthode des multiplicateurs de Lagrange en formant la fonction de Lagrange suivante :

$$\mathcal{L} = u^T \xi u + \lambda(1 - u^T u) \quad (4.6)$$

avec λ vecteur de Lagrange.

En dérivant la fonction par rapport à ν et en imposant la condition nécessaire d'optimalité $\partial_{\nu} \mathcal{L} = 0$, on obtient l'équation aux valeurs propres :

$$\xi u = \lambda u \quad (4.7)$$

Le développement de l'équation 4.7 nous amène à :

$$u^T \xi u = \lambda = \sigma_{\pi}^2 \quad (4.8)$$

Donc la solution pour trouver la direction de la première composante principale consiste à projeter les données sur le vecteur propre ayant la plus grande valeur propre λ de la matrice de covariance $\xi = X_{i,p}^{cT} X_{i,p}^c$.

Pour trouver les autres directions, on suit les mêmes formules statistiques décrites précédemment en imposant, en plus, des contraintes $u_i^T u_{i-1} = u_i^T u_{i-2} = \dots = u_i^T u_1 = 0$. Celles-ci permettent d'assurer l'orthogonalité de la direction avec les directions précédentes, donc la décorrélation entre chaque paire de composantes. Les valeurs propres trouvées pour chaque composante mesurent la part de variance expliquée par l'axe correspondant. En revanche, chaque composante principale CP_i peut être représentée par une combinaison linéaire des variables d'origine X_1, \dots, X_p (Equ. 4.9), ce qui permet de retrouver une approximation des données initiales (dans l'application de débruitage ou de compression de données).

$$CP_i = a_{1i}X_{n1} + a_{2i}X_{n2} + a_{3i}X_{n3} \dots + a_{ni}X_{np} = \sum_{j=1}^p a_{ji}X_{nj} \quad (4.9)$$

Dans un processus de classification, les coefficients a_{ji} sont utilisés comme des valeurs caractéristiques pour développer le modèle.

Les composantes principales permettent tout d'abord de réduire la dimension du jeu de données pour la classification, sans perdre d'information par rapport à la distribution de données initiales. En effet, en supposant l'existence des corrélations linéaires entre les variables spectrales, le rang de la matrice de covariance $X_{i,p}^{cT} X_{i,p}^c$ (ou le nombre des valeurs propres de $X_{i,p}^{cT} X_{i,p}^c$) est inférieur à celui de la matrice d'origine $X_{n,p}$. Or, dans la réalité, les données mesurées sont la plupart du temps bruitées et les corrélations entre les variables d'origine ne sont pas rigoureusement linéaires, ce qui fait que les matrices $X_{i,p}^{cT} X_{i,p}^c$ et $X_{n,p}$ présente un même nombre de valeurs propres. Afin de réduire la dimensionnalité, on s'intéresse plutôt aux premières composantes qui expliquent le plus la variance des points d'observations.

Par ailleurs, l'utilisation des composantes principales permet de simplifier l'étape suivante de sélection des caractéristiques, car les variables ainsi extraites sont déjà décorréliées, ce qui évite les problèmes de classification provoqués par la redondance des caractéristiques que nous expliquerons plus loin dans la section 4.1.2.3 dans ce chapitre.

Dans l'étude en spectroscopie de fluorescence induite menée par [Heintzelman *et al.*, 2000], la méthode ACP a été appliquée sur un vecteur concaténé des spectres d'émission de fluorescence obtenus sur les tissus (oraux sains, précancéreux et cancéreux) en multi-excitation. Ils sélectionnent les premières composantes principales qui contiennent respectivement 95, 85, 75 et 65% de la variation des spectres pour la classification. [Chang *et al.*, 2005] ont appliqué une méthode similaire aux vecteurs des spectres d'émission de fluorescence en multi-excitation et en réflectance diffuse, afin de discriminer des tissus normaux et précancéreux dans le col de l'utérus.

Dans une étude réalisée précédemment au sein de notre laboratoire, [Diaz, 2009] a appliqué la méthode d'ACP sur un jeu de caractéristiques spectrales extraites des spectres d'autofluorescence et de RD des tissus cutanés. Le jeu de données a été réduit aux 3 premières composantes principales qui correspondaient à 99% de la variance des données initiales pour la classification.

Néanmoins, il faut noter que les composantes principales sont plus difficile à être interprétées, en termes d'information spectrale que d'autres types de caractéristiques qui seront présentés plus loin, parce que chaque composante est une combinaison (linéaire) des intensités spectrales mesurées sur plusieurs longueurs d'onde. Ce mélange est ainsi difficilement exploitable pour relier les phénomènes photo-biologiques aux différents états tissulaires.

Transformée en Ondelette Discrète La Transformée en Ondelette (Wavelet Transform) est une méthode de traitement du signal utilisée généralement pour la compression de données ou le débruitage. Par analogie à la Transformée de Fourier à fenêtre glissante, elle consiste à décomposer un signal d'énergie finie en une série de fonctions oscillantes (ondelettes) d'énergie finie à support court et de moyenne nulle. Dans le cas de signaux temporels(t), elles peuvent être dérivées d'une fonction mère $\psi(t)$ telle que :

$$\psi_{s,\tau}(t) = \frac{1}{s}\psi\left(\frac{t-\tau}{s}\right) \quad (4.10)$$

où $\psi_{s,\tau}(t)$ correspond à une fonction d'ondelette de la famille, τ est le facteur de translation et s le facteur de dilatation. En traitement de signaux temporels, ces paramètres peuvent être choisis de manière à adapter le signal à une analyse multi-échelle. Par exemple, une petite valeur de s permet d'analyser les variations en haute fréquence (détails) dans les signaux, alors qu'une grande valeur permet une analyse des variations globales (l'approximation du signal).

L'équation (4.10) est souvent développée en Ondelette Discrète (Discret Wavelet Transform) (Equ.4.11) adapté au traitement numérique des signaux.

$$\psi_{m,n}[t] = s_0^{\frac{m}{2}}\psi(s_0^{-m}t - n\tau_0) \quad (4.11)$$

où s_0 et τ_0 sont des constantes, m correspond à l'échelle des ondelettes et n à sa translation.

Analyser un signal numérique en ondelettes consiste à calculer l'ensemble de ses produits scalaires avec une "famille" d'ondelettes.

$$\varrho[t] = \sum_{m \in \mathbb{Z}} \sum_{n \in \mathbb{Z}} \langle x, \psi_{m,n} \rangle \cdot \psi_{m,n}[t] \quad (4.12)$$

Les valeurs obtenues par l'équation (4.12) sont appelées coefficients d'ondelettes, qui vont ensuite servir de caractéristiques pour la classification. Quand on décompose un signal en ondelettes, la fonction à une échelle donnée (à une valeur m donnée) est translatée le long du signal avec le facteur de décalage n qui localise l'information extraite. Ce mécanisme très utile pour le traitement des signaux temporels est aussi intéressant pour les signaux spectroscopiques, car les coefficients d'ondelettes peuvent aussi fournir des informations "spectrales" localisées nous permettant de connaître les lieux possédant des différences significatives entre les spectres tissulaires et d'en déduire alors des liens aux fluorophores ou chromophores impliqués dans la bande

spectrale en question. En revanche, l'inconvénient de cette méthode est que le nombre de caractéristiques extraites est fortement dépendant de la longueur du signal et de la résolution voulue, ce qui donne habituellement un jeu de données énorme à traiter ensuite.

[Gupta *et al.*, 2007] a utilisé la transformée en ondelette discrète comme méthode d'extraction de caractéristiques pour classifier des spectres d'autofluorescence mesurés sur des lésions malignes et bénignes dans la bouche humaine. Les spectres ont été analysés en 4 échelles avec différentes fonctions d'ondelettes (Harr et Daubechies). Les auteurs ont trouvé que les ondelettes de Daubechies (8) donnent en général de meilleurs résultats de classification ($Se = 95,5\%$ et $Sp = 99,3\%$) pour leurs données. Cependant, ils n'ont pas donné d'explication quant aux longueurs d'onde des caractéristiques trouvées, d'intérêt potentiel pour étudier les mécanismes carcinogénèses liées à ces variations spectrales.

Caractéristiques Spectrales Dans le domaine de la classification de données spectroscopiques, de nombreuses équipes de recherche ont travaillé sur des caractéristiques spectrales directement extraites des spectres mesurés, sans passer par un espace transformé. L'intérêt de cette approche réside dans les connaissances *a priori* de variations spectrales associées à divers phénomènes ou états histopathologiques des tissus. Comme expliqué en chapitre 1, il est rapporté dans la littérature que le processus carcinogénique a tendance à dégrader le réseau de collagène avec une augmentation du métabolisme local. La destruction du réseau structural provoque une diminution de l'intensité fluorescence liée à ces protéines structurales (collagène et élastine). De plus, les fluorophores impliqués dans le mécanisme métabolique (Flavine, NADH) deviennent plus actifs pendant le développement cancéreux, en émettant plus de fluorescence. Enfin, la vascularisation accrue pendant la carcinogénèse augmente éventuellement la concentration d'hémoglobine sur les sites cancéreux, ce qui modifie les spectres (d'autofluorescence et de diffusion élastique) mesurés. Avec ces informations *a priori*, il est possible de définir des paramètres à calculer, correspondant à des longueurs d'onde sur lesquelles l'observation de ces variations spectrales est accentuée.

Cependant, comme mentionné dans le chapitre 1, les spectres d'intensité d'autofluorescence et de diffusion élastique mesurés sur les tissus biologiques sont des réponses globales d'un milieu complexe. Ainsi, les paramètres calculés pour les pics d'émission ou d'absorption de chaque composante biochimique ne donne pas forcément un meilleur résultat en terme de discrimination spectrale. **Donc, en pratique, le choix des caractéristiques spectrales *a priori* est souvent basé sur une comparaison visuelle et empirique entre les classes de spectres.**

[Karthikeyan *et al.*, 1999], dans une étude pour distinguer les états sains et cancéreux dans le plasma du sang, ont remarqué des différences d'intensité spectrale correspondant aux émissions de fluorescence des flavines et des porphyrines. Ils ont donc réalisé l'extraction d'une caractéristique liée à ces observations, en l'occurrence le rapport entre les pics d'intensité (I) spécifiques aux longueurs d'onde de pic d'émission des flavines et porphyrines : I_{530}/I_{630} .

[Brancaleon *et al.*, 2001], dans leurs travaux pour distinguer les états sains et cancéreux de la peau, ont exploité des différences d'intensité et de forme de courbe pour les émissions de fluorescence du tryptophane et du collagène : aires sous la courbe dans les bandes spectrales 310 – 450nm (liée au tryptophane) et 380 – 600nm (liée au collagène), rapport des pics d'intensité spécifiques aux pics d'émission respectifs : I_{350}/I_{295} .

Dans des travaux consacrés à la spectroscopie de RD pour discriminer des états sains et cancéreux de tissus du col d'utérus, [Marin *et al.*, 2005] réalisent l'extraction de plusieurs caractéristiques plus ou moins arbitraires : l'intensité et la longueur d'onde des premières et dernières valeurs du spectre acquis, l'intensité et la longueur d'onde liées à l'absorption de l'hémoglobine (400, 450, 525 et 575nm), l'intensité et la longueur d'onde du pic situé entre 490 et 525nm, l'intensité et la longueur d'onde du pic situé entre 575 et 630nm. Suite à l'extraction de ces caractéristiques, ils ont effectué une réduction de leur nombre en utilisant l'ACP. [Wallace *et al.*, 2000a] en utilisant la mesure de spectres de RD dans le diagnostic du mélanome, réalisent aussi l'extraction de plusieurs caractéristiques visant à qualifier la forme des spectres recueillis. Ils ont notamment extrait des pentes et des aires sous courbe calculées dans différentes bandes spectrales, la moyenne d'une bande spectrale et la variabilité du spectre complet. Dans une étude sur le mélanome précoce, [Murphy *et al.*, 2005] ont extrait un ensemble de 29 caractéristiques similaires.

Au sein de notre équipe de recherche, cette méthode a été mise en oeuvre dans le cadre d'une étude pré-clinique [Pery *et al.*, 2011] pour discriminer les états inflammatoires, cancéreux et sains de vessie de rats à l'aide de caractéristiques spectrales extraites de spectres d'intensités d'AF et de RD (spectroscopie bimodale avec simple excitation AF). Les caractéristiques sélectionnées et employées étaient notamment :

- En RD : Aires sous courbe $A_{440-800}$ et $A_{440-560}$; intensités des pics à 480 et à 738nm ; Rapports d'intensités $R_{738/480}$ et $R_{556/480}$.
- En autofluorescence : Aires sous courbe $A_{440-740}$; intensités des pics à 520 et à 615nm ; Rapports $R_{615/520}$ et $R_{615/565}$; valeurs de pentes $P_{440/470}$; et valeur du paramètre k et $A_{500-700}$ (modèle de calcul de fluorescence intrinsèque extraite).

Malgré la simplicité de ces approches et leur efficacité relative pour distinguer des états tissulaires nettement distincts, leur principal inconvénient réside dans le fait qu'au lieu de traiter l'ensemble des variations d'un spectre, seules quelques longueurs d'onde sont utilisées pour extraire des caractéristiques spectrales connues. Cette limitation pose un problème car la discrimination d'états tissulaires proches (sains, inflammatoires/précancéreux) nécessite l'exploration des spectres dans leur totalité à la recherche de caractéristiques moins "évidentes". La comparaison visuelle des spectres reste subjective car très dépendante de l'expérience de l'utilisateur [Gupta *et al.*, 2007]. Lorsque les différences spectrales sont minimales, comme entre tissus hypertrophiques et non-hypertrophiques dans notre étude, l'extraction de caractéristiques *a priori* potentiellement discriminates devient encore plus difficile [Gupta *et al.*, 2007].

En outre, les effets de plusieurs facteurs biologiques peuvent se superposer sur une bande spectrale assez large ou interagir entre eux, ce qui fait que les paramètres calculés à plusieurs longueurs d'onde sur cette bande ont beaucoup de risque d'être inter-corrélés. [Crowell *et al.*, 2005] ont étudié les corrélations entre les longueurs d'onde ("wavelength-wavelength correlation") dans des spectres d'autofluorescence mesurés sur les tissus du côlon. Ils ont trouvé des corrélations négatives entre les bandes 350 – 410nm et 440 – 525nm, entre 350 – 410nm et 410 – 440nm, entre 410 – 440nm et 440 – 525nm. Les auteurs ont attribué ces corrélations à l'excitation d'autofluorescence en cascade (c'est-à-dire, l'excitation d'une fluorophore par l'émission d'autres

fluorophores) et à la diminution de l'intensité d'autofluorescence par l'absorption de l'hémoglobine. Les caractéristiques inter-corrélées provoquent un problème de redondance d'information que nous allons traiter dans la section suivante.

4.1.2.3 Sélection de caractéristiques discriminantes

Pour des problèmes réels de classification, la distribution des données est généralement invisible à l'utilisateur (traiteur de données). Un grand nombre de caractéristiques est donc introduit pour représenter le modèle [Dash and Liu, 1997]. Or, ces caractéristiques initialement extraites des données mesurées sont soit informativement redondantes, soit sans rapport avec la classe, ce qui rend difficile la découverte d'une solution optimale pour la classification. La présence de caractéristiques non-pertinentes n'apporte pas une augmentation du taux de réussite [Hamamoto *et al.*, 1996; Lorenzo-Navarro, 2001], mais au contraire introduit des parasites qui influencent la stabilité de performance. [Domingos, 1999] a mentionnée qu'un modèle simple qui possède le plus petit nombre de caractéristiques est plus favorable pour la classification, et fournit des résultats généralisables. Le cas échéant, un modèle avec une dimensionnalité plus réduite est plus facile à interpréter et à comprendre. Donc, une étape de sélection, en vue d'éliminer les caractéristiques non-pertinentes et de réduire la dimensionnalité du jeu de données, est indispensable.

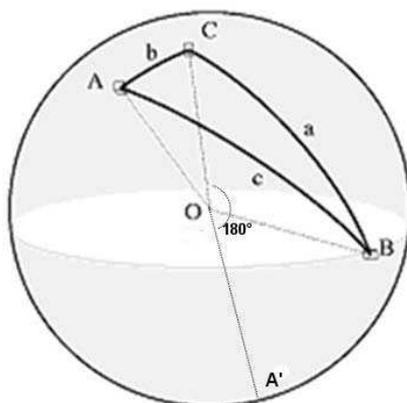


FIGURE 4.3 – Interprétation géométrique des corrélations des variables (image modifiée celui de [Rummel, 1976])

Une caractéristique dite pertinente ne doit pas être redondante, mais efficace pour la classification. La redondance des caractéristiques est généralement présentée par des inter-corrélations existant entre les caractéristiques, ce qui complique la structure du modèle. L'interprétation géométrique de corrélations des 3 variables (Fig. 4.3) illustre ce problème de redondance. Les séries d'observations pour trois variables A , B , C , une fois réduites et centrées, sont des vecteurs centrés OA , OB et OC de longueur unitaire. Les coefficients de corrélations " r " entre ces trois vecteurs peuvent être exprimés par les cosinus entre chaque paire de vecteurs : $r_{BC} = \cos(a)$, $r_{AC} = \cos(b)$ et $r_{AB} = \cos(c)$. Si l'on veut au mieux séparer les vecteurs, les angles entre chaque paire de vecteurs doivent être de 90° , conduisant ainsi à des valeurs de corrélation nulles. A noter que des vecteurs à 180° (OC et OA' par exemple) peuvent aussi s'écarter d'un à l'autre, mais ces vecteurs sont normalement considérés comme un seul avant d'être centré et réduite. Parce que toutes les observations sur ces deux vecteurs sont alignées sur une même direction. L'ajout d'une

caractéristique corrélée ou d'un vecteur qui ne soit pas orthogonal aux 3 vecteurs déjà existant n'apporte aucune nouvelle information par rapport à la classe, mais complique la structure du modèle en augmentant la dimensionalité.

Par ailleurs, une caractéristique "efficace" doit être capable de prédire la classe d'un objet sans erreur selon sa valeur observée [Koller and Sahami, 1996]. Normalement, elle doit posséder des distributions de valeurs différentes pour des classes différentes. De ce fait, des tests statistiques (T-test ou rank-sum test, par exemple) peuvent être utilisés pour sélectionner ce genre de caractéristiques en fonction de leurs distributions statistiques (moyenne, médiane et écart-type).

Malgré leur utilité, ces tests statistiques ne donnent parfois pas de caractéristiques optimales pour la classification, car la distribution de données est la plupart du temps inconnue à priori, surtout lorsque la taille de l'échantillon est petite. Donc, des méthodes de sélection plus sophistiquées sont nécessaires.

Dans le cadre de la classification supervisée, la sélection de caractéristiques consiste à sélectionner un sous-ensemble de caractéristiques, qui permet de mieux séparer les objets observés dans l'échantillon. Depuis une dizaine d'années, les algorithmes de sélection font l'objet d'une littérature abondante [Kohavi and John, 1997; Blum *et al.*, 1997; Guyon and Elisseeff, 2003]. En général, ils peuvent être divisés en deux groupes principaux : les "filters" et les "wrappers".

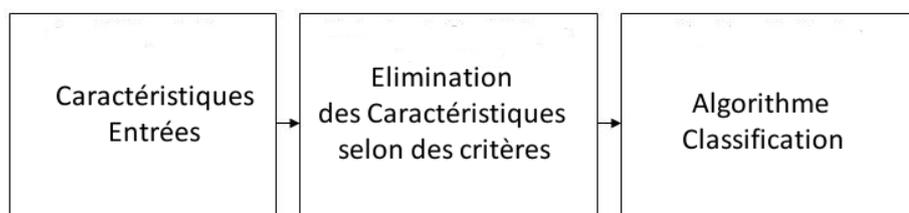


FIGURE 4.4 – Schéma-bloc simple de la méthode "filter" qui sélectionne les caractéristiques indépendamment des méthodes de classification utilisées.

Le principe des algorithmes de type "filter" (cf. Fig. 4.4) est de calculer un vecteur des poids W_p dont les éléments de ce vecteur w_d ($d \in [1, p]$) peuvent être des valeurs de distance (Euclidienne ou Mahalanobis), d'entropie ou de corrélation. Les valeurs de ces indices permettent d'évaluer la capacité d'une caractéristique à séparer les individus en classes différentes ou à enrichir l'information dans le jeu de données. Ainsi, les méthodes "filter" exploitent ces "propriétés intrinsèques" des caractéristiques utilisées afin de trouver un jeu optimal en classification, sans référence à une application donnée (c'est-à-dire, non liées à une méthode de classification). Par exemple, l'algorithme "ReliefF" est décrit comme suit [Robnik-Sikonja and Kononenko, 2003] :

Dans l'algorithme 1, m est le nombre d'itérations de l'algorithme, qui est défini arbitrairement par l'utilisateur. $p_{(C)}$ et $p_{classe(S_i)}$ sont les probabilités *a priori* de chaque classe. Le poids de chaque caractéristique est donc calculé à partir de $P_{(C)}$ et de *diff* ("distance" entre l'exemple

Algorithme 1 Algorithme Relieff

Initialisation $W_p = 0$
pour $i = 1$ à m **faire**
 Sélectionner arbitrairement d'un exemple S_i parmi l'ensemble de n individus
 Trouver k ($k < n$) plus proches voisins de l'exemple H_j ($j \in [1, k]$, $classe(H_j) = classe(S_i)$)
 pour $C \neq classe(S_i)$ **faire**
 Trouver k plus proches voisins de S_i (M_j , $j \in [1, k]$)
 fin pour
 pour $d = 1$ à p **faire**
 function $CALCUL(\omega_d)$
 $w_d = w_d - \sum_{j=1}^k \frac{diff(S_i, d, H_j)}{mk} + \sum_{C \neq classe(S_i)} \frac{p(C)}{1 - p_{classe(S_i)}} \sum_{j=1}^k \frac{diff(S_i, d, M_j)}{mk}$
 return ω_d
 fin function
 fin pour
fin pour

S_i et ses voisins) définie par :

$$diff(S_i, d, S_j) = \frac{\|S_{id} - S_{jd}\|}{\max(d) - \min(d)} \quad (4.13)$$

où $\max(d)$ et $\min(d)$ désignent les valeur maximale et minimale que la caractéristique d peut prendre sur l'ensemble de données. S_{id} est la valeur prise par le d^{ime} caractéristique pour l'individu tiré. Le poids d'une caractéristique est d'autant plus grand que les données issues d'une même classe ont des valeurs proches et que les données des classes différentes sont séparées. On fixe donc un seuil w_{seuil} pour sélectionner toutes les caractéristiques possédant une valeurs de poids $w_d < w_{seuil}$.

Cependant, [Kohavi and John, 1997] ont mentionné qu'une caractéristique optimale ne signifie pas qu'elle soit forcément pertinente. Donc, le classifieur établi avec des caractéristiques trouvées par la méthode "filter" ne donne pas forcément le meilleur résultat de classification.

Les algorithmes de type "wrapper", au contraire, sont directement liés à la performance du classificateur utilisé (voir Fig. 4.5). Le principe consiste à chercher un sous-ensemble de caractéristiques donnant la meilleure performance de classification, à travers des combinaisons de caractéristiques générées par des règles spécifiques. La pertinence des caractéristiques est définie par l'intermédiaire de la prédiction de la performance du modèle final. **Dans notre étude, nous nous intéressons aux méthodes "wrappers" qui sont plus coûteuses en calcul, mais généralement plus efficaces pour le diagnostic en pratique.** Une fois le modèle développé sur un nombre réduit de caractéristiques sélectionnées, il suffit d'extraire ces mêmes caractéristiques pour classifier les nouveaux sujets, sans repasser par l'étape de sélection.

Les deux étapes les plus importantes dans les méthodes wrappers sont la génération et l'évaluation :

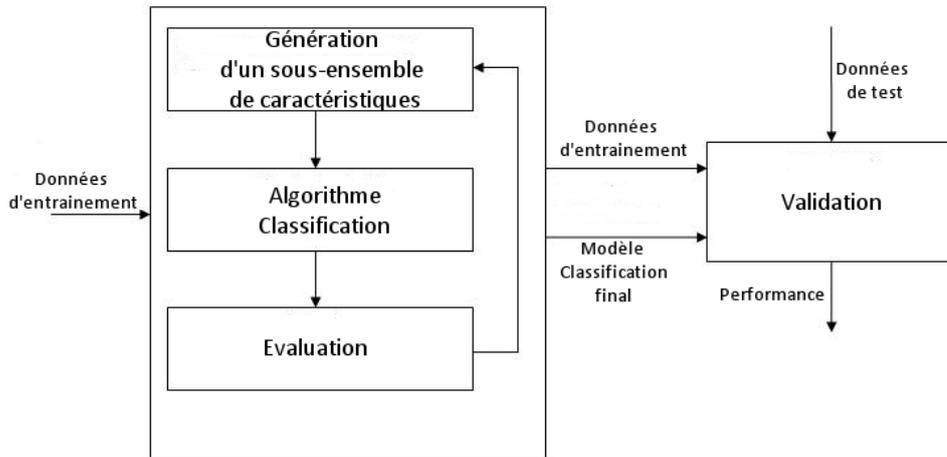


FIGURE 4.5 – Schéma-bloc de la méthode “wrapper” qui utilise le résultat obtenu par l’algorithme de classification pour évaluer l’optimalité des caractéristiques

- L’étape de génération consiste à créer des sous-ensembles de caractéristiques candidats ou d’établir un espace de recherche. Elle commence généralement par un sous-ensemble initial (ou état initial), auquel des opérateurs sont appliqués (comme ajouter ou éliminer une caractéristique) pour générer d’autres candidats. Le sous-ensemble initial peut être vide ou comprendre toutes les caractéristiques. Dans le cas d’une recherche aléatoire, les caractéristiques sont choisies arbitrairement au départ.

Pour un jeu de données contenant p caractéristiques, 2^p combinaisons binaires sont possibles. Trouver le meilleur sous-ensemble dans ces combinaisons est difficile, voire impossible si p est très grand. Pour résoudre ce problème, des fonctions heuristiques peuvent être mise en oeuvre pour guider la recherche, dont les plus utilisées sont des méthodes séquentielles ou pas-à-pas (“stepwise method”), telle que les approches de sélection “forward” et “backward”. Dans la méthode “forward”, la recherche commence par un ensemble vide, puis les caractéristiques sont ajoutées successivement dans le jeu. La performance du nouveau jeu de caractéristiques est toujours comparée avec celle du précédent pour déterminer si la caractéristique ajoutée est conservée ou non (si la performance augmente, elle reste dans le jeu, sinon elle est rejetée). L’inconvénient de cette approche est qu’elle peut supprimer des caractéristiques pertinentes pour la classe, car elles sont corrélées avec des caractéristiques existantes dans le jeu. Afin d’assurer que les caractéristiques les plus pertinentes soient sélectionnées, on range les caractéristiques dans un ordre décroissant en fonction de leurs capacités discriminantes individuelles, puis l’on commence la sélection par la caractéristique la plus discriminante. Par analogie, la méthode “backward” consiste à éliminer successivement une caractéristique à partir d’un ensemble de départ entier. Bien que la méthode “backward” soit plus apte à éliminer les caractéristiques corrélées, elle est plus lourde pour entraîner le modèle au départ, car un plus grand nombre de caractéristiques est à gérer [Kohavi and John, 1997].

Dans notre étude, les méthodes “forward” et “backward” sont combinées pour une recherche bidirectionnelle. En pratique, les deux méthodes sont effectuées en même

temps et l'une guidant la sélection de l'autre méthode. Par exemple, avant de rajouter une caractéristique dans la méthode "forward", l'algorithme vérifie si elle est déjà éliminée par la méthode "backward". Si oui, on passe à la caractéristique suivante. Cette méthode bi-directionnelle assure la convergence de recherche "forward" et "backward" vers une même solution.

- L'étape d'évaluation consiste à évaluer l'efficacité d'une caractéristique dans la classification. Afin d'obtenir un résultat de test sans biais, des méthodes de validation croisées sont utilisées. Cela consiste à retirer un ou plusieurs individus pour le test de performance, et se servir du reste pour développer le modèle en utilisant la méthode de classification. Puis le modèle développé est appliqué sur le sujet exclu pour qualifier la performance ("1" si le sujet exclu est correctement classé, "0" sinon). Le processus est répété jusqu'à ce que tous les sujets aient été utilisés pour le test de l'algorithme. L'efficacité d'une caractéristique est obtenue par le calcul du taux de sujets bien classifiés (N_{russis}/N_{total}). Au final, le jeu de caractéristiques optimal est celui qui donne le taux de réussite maximal.

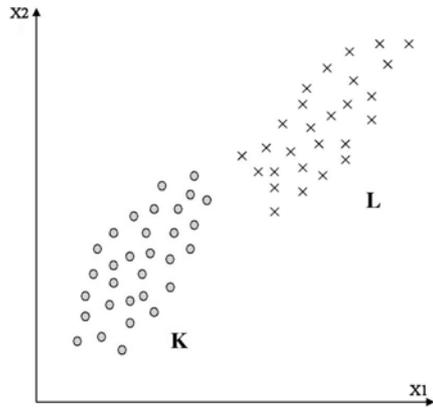
4.1.2.4 Méthodes de Classification (supervisée)

La méthode de classification, appelée aussi méthode d'affectation ou classifieur, est caractérisée par une phase d'apprentissage qui consiste à établir des règles de classification à partir des connaissances *a priori* disponibles sur un jeu d'échantillon. Les règles de classification peuvent être établies à partir d'approches différentes dont les plus étudiés dans la littérature en spectroscopie optique *in vivo* concernant la classification supervisée sont : l'Analyse Discriminante Linéaire, les k plus-proches-voisins et les réseaux de neurones artificiel. Chacune de ces méthodes donne des performances variées en fonction de la structure de données disposées à l'apprentissage, car chaque méthode classe les sujets selon des principes différentes. L'exploitation de ces trois méthodes nous permet de déterminer la plus adaptée à nos données, voire de les combiner pour une amélioration éventuelle de performance. Un état de l'art sur l'application de ces trois méthodes de classification dans le cadre d'études spectroscopiques sera présenté à la fin de cette section.

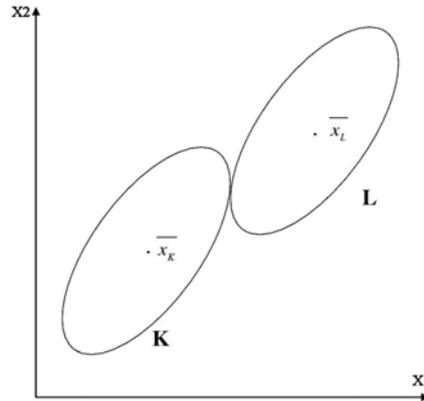
Analyse Discriminante Linéaire (ADL) L'Analyse Discriminante Linéaire est une des méthodes les plus largement utilisées dans les problèmes de classification supervisée. La méthode proposée par [Fisher, 1936] est de classer les échantillons en établissant une fonction linéaire qui sépare le mieux les classes présentes dans le jeu d'entraînement. Cette méthode est fondée sur la discrimination interclasse. Il s'agit d'une méthode linéaire et paramétrique qui implique que la distribution des échantillons au sein des classes soit gaussienne.

Géométriquement, les données des classes, par exemple deux classes K et L, peuvent être représentées par des nuages de points ("scatter plot") dans un espace à deux dimensions en fonction de valeurs des caractéristiques x_1 et x_2 (voir Figure 4.6.1). Les distributions de probabilités normales dont sont issus les échantillons sont représentées par des ellipses sur la Figure (4.6.2). Ces ellipses correspondent aux limites de confiance pour l'appartenance à une classe (par exemple la limite à 95%).

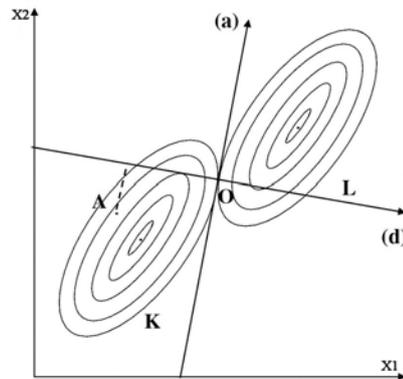
Par principe, un objet appartient à la classe pour laquelle la probabilité calculée est la plus



4.6.1:



4.6.2:



4.6.3:

FIGURE 4.6 – (4.6.1) Distribution des échantillons de deux classes K et L dans un espace 2D en fonction de deux variable x_1 et x_2 ; (4.6.2) Limites de confiance à 95% autour des centroïdes des classes K et L ; (4.6.3) Représentation des limites de confiance à divers pourcentages. O est le point d'intersection de ces iso-probabilités, la droite (a) est la tangente à ces ellipses, (d) la direction de discrimination optimale qui est perpendiculaire à la droite (a) , A une observation de la classe K qui est située à gauche de la droite (a) . [Durand, 2007]

grande. Sur la Figure (4.6.3), les ellipses successives représentent le même niveau de probabilité dans leurs classes respectives K et L . Les ellipses correspondantes aux limites de confiance à 95% se touchent au point O qui correspond, sur la figure, à la moitié de la distance entre les deux centres des classes. La droite (a) est la tangente à ces deux ellipses au point O . Les points situés à la gauche de (a) ont une plus grande probabilité d'appartenir à la classe K et réciproquement, ceux situés à droite de (a) ont une grande probabilité d'appartenir à la classe L . D'un point de vue géométrique, la droite (a) peut être considérée comme une frontière séparant les deux classes. En pratique, une définition algébrique de la frontière est préférée. Afin d'illustrer ce propos, nous définissons une droite (d) , perpendiculaire à la droite (a) et passant par le point O (cf. Fig.4.6.3). Chaque échantillon est ainsi projeté sur cette droite. La position du point A (une observation appartenant à la classe K) est donnée par ses coordonnées factorielles (scores) sur (d) et est définie par l'équation (4.14) :

$$D = \omega_0 + \omega_1 x_1 + \omega_2 x_2 \quad (4.14)$$

Lorsque les données sont centrées réduites, la valeur de ω_0 est nulle, les coefficients ω_1 et ω_2 sont calculés tels que $D = 0$ au point O et que lorsque $D > 0$ alors les échantillons appartiennent à la classe L , dans le cas contraire ils appartiennent à la classe K .

La recherche de la droite discriminante (a) revient donc à chercher les coefficients ω_1 et ω_2 , pour maximiser le rapport entre les variances des deux classes K et L . Le pouvoir discriminant des variables sera acceptable lorsque les centroïdes des deux jeux d'observations seront suffisamment distants et que les groupes d'échantillons seront denses. D'un point de vue mathématique, cela signifie que la variance inter-classes soit la plus grande possible, tandis que celle intra-classe soit la plus petite possible. Généralisée à un espace de dimension quelconque, l'équation (4.14) peut s'écrire :

$$D = \omega_0 + \omega^T x \quad (4.15)$$

Pour une discrimination de deux classes, les poids sont déterminés à partir des équations (4.16) et (4.17) suivantes :

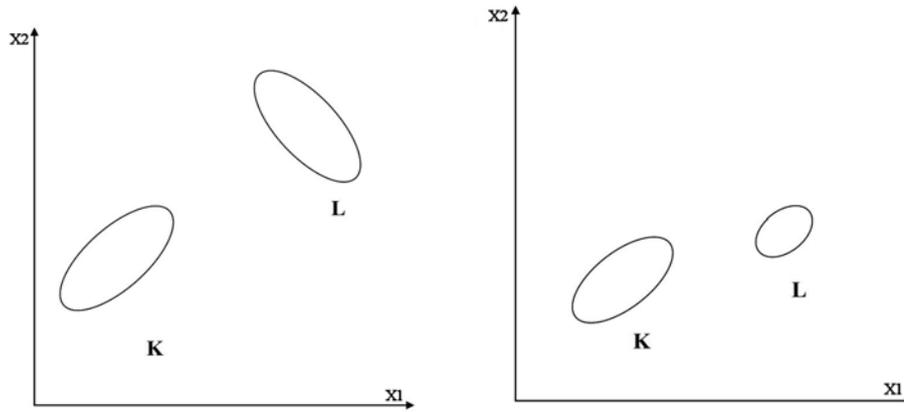
$$\omega^T = (\bar{x}_L - \bar{x}_K)^T S^{-1} \quad (4.16)$$

$$\omega_0 = -\frac{1}{2}(\bar{x}_L - \bar{x}_K)^T S^{-1}(\bar{x}_L + \bar{x}_K) \quad (4.17)$$

\bar{x}_L et \bar{x}_K représentent les vecteurs des moyennes des observations qui décrivent la localisation des centres des nuages des classes L et K dans l'espace de dimensions données. S est la matrice de variance-covariance combinée du jeu d'entraînement entre les deux classes. L'utilisation d'une matrice de variance-covariance combinée implique que les matrices de variance-covariance des deux populations soient les mêmes. Dans ces conditions, les ellipsoïdes définies à partir des distributions de données présentent un volume égal (variance) et une même direction dans l'espace (covariance) [Massart *et al.*,], comme illustré en figure(4.7).

L'Analyse Discriminante Linéaire peut être développée en une fonction quadratique, pour résoudre des problèmes de classification non-linéaires. Au lieu de séparer les données par des hyperplans, on les sépare par des surfaces possédant généralement une forme ellipsoïde. La discrimination quadratique utilise plusieurs métriques (une par classe) pour mesurer la dispersion de chaque classe et la règle de décision. On affecte un individu S à la classe C_h ($h \in [1, n_C]$, $n =$ nombre de classes au total) telle que :

$$(x - g_h)^T M_h (x - g_h) = \min_{i=1 \dots n_C} (x - g_i)^T M_i (x - g_i) \quad (4.18)$$



4.7.1:

4.7.2:

FIGURE 4.7 – Distributions de deux classes de données en fonction de leur variance et covariance (4.7.1) Deux classes de même variance (4.7.2) Deux classes de même covariance [Durand, 2007]

où x est un vecteur composé des valeurs des différentes caractéristiques d'individu S ; g_i le centre de gravité de la classe C_i ; M_i la métrique de la classe C_i .

Les méthodes d'analyse discriminante ont comme difficulté le choix de la métrique à utiliser afin d'obtenir des classes dont les points de la même classe soient les plus compacts possibles autour du centre de gravité de la classe. Ce sont des méthodes totalement compensatoires qui appliquent une agrégation globale sur les performances des attributs de l'objet. Ceci a pour conséquence une performance arbitraire, vu l'hétérogénéité des données [Nabil, 1999].

k-plus proches voisins (k-ppv) La méthode des k -plus proches voisins (k Nearest Neighbour, k-NN) est une méthode intuitive qui classe un sujet non-étiqueté par la similarité avec les exemples observés de la base d'apprentissage. C'est une approche non-paramétrique considérant l'estimation de la densité de la probabilité des échantillons comme une fonction purement locale. Supposant un individu S à classer, un volume $V(S)$ centré sur ce point d'individu est déterminé de façon à ce qu'il englobe k observations de l'ensemble d'apprentissage. Une fois ce volume déterminé, le nombre k_i de voisins de S appartenant à chaque classe permet de calculer les densités de probabilité des classe C_i contenant N_i points comme suit :

$$p(S, C_i) = \frac{k_i}{N_i \cdot V(S)} \quad (4.19)$$

La définition de la notion de plus proches voisins est liée au choix d'une distance. Ce choix influence la forme du volume $V(S)$. Cette forme est une sphère avec la distance euclidienne, un cube avec la distance de Manhattan et une ellipsoïde avec la distance de Mahanalobis. Classiquement, on utilise la distance euclidienne dans le cas des attributs continus [Duda and Hart, 1973].

Pour la prise de décision concernant une nouvelle observation, celle-ci sera affectée à la classe la plus représentée parmi ces k plus proches voisins. La règle de décision concernant la classe C_i

dans laquelle un nouveau point S sera classé, devient alors comme suit :

$$S \in C_i, \text{ si } p(C_i/S) = \max_{i=1, \dots, n_C} (k_i) \quad (4.20)$$

où n_C est le nombre de classes que l'on peut attribuer à S et k_i le nombre de plus proches voisins appartenant à C_i parmi les k plus proches voisins de S , avec

$$k = \sum_{i=1}^n k_i \quad (4.21)$$

Le choix de la valeur k est crucial, car elle détermine les points inclus dans le volume $V(S)$, donc l'attribution de classe au sujet. Prenons l'exemple de la figure 4.8 où le premier cercle (pointillé) pour $k = 1$ attribue le sujet S à la classe "carré", alors que le deuxième cercle (continu) l'associe à la classe "triangle", car parmi les $k = 5$ plus proches voisins la majorité (3) est de la classe "triangle". Une petite valeur de k rend mieux compte de structures fines locales, mais plus sensible aux bruits. Une grande valeur de k insensible aux points bruités est plus adaptée à une grande base d'apprentissage. On prend couramment, $k = \sqrt{\bar{n}}$ où \bar{n} est la taille moyenne des échantillons. On peut aussi essayer plusieurs valeurs de k pour une plus petite erreur de classification sur les données observées.

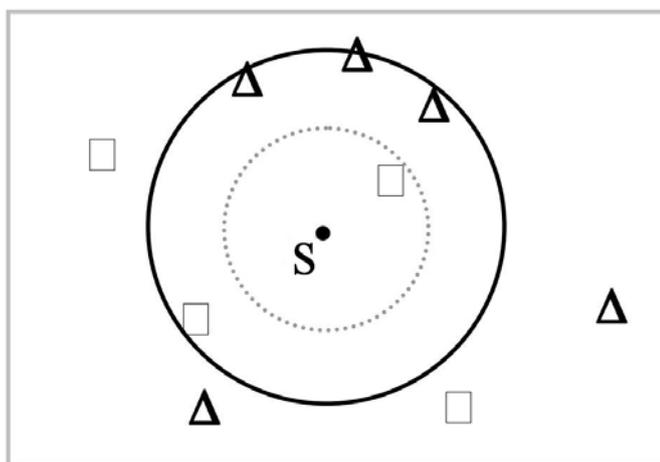


FIGURE 4.8 – Exemple de classification k-ppv d'un objet S . La zone pointillé est dessinée pour une valeur $k = 1$, celle en ligne solide pour $k = 5$.

La méthode des k-ppv a l'avantage d'être très simple à mettre en oeuvre et d'utiliser directement l'ensemble des données d'apprentissage. De plus, elle ne fait aucune hypothèse *a priori* sur les propriétés statistiques des données. Son taux d'erreur de classification tend vers l'erreur minimale si k tend vers l'infini et il est majoré par deux fois cette erreur si $k = 1$. Elle permet de traiter des problèmes multi-classes, sans dessiner des lignes ou des plans discriminants.

Cependant, cette méthode devient inefficace quand la taille de l'ensemble d'apprentissage est importante. En effet, à chaque nouvelle observation à classer, cette méthode mesure toutes les distances entre cette observation et toutes les observations de l'ensemble d'apprentissage. Elle nécessite, dans ce cas, des ressources mémoires importantes et un temps de calcul élevé qui dépend principalement de la distance utilisée. Par exemple, le choix d'une distance euclidienne dans le cas d'un ensemble d'apprentissage contenant une forme allongée n'est pas adapté. Celle-ci ne prend pas en compte la dispersion des points contenus dans ces classes. La distance de Mahalanobis peut être une solution mais le temps de calcul peut devenir encore plus conséquent avec le choix de cette métrique.

Par ailleurs, la méthode des k-ppv présente l'inconvénient d'utiliser les distances pour déterminer les voisins de l'individu à affecter, ce qui peut poser des problèmes si les dimensions à agréger ne sont pas homogènes. En effet, les caractéristiques "parasites" (non-pertinentes) peuvent avoir une échelle de distance plus courte, ce qui fait le point à classer tend vers la classe du bruit. Afin de remédier à cet inconvénient, on effectue soit une sélection de caractéristique (mentionnée dans la section précédente), soit utiliser un autre espace (homogène) de représentation de données, telles que l'information mutuelle et des relations de ressemblances floues [Perny and Henriët, 1996].

Réseau de Neurones Artificiels (RNA) Les réseaux de neurones sont à l'origine d'une tentative de modélisation mathématique du cerveau humain. Le principe général consiste à définir des unités simples appelées neurones, chacune étant capable de réaliser quelques calculs élémentaires sur des données numériques. On relie ensuite un nombre important de ces unités formant ainsi un outil de calcul puissant. L'étude des réseaux de neurones artificiels a débuté au début des années 1940 par les travaux de [McCulloch and Pitts, 1943] et a été étendue aux problèmes de classification et de reconnaissance des formes par Rosenblatt [Rosenblatt, 1962].

L'élément fondamental du réseau de neurones artificiels est le modèle mathématique d'un neurone comme le montre la figure (4.9).

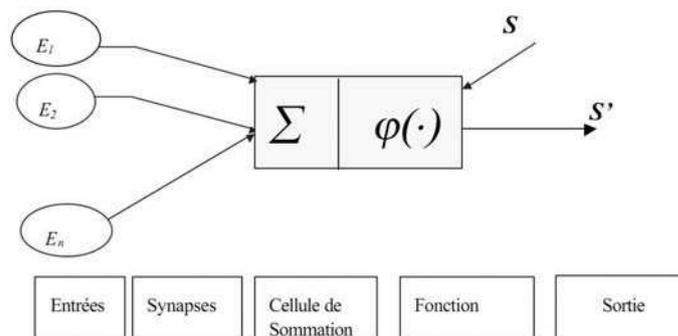


FIGURE 4.9 – Représentation schématique de la structure d'un neurone artificiel

La structure d'un neurone se compose de trois parties principales (illustré dans la figure 4.9) :

- les liens connectiques (Synapses) qui introduisent les valeurs des entrées $E_1 \dots E_n$ pondérées par des poids synaptiques $\omega_i \dots \omega_n$;
- une cellule de sommation (Σ) qui additionne les valeurs d'entrée pondérées pour calculer l'entrée V d'une fonction d'activation φ (ci-après) telle que : $V = \omega_0 + \sum_{i=1}^n \omega_i x_i$, où ω_0 est une valeur numérique associée à un neurone , appelé " biais " (ne pas confondre avec un biais statistique) . Il est commode de considérer ce biais comme le poids d'une entrée x_0 dont la valeur est toujours égale à 1 de sorte que $V = \sum_{i=0}^n \omega_i x_i$;
- Une fonction d'activation φ qui détermine la valeur de sortie du neurone S' . La fonction d'activation est toujours monotone pour éviter des résultats ambiguës (une valeur d'entrée ne correspond à qu'une valeur à la sortie). S est la valeur de la sortie attendue qui sert à corriger les coefficients synaptiques pour diminuer l'écart entre les valeurs de sortie attendue et réelle.

A partir de neurones unitaires, un réseau neuronal est construit par interconnexion de sorte que la sortie d'un neurone soit l'entrée d'un ou plusieurs neurones dans la couche suivante. Diverses architectures topologiques existent pour la construction de réseau neuronal, l'une des plus utilisées dans l'apprentissage supervisé étant le réseau "feedforward " multicouches illustré dans la figure 4.10 ci-après :

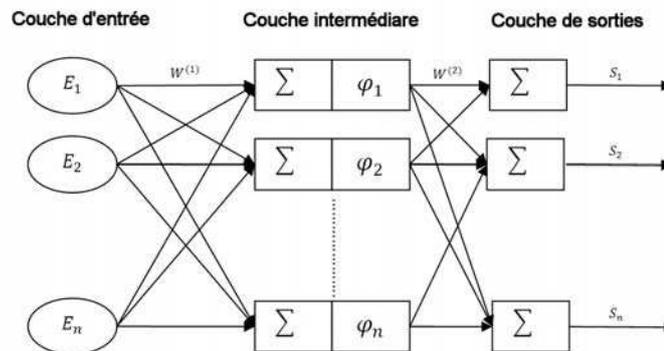


FIGURE 4.10 – Structure de réseau neuronal à 3 couches

Il est composé de trois couches de neurones (couche d'entrée, couche intermédiaire et couche de sorties) qui passent successivement l'information de l'entrée jusqu'à la sortie. Le mécanisme de transmission des données entre les couches est décrit comme suit :

- Les neurones de la première couche reçoivent les données à leurs entrées, puis les transmettent aux entrées des neurones de la deuxième couche selon la connexion créée. Dans cette couche, aucun calcul n'est effectué par les neurones. Le nombre de neurones dans cette couche est généralement lié au nombre de variables présentes dans les données.
- Dans la deuxième couche, chaque neurone prend les valeurs provenant des n neurones de la première couche, puis effectue une sommation des valeurs pondérées avec des poids ω_{ij} (poids du i^{ime} neurone vers le j^{ime} neurone de la couche suivante). Les sommes sont transfé-

rées ensuite aux fonctions d'activations $\varphi_1 \dots \varphi_n$ afin de calculer des valeurs intermédiaires pour entrer dans la couche de sortie. Ainsi, l'information va être propagée vers l'avant selon l'équation (4.22) :

$$x_j^{(k+1)} = \varphi^{(k+1)}\left(\sum_{i=1}^n \omega_{ji}^{(k+1)} x_i^{(k)}\right) = \varphi^{(k+1)} h^{(k+1)} \quad (4.22)$$

où k signifie le numéro de la présente couche avec le passage de valeurs x_i ($i \in [1, n]$, $n =$ nombre de neurones d'une couche) dans le sens $x^{(k)} \mapsto x^{(k+1)}$, ($k = 1, 2$). $h^{(k)}$ est la sommation pondérée des valeurs à la couche k . Le ω_{ji} est le poids synaptique attribué à la connexion entre le $i^{ième}$ neurone de la couche k et le $j^{ième}$ neurone de la couche suivante ($k + 1$).

- Lorsque l'information est propagée jusqu'aux neurones de la couche de sortie ($S_1 \dots S_n$), on obtient le résultat final pour le vecteur d'entrée donné. En classification, le nombre de neurones dans la couche de sortie est déterminé par le nombre de classes à attribuer.

Si on modélise ce mécanisme par rapport aux sorties, il est similaire à une régression linéaire multiple qui essaie de prédire des valeurs de sortie pour un vecteur d'entrée E selon un modèle mathématique dont on doit estimer les paramètres ($\omega_1 \dots \omega_n$). La classification avec la méthode du réseau de neurones consiste à chercher un jeu de poids optimal, afin de minimiser l'erreur quadratique moyennée entre les valeurs des sorties modélisées et celles observées.

$$e = \sum_{l=1}^k \sum_{i=1}^m (S_{i,l} - S'_{i,l})^2 \quad (4.23)$$

où e est l'erreur quadratique qu'on tend à minimiser. $S_{i,l}$ est la valeur attendue de la sortie i du réseau (parmi m sorties) pour la couche l (parmi k couches) et $S'_{i,l}$ sa valeur obtenue par le modèle.

L'algorithme de propagation des données ("feed forward network") présenté ci-dessus ne contient pas de boucle d'information pour guider la recherche des poids, ce qui impose donc une recherche exhaustive dans un espace des poids de très grande dimension [Roja, 1996].

En pratique, pour résoudre ce problème, on utilise l'algorithme de rétropropagation du gradient ("Backpropagation") pour assister la recherche. Cette méthode consiste à calculer le gradient de l'erreur pour chaque neurone du réseau, de la dernière couche vers la première, puis réviser les poids par leur gradient d'erreur [Roja, 1996].

L'algorithme de rétropropagation du gradient s'effectue en deux étapes :

- En présence d'un vecteur de données à l'entrée, l'algorithme propage l'information vers l'avant, comme décrit précédemment pour le réseau "feed forward". En initialisant les poids synaptiques, le réseau calcule le résultat à la sortie $S_1 \dots S_n$ pour ce vecteur d'entrée E .

- Lorsque la propagation vers l'avant est terminée, l'erreur entre la sortie obtenue S et le vecteur désiré à la sortie S' est calculé pour l'échantillon présent à l'entrée. Pour chaque neurone i de la dernière sortie, on calcule l'erreur de sortie :

$$e_i^{sortie} = \varphi'(h^{sortie})[S_i - S'_i] \quad (4.24)$$

où φ' est la dérivée de la fonction d'activation. L'erreur de sortie $e^{(k)}$ est propagée ensuite vers l'arrière, et on calcule l'erreur de la couche précédente $e^{(k-1)}$ par la formule :

$$e_j^{(k-1)} = \varphi'^{(k-1)}(h^{(k-1)}) \sum_{i=1}^n \omega_{ij} e_i^{(k)} \quad (4.25)$$

Lorsque l'erreur est arrivée à la couche d'entrée, on met à jour les poids synaptiques entre toutes les couches par :

$$\omega_{ij}^{new} = \omega_{ij}^{old} + \eta e_i^{(k)} x_j^{(k-1)} \quad (4.26)$$

Avec η le taux d'apprentissage dont la valeur typique est comprise entre 0,1 et 0,9. Il détermine la vitesse et la précision d'apprentissage pour trouver des poids optimaux. Une petite valeur de η donne un apprentissage lent mais stable, tandis qu'une grande valeur permet à l'algorithme d'apprendre plus rapidement, mais n'assure pas que la solution converge au point optimal.

L'algorithme de rétropropagation est une méthode d'optimisation qui recherche régressivement un jeu des poids synaptiques optimaux pour minimiser la fonction d'erreur entre la sortie modélisée et le résultat attendu. Les données de l'échantillon sont présentées plusieurs fois à l'entrée du réseau pour lui apprendre à reconnaître la forme des données, et donner une sortie adéquate pour les classes correspondantes. L'introduction des mêmes données plusieurs fois dans l'entraînement du réseau entraîne un risque de sur-apprentissage du modèle. A l'extrême, le modèle ne reconnaît plus d'autres formes de données que celle introduite dans l'apprentissage, donc n'est pas capable de classer des nouveaux sujets. Choisir un nombre de présentation adéquat pour l'entraînement est crucial pour que le réseau développé soit utilisable en pratique. Une méthode pour aider à choisir ce nombre consiste à introduire périodiquement des données de validation (des données différentes de celles utilisées pour l'entraînement) dans l'entraînement et à calculer le taux d'erreur correspondant. Ce taux d'erreur a normalement tendance à diminuer au début de l'entraînement, puis augmenter après un certain nombre de répétitions. Le point d'erreur minimale pour les données validation est un bon indicateur de l'arrêt d'entraînement. Il assure que les poids ainsi entraînés donnent le meilleur taux d'erreur pour de nouvelles données à venir.

Etat de l'art sur l'application des méthodes de classification en spectroscopies optiques *in vivo* Les méthodes de classification présentées précédemment sont largement appliquées dans des études spectroscopiques. A titre d'exemple, [Diagaradjane *et al.*, 2005] employent

l'ADL sur des caractéristiques spectrales en AF et RD pour distinguer les états précancéreux sur peau de souris. Ils emploient un test statistique de Fisher (test-F) partiel et une méthode pas-à-pas pour incorporer séquentiellement l'ensemble de caractéristiques extraites à une fonction discriminante linéaire de Fisher.

[Kamath and Mahato, 2007], après extraction de caractéristiques statistiques sur spectres d'intensité de fluorescence et réduction par ACP, utilisent une classification multivariée supervisée par la méthode des k-ppv afin de discriminer les états précancéreux et cancéreux de tissus oraux.

[Marin *et al.*, 2005], après extraction de caractéristiques des spectres de RD et réduction par ACP pour discriminer les états précancéreux du col de l'utérus, ont utilisé une classification multivariée supervisée par ADL de Fisher et par la méthode des k-ppv avec un seul voisin ($k=1$) avec une mesure de distance Euclidienne.

[Wallace *et al.*, 2000a] ont réalisé une comparaison entre deux algorithmes de classification : RNAs et Analyse Discriminante Multivariée. Les RNAs utilisés étaient du type backpropagation avec 7 neurones en entrée, 10 neurones dans la couche cachée et 2 neurones de sortie. Globalement, la classification à RNA donne de meilleurs résultats, surtout quand la base de données utilisée est grande. Les auteurs ont obtenu une amélioration de 8,1% en Se et 17,9% en Sp.

[Wang *et al.*,] ont réalisé un algorithme de classification combinant RNA de type backpropagation et Partial Least Squares pour discriminer des tissus oraux cancéreux par spectroscopie de fluorescence. Les 20 premières composantes extraites avec la méthode PLS et expliquant 99% de la variance des spectres d'émission de fluorescence, ont été fournies à l'algorithme RNA composé de 20 neurones en entrée, 9 neurones dans la couche cachée et 4 neurones de sortie.

Classifieur combiné Les méthodes de classification vues précédemment, compte tenu de leurs différents principes, donnent des résultats variés, surtout quand elles sont appliquées dans la sélection de type "wrapper". Par exemple, la méthode k-ppv, basée sur une attribution de classe d'un objet en référence à ses k plus proche voisins, est plus adaptée aux données dispersées, alors que l'ADL est plus adaptée aux données compactes et concentrées autour des centroïdes des classes. Le réseau des neurones, basé sur méthode d'optimisation régressive cherche un modèle minimisant le taux d'erreur en classification. Il est plutôt adapté aux échantillons de grande taille. Sinon, le modèle risque d'être surentraîné et ne donne pas de bon résultat pour classifier de nouveaux individus.

En pratique, aucune méthode unique ne peut résoudre au mieux tous les problèmes. Trouver la méthode de classification la plus adaptée à un problème spécifique constitue un enjeu important. Des équipes ont comparé les performances de plusieurs méthodes de classification sur un jeu de test identique, et choisi la plus discriminante pour leur étude ultérieure. Cependant, le jeu de données possédant parfois une taille limitée ne correspond pas au caractère de la population réelle, ce qui génère des résultats biaisés pour la classification ultérieure.

Une autre solution consiste à combiner plusieurs classifieurs pour attribuer un individu à une classe plus probable. Ceci est fait en synthétisant les résultats obtenus par plusieurs classifieurs,

puis en attribuant le sujet à une classe plus probable selon des règles de décision. Tout se passe comme si l'on regardait un problème depuis différents points de vue et que l'on donnait la solution en prenant en compte tous ces facteurs de réflexion. Par exemple, [Andrea Sboner *et al.*, 2003] a combiné trois méthodes de classification pour caractériser les images de tissus cutanés sains et de mélanomes. L'idée est de définir une règle de décision qui assure une haute sensibilité de l'algorithme, telle que, si au moins une des méthodes trouve que le sujet est cancéreux, le diagnostic sera positif pour le mélanome. Les auteurs ont annoncé qu'avec cette méthode de multi-classifieur la sensibilité est augmentée, sans beaucoup diminuer la spécificité. **L'approche proposée par [Andrea Sboner *et al.*, 2003] semble particulièrement intéressante pour notre étude, car d'avoir une méthode diagnostique sensible est toujours ce que l'on cherche en priorité dans la clinique.**

4.2 Solutions méthodologiques développées

4.2.1 Présentation des données spectrales

Les spectres d'autofluorescence et de diffusion élastiques que nous avons acquis dans le cadre du protocole d'expérimentation (cf. Section 3.2) sont enregistrés et regroupés dans des matrices tridimensionnelles, notée M_i ($i =$ le numéro d'individu, $i \in [1, 59]$), pour 59 échantillons tissulaires. Chaque matrice contient les valeurs numériques d'intensité spectrale mesurées en 3 acquisitions successives pour 10 excitations et 6 distances inter-fibres, ce qui fait un total de 10620 spectres à traiter. Chaque spectre est constitué de 1024 points d'intensités spectrales mesurées par le capteur CCD. La présentation tridimensionnelle d'une matrice M_i est illustrée dans la figure (4.11).

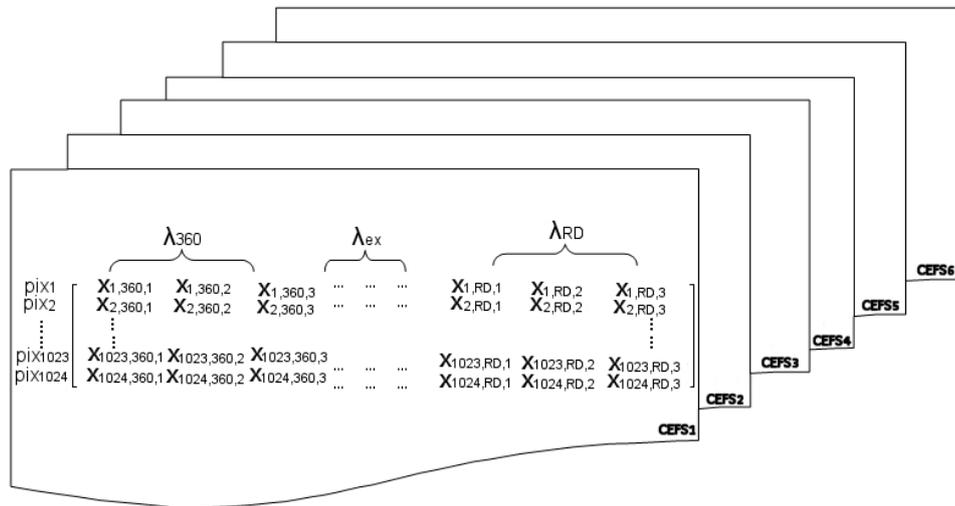


FIGURE 4.11 – Organisation de nos données spectrales (pour un site de mesure/individu) dans une matrice 3D M_i . La matrice contient 6 tableaux correspondant à 6 distances interfibrés (*CEFS*). Pour chaque tableau, les lignes correspondent à l'arrangement des colonnes de pixels sur le capteur CCD. Chaque colonne de données représente une acquisition du spectre mesuré pour une excitation et à une distance interfibrés

Les spectres mesurés à 6 distances interfibres ($CEFS_j$, $j \in [1, 6]$) sont regroupés respectivement dans 6 matrices 2D. Un élément $x_{pix, \lambda_{ex}, a}$ dans une de ces matrices représente la valeur de l'intensité spectrale obtenue par la pix^{ime} colonne de pixels ($pix \in [1, 1024]$) à une zone illuminée (cf. la section 2.1.3 du chapitre 2) sur le capteur CCD pour la longueur d'onde d'excitation λ_{ex} ($\lambda_{ex} \in 360, 370, \dots, 440nm, RD$), et pour la a^{ime} acquisition ($a \in [1, 3]$). En tenant compte des bruits et de la réponse spectrale du système, la valeur d'un tel élément peut être exprimée par l'équation suivante :

$$x_{pix, \lambda_{ex}, a} = g_{pix, \lambda_{ex}, a} \times x'_{pix, \lambda_{ex}, a} + b_{pix, \lambda_{ex}, a} \quad (4.27)$$

où x' est la valeur de l'intensité réellement émise par le site tissulaire, g est la valeur de coefficient qui modélise la déformation spectrale et spatiale du système de mesure (optique et opto-électronique) utilisé, b est la composante de bruit de mesure associé à chaque pixel.

Rappelons que la classification supervisée en spectroscopie optique tissulaire consiste à attribuer une classe tissulaire à un site de mesure sur le tissu exploré à l'aide d'un modèle de classification, entraîné sur un jeu de données X' dont les classes sont déterminées par analyse anatomopathologique. Dans notre étude, ces résultats de classification "gold standard" sont codées (1 pour hypertrophique et 0 pour non-hypertrophique) et regroupés dans un vecteur Y . L'objectif de l'entraînement est d'établir un modèle qui fait correspondre X' aux résultats attendus Y .

Sachant que le vecteur Y est plutôt en relation avec X' , mais pas X , une étape *à priori* de la classification est de restaurer la matrice X' de X . Ceci est fait par des étapes de prétraitement qu'on va présenter dans la section suivante.

4.2.2 Algorithme de prétraitement

La méthode de prétraitement implémentée lors de ce travail de thèse est basée sur le travail de [Marin *et al.*, 2006] et celui proposé par [Diaz, 2009] qui a utilisé le même système spectroscopique pour son étude sur les tissus cutanés sains, pré-cancéreux et cancéreux. Au cours de la présente thèse, des modifications ont été effectuées pour faire évoluer le système instrumental et l'adapter au protocole expérimental de notre étude sur les tissus cutanés hypertrophiques de lapins.

Le prétraitement peut être divisé en deux phases (au cours de et après l'expérimentation) qui servent chacune des objectifs différents.

Dans la première phase, le prétraitement concerne des étapes métrologiques mentionnées dans la section 2.4 qui assurent principalement la fiabilité et la répétabilité des mesures. Elles sont intégrées dans le protocole expérimental (cf. la section 3.2) et réalisées avant l'expérimentation ou au cours de chaque séance de mesure spectroscopique. Ces étapes sont les suivantes :

- Avant de commencer le protocole expérimental, un calibrage en longueur d'onde du capteur CCD est effectué. Cette procédure consiste à mettre en correspondance les pixels du

capteur CCD et les longueurs d'onde de mesure, en repérant la position spectrale des pics caractéristiques d'une lampe Mercure-Argon ([Utzinger *et al.*, 2001; Martrenchard-Barra, 2006]). A l'issue de cette procédure, les valeurs d'intensité mesurée sont fonction des longueurs spectrales et l'équation 4.28 devient donc :

$$x_{\lambda_{em}, \lambda_{ex}, a} = g_{\lambda_{em}, \lambda_{ex}, a} \times x'_{\lambda_{em}, \lambda_{ex}, a} + b_{\lambda_{em}, \lambda_{ex}, a} \quad (4.28)$$

Ce calibrage a été réalisé une fois pour toutes.

- Au moment de chaque mesure, la soustraction du courant d'obscurité (fente d'entrée du spectrographe fermée) a été réalisée de façon automatique par le logiciel développé (cf. la section 2.3.3). Le spectre à la sortie du CCD est déterminé par :

$$S_{SCN}(\lambda_{em}) = S_{STB}(\lambda_{em}) - S_{FF}(\lambda_{em}) \quad (4.29)$$

où $S_{STB}(\lambda_{em})$ est le spectre d'intensité mesuré sur le tissu (fente fermée) et $S_{FF}(\lambda_{em})$ est le spectre mesuré avec la fente d'entrée fermée.

- En dehors de protéger nos mesures de parasites liés à la lumière ambiante (cf. la section 3.2), une mesure est réalisée sur tissu *in situ* à la fin de chaque séance expérimentale en fermant la source. Ce spectre d'intensité de lumière ambiante est soustrait (voir plus loin) des spectres mesurés sur le tissu pour éliminer le bruit de fond associé.
- Comme mentionné dans la section (2.4), le système spectroscopique possède une réponse spectrale non-linéaire, qui affecte la forme et l'amplitude des spectres mesurés. Pour restaurer les spectres d'intensités originaux, la fonction de transfert du système doit être identifiée (cf. la section 2.21). Pour ce faire, le spectre d'intensité $S_{mes}(\lambda_{em})$ d'une lampe de calibrage (DH 2000-CAL, Ocean Optics) est acquis avec le système. Le spectre d'intensité étalonné $S_{ref}(\lambda_{em})$ de cette lampe (cf. Annexe A) est connu *a priori*. La fonction de transfert $H_{sys}(\lambda_{em})$ est obtenue par la division de ce spectre mesuré $S_{mes}(\lambda_{em})$ par le spectre de référence $S_{ref}(\lambda_{em})$:

$$H_{sys}(\lambda_{em}) = \frac{S_{mes}(\lambda_{em})}{S_{ref}(\lambda_{em})} \quad (4.30)$$

- Une mesure de la puissance en sortie de la source d'excitation et en bout de sonde fibrée est nécessaire pour calibrer la quantité de lumière réémise par le tissu. Cette étape nous permet de prendre en compte des variations d'intensité spectrale liées à la dégradation de la lampe et à la détérioration des fibres au cours du temps. Les mesures de puissance ont été réalisées au début de chaque jour de mesure à l'aide d'un puissance mètre (841PE et détecteur 818-UV, Newport Corp.). Le logiciel nouvellement développé permet de communiquer avec le puissance mètre pour une surveillance en temps réel de la puissance de la lampe. Cependant, ce dernier nécessite une modification de la configuration de la sonde utilisé pour que l'injection de la lumière de la source se fasse dans 2 fibres regroupées dans

le même connecteur (l'une étant reliée au puissancemètre et l'autre allant jusqu'à l'extrémité de la sonde en contact avec le tissu.

La deuxième phase de prétraitement consiste à corriger les spectres bruts acquis par des coefficients obtenus grâce aux procédures de calibrage. Des opérations de filtrage peuvent également être appliqués dans cette étape, afin d'augmenter le rapport signal-sur-bruit des spectres. Le programme que nous avons développés (sous Matlab) permet d'appliquer ces corrections et filtrer de façon automatique tous les spectres bruités. Les fonctions principales de prétraitement sont les suivantes :

- **sous-échantillonnage des spectres** Le prétraitement commence par une étape de sous-échantillonnage. Selon la loi théorique de diffraction, les réseaux de diffraction présents dans le spectrographe (en incidence normale) et la configuration expérimentale que nous avons utilisée donne une résolution optique de $2nm$. Or, la résolution spectrale théorique des spectres acquis par le capteur CCD (lignes de 2048 pixels) avec un réseau correspond à $\frac{560}{2048} = 0,27nm/pixel$. Sous-échantillonner le spectre est donc possible sans biais pour correspondre à la résolution optique et réduire ainsi le nombre de point par courbe pour faciliter le traitement ultérieur. Nous avons donc sous-échantillonné nos spectres par un facteur 7. Après notre observation, le sous-échantillonnage n'a pas significativement changé les formes des spectres.
- **réduction de la bande spectrale d'intérêt** La courbe typique d'un spectre d'autofluorescence peut être divisée en trois parties :

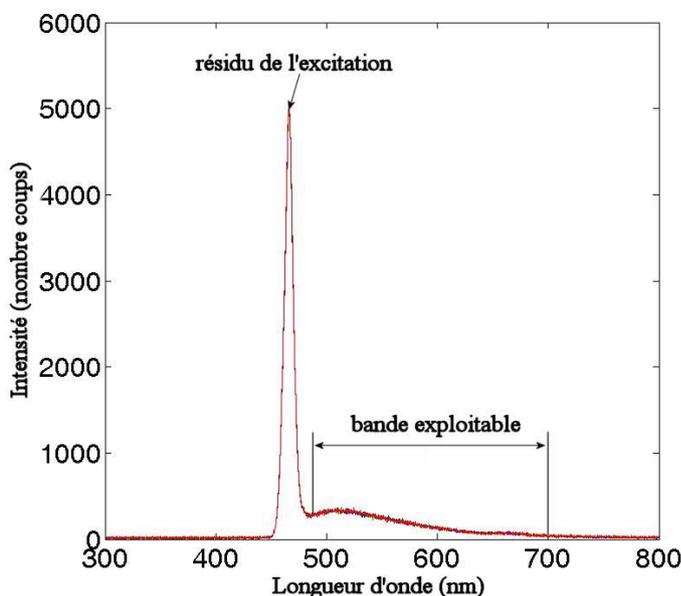


FIGURE 4.12 – Parties constitutives d'une courbe typique de spectre d'autofluorescence excité à $440nm$

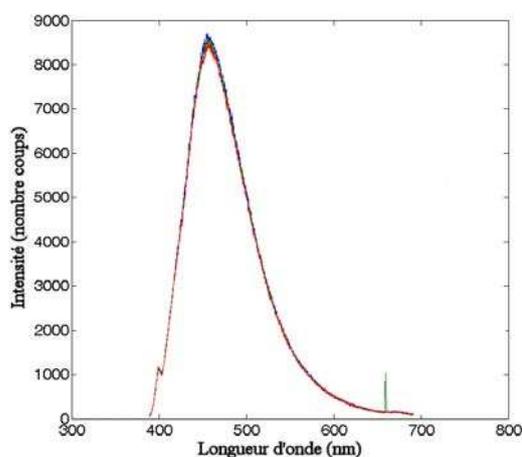
- 1) une bande exploitable, contenant la bande d'intérêt ou d'information utile.
- 2) une bande spectrale basse, contenant l'intensité résiduelle de l'excitation rétrodiffusée. La grandeur de cette intensité résiduelle dépend de l'efficacité du filtre de réception

(passe-haut) à éliminer la lumière d'excitation rétrodiffusée.

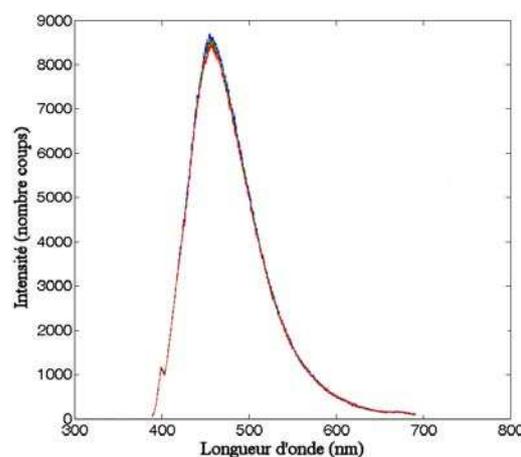
3) une bande supérieure à 700 nm, sans signal de fluorescence [Ramanujam, 2000].

Afin de ne garder que les parties contenant l'information utile en autofluorescence et en RD, nous avons défini les bandes complètes suivantes :

- 385-680 nm pour les excitations AF-360 et AF-370,
 - 416-680 nm pour les excitations AF-380 et AF-390,
 - 453-680 nm pour les excitations AF-400 et AF-410,
 - 456-680 nm pour les excitations AF-420 et AF-430,
 - 487-680 nm pour les excitations AF-440,
 - 350-715 nm pour RD.
- **Suppression des artefacts** Certains spectres présentent des artefacts "impulsionnels" de grande amplitude (un exemple est illustré dans la figure 4.13.1). Pour supprimer ce type de parasite, on utilise un filtre médian avec une largeur de 5 points (qui est déterminée en regardant la largeur du pic parasite). Ces points isolés avec une grande intensité sont filtrés en efficace (Fig. 4.13.2).



4.13.1:



4.13.2:

FIGURE 4.13 – Image montre un exemple d'artefact présent à la longueur d'onde de 660nm dans le spectre d'autofluorescence excité à 360nm (Fig. 4.13.1) et sa suppression par un filtre médian (Fig. 4.13.2)

- **Suppression des spectres erronés** Afin de résoudre le problème de recueil de spectres d'intensité faussés à cause du mouvement de la sonde pendant l'acquisition, nous effectuons une acquisition multiple (3 acquisitions à la suite) sur un même site et pour chaque excitation. La détection de spectre erroné est réalisée par le calcul de "l'énergie" totale (intégration d'intensité de toute la courbe) de chaque spectre, ainsi que leur moyenne et écart-type. Un spectre erroné possède normalement une "énergie" différente par rapport aux autres qui sont correctement acquis. Donc, la stratégie pour l'élimination du spectre erroné consiste à supprimer un des 3 spectres dont l'énergie spectrale n'est pas dans la fourchette de l'énergie moyenne $\pm 5\%$. La figure 4.14 montre un exemple d'un spectre er-

roné obtenu parmi 3 acquisitions successives.

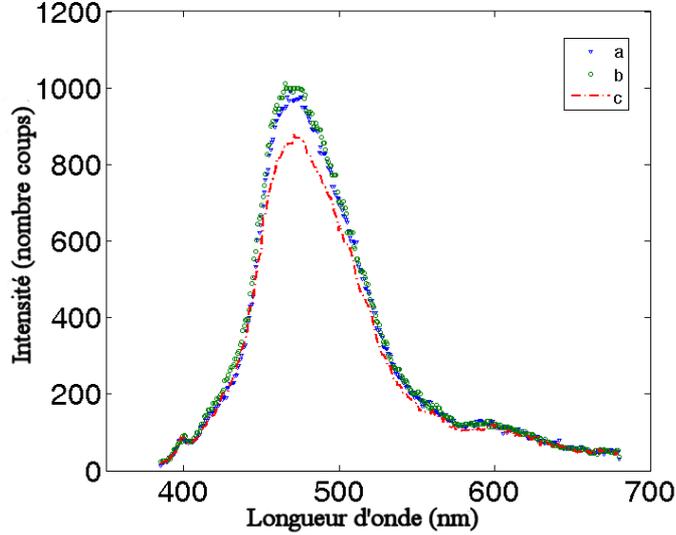


FIGURE 4.14 – Exemple de spectres d’intensité de fluorescence mesurés en multi-acquisition à une longueur d’onde d’excitation de 360nm (a et b sont les spectres corrects, c spectre considéré erroné)

- **Moyennage des spectres en multi-acquisition** Suite à la suppression des spectres erronés, les spectres restants sont moyennés afin d’améliorer le rapport signal sur bruit [De Veld *et al.*, 2005]. En supposant que le bruit possède une distribution normale, le moyennage des spectres permet de diviser la variance du bruit par un facteur égal à la racine carré du nombre de spectres moyennés (ici, la réduction selon un facteur de $\sqrt{2}$ ou $\sqrt{3}$) [Wolf, 2007]. Après le moyennage des spectres, un élément matriciel défini par l’équation 4.28 peut s’écrire comme :

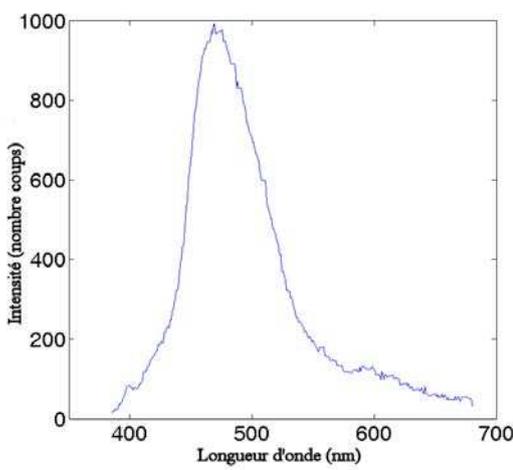
$$x_{(\lambda_{em}, \lambda_{ex})} = g_{(\lambda_{em}, \lambda_{ex})} \times x'_{(\lambda_{em}, \lambda_{ex})} + b_{(\lambda_{em}, \lambda_{ex})} \quad (4.31)$$

- **Soustraction du bruit de fond** Les spectres moyennés obtenus à l’issue de l’étape précédente sont corrigés par soustraction du spectre du bruit de fond acquis à chaque jour de mesure. Ce dernier est mesuré et traité de la même manière que les autres spectres acquis sur les tissus (3 acquisitions successives, filtré et moyenné). Il correspond au bruit $b_{(\lambda_{em}, \lambda_{ex})}$ décrit dans l’équation 4.31 qui devient

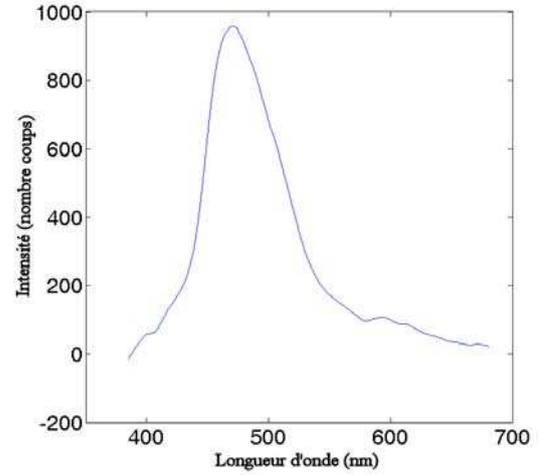
$$x_{(\lambda_e, \lambda_x)} = g_{(\lambda_e, \lambda_x)} \times x'_{(\lambda_e, \lambda_x)} \quad (4.32)$$

- **Lissage des spectres** Le bruit de mesure en haute fréquence contenu dans les spectres peut être diminué grâce à l’utilisation de filtres numériques de lissage. Nous avons appliqué un filtre polynomial Stavizky-Golay dont l’avantage est de réaliser un lissage de la courbe tout en préservant l’existence et la largeur des pics d’intensité d’intérêt. Pour définir les caractéristiques du filtre (largeur de fenêtre et degré du polynôme), nous avons pris en

considération d'une part, un tronçon de spectre où l'on estime que le signal est nul (le meilleur filtre doit rendre l'énergie de bruit dans cette tranche de spectre nul), et d'autre part, les parties de spectre possédant les variations spectrales d'intensité les plus élevées (les pics les plus étroits correspondant aux fluorophores doivent être préservés). Ainsi, nous avons choisi un filtre du deuxième ordre avec une fenêtre de 25 points, soit $6,75nm$ en résolution spectrale. Ce filtre permet de lisser efficacement les spectres tout en conservant les informations utiles décrivant la forme générale (Fig. 4.15.1 et Fig. 4.15.2 pour la comparaison).



4.15.1:



4.15.2:

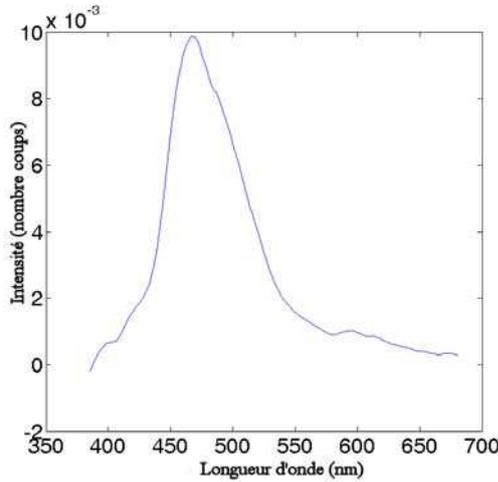
FIGURE 4.15 – Image montre un exemple de spectre moyen des 3 (ou 2 selon la détection de spectre erroné) spectres accumulés à l'excitation de $360nm$ (Fig. 4.15.1) et l'effet de lissage du filtre polynomial Stavizky-Golay sur ce spectre moyenné (Fig. 4.15.2)

- **Correction des spectres par rapport à la réponse spectrale du système** Dans l'équation 4.32, $(g_{(em,ex)})$ correspond à la réponse spectrale non-linéaire du système. En effet, en comparant les équations 4.32 et 4.30, on peut trouver que le coefficient $g_{(e,x)}$ correspond à la fonction transfert du système. Donc, pour l'éliminer et restaurer la matrice $x'_{(em,ex)}$, il suffit de diviser les spectres par la valeur de fonction H_{sys} à la longueur d'onde d'émission correspondante. Cette correction doit être appliquée à tous les spectres d'intensité d'AF acquis. Par contre, pour les spectres de RD, cette étape de correction n'est pas nécessaire, car l'effet de la réponse du système est annulé par le calcul même des spectres de RD :

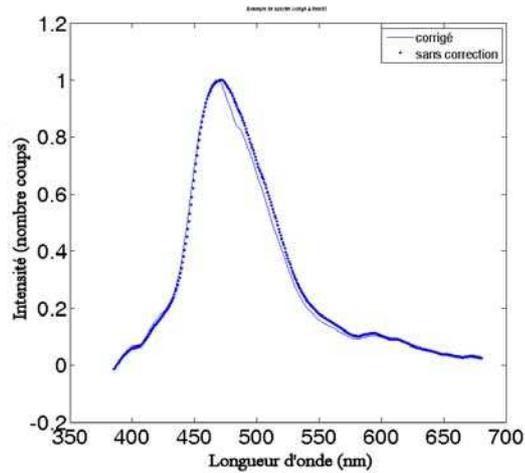
$$RD(\lambda) = \frac{S_{tissu}(\lambda)}{S_{standard}(\lambda)} = \frac{H_{sys}(\lambda)S'_{tissu}(\lambda)}{H_{sys}(\lambda)S'_{standard}(\lambda)} = \frac{S'_{tissu}(\lambda)}{S'_{standard}(\lambda)} \quad (4.33)$$

où S' correspond au spectre réel et S au spectre mesuré par le système (déformé). Un exemple de spectre corrigé est illustré dans la figure 4.16.1. On peut remarquer que l'intensité du spectre corrigé est beaucoup plus faible que celui non corrigé (Fig. 4.16.1) et (Fig. 4.16.2). Pour mieux visualiser le changement apporté par la correction sur la forme

spectrale, nous normalisons les spectres (corrigés et non-corrigés) par rapport à leurs pics d'intensité. Nous pouvons constater que le changement en termes de forme spectrale est plus évident dans la bande de 480 – 600nm (Fig. 4.16).



4.16.1:



4.16.2:

FIGURE 4.16 – La figure 4.16.1 montre un exemple de spectre corrigé par rapport à la déformation du système. La figure 4.16.2 illustre qu'il y a une différence en termes de la forme de courbe (dans la bande de 450 – 600nm) entre le spectre corrigé(trait) et celui original (point), après normalisation par rapport au pic à 455nm.

- **Correction par rapport à la variation de puissance de la source** Pour diminuer l'effet de la variation de puissance de la source sur nos données, nous avons normalisé tous les spectres acquis au cours de chaque journée d'expérimentation par la puissance mesurée le même jour pour chaque longueur d'onde d'excitation.

4.2.3 Extraction/Sélection des caractéristiques discriminantes pour la classification

4.2.3.1 Solution précédente et problèmes posés

Dans les travaux réalisés par [Diaz, 2009], le choix des caractéristiques à extraire a été effectuée par une comparaison visuelle entre les spectres moyens pour les différentes classes tissulaires. Les paramètres des spectres présentant des différences visibles entre chaque paire de classes sont calculés, puis sélectionnés par un test statistique (T-test) pour obtenir les caractéristiques les plus discriminantes pour la classification. Ainsi, 762 caractéristiques spectrales sont extraites à partir des spectres AF et RD mesurés sur 4 types de tissus biologiques (Sain, Hyperplasie chronique, Hyperplasie aigue, Dysplasie) et celles sélectionnées comme discriminantes sont rappelées dans les tableaux B.1 et B.2 dans Annexe B. Pour plus de détails sur le calcul de ces caractéristiques, les lecteurs pourront consulter le mémoire [Diaz, 2009].

Pour réduire la dimension du jeu de données, [Diaz, 2009] a appliqué l'ACP sur les caractéristiques restantes et utilise au final les composantes principales pour la classification. (cf. Tab.

B.3 dans l'annexe B)

Le premier revers de ce type d'approche basée sur des caractéristiques extraites *a priori* est que pour les spectres mesurés sur des types tissulaires proches mais appartenant à des classes différentes, des caractéristiques spectrales importantes peuvent ne pas avoir été retenue.

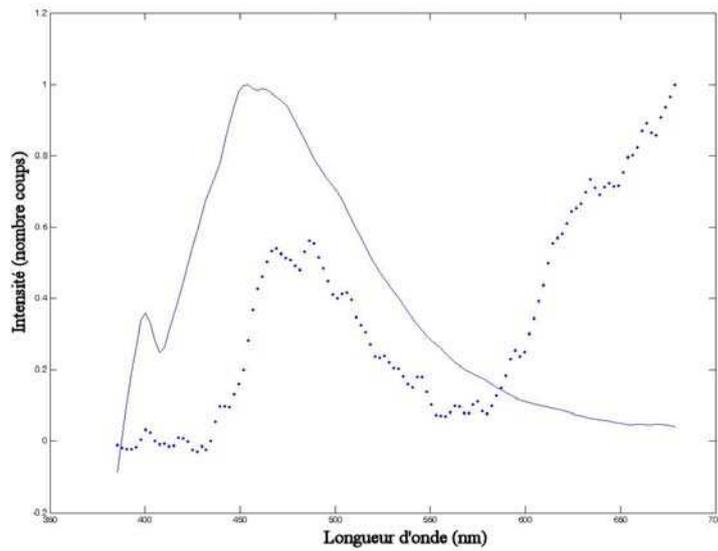
En outre, la sélection de caractéristiques est basé sur un test de Student, ce qui impose des distributions normales pour les caractéristiques sélectionnées. Par ce test, les caractéristiques dont les valeurs possèdent des moyennes et écart-types différents pour deux classes tissulaires sont considérées "discriminantes". Cependant, comme mentionné dans la section 4.1.2.3, une caractéristique efficace dans la classification ne possède pas forcément une distribution normale. Donc, évaluer d'autres tests statistiques (plus particulièrement ceux non-paramétriques) et méthodes de sélection est intéressant pour améliorer la classification.

Les caractéristiques finalement utilisées pour la classification sont des composantes principales obtenues par une réduction dimensionnelle du jeu de caractéristiques discriminantes. Comme mentionné dans la section 4.1.2.2, ces composantes principales sont des combinaisons linéaires des données spectrales, difficilement interprétables du point de vue biologique. Or, un des objectifs de notre étude est d'obtenir des caractéristiques explicatives en termes de classification diagnostique. Ainsi, une sélection de caractéristiques spectrales individualisées pour la classification permet de connaître les lieux de différences spectrales entre les classes de tissus et de relier plus facilement les modifications biologiques associées aux changements optiques du tissu.

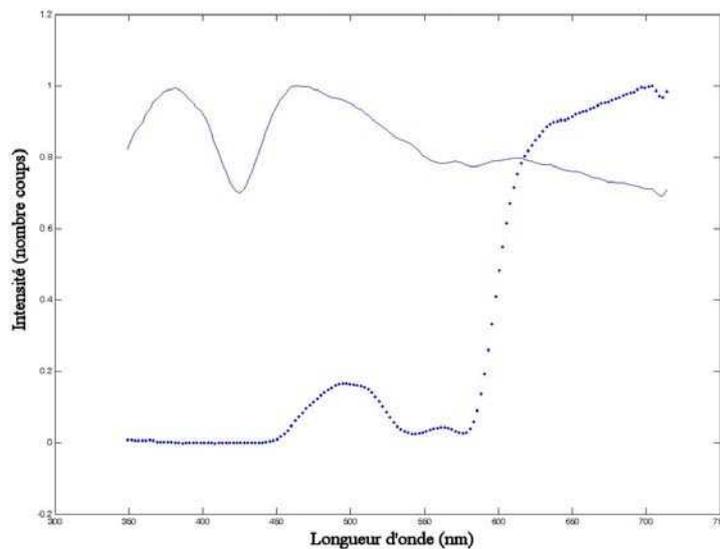
4.2.3.2 Solution développée pour notre étude

Sélection des sites de mesure Afin de réaliser une comparaison de leur forme, tous les spectres mesurés sur les 59 sites tissulaires ont été normalisés individuellement par rapport à leurs pics d'intensité (mise à l'échelle unitaire). Les traitements ci-après sont tous effectués sur les spectres normalisés.

En dépit du protocole rigoureusement suivi pendant l'expérimentation, les spectres mesurés sur certains sites présentent parfois des formes très différentes, voire inexploitable en raison d'une intensité de signal très faible, due à une absorption importante du sang présent sur ces sites de mesure (Fig. 4.17.1 et 4.17.2). Cet effet d'absorption est lié au phénomène visible d'érythème, une manifestation principale de l'inflammation qui a lieu durant la première phase de la cicatrisation. Par conséquent, un examen systématique des spectres est nécessaire pour éventuellement détecter toutes ces données inexploitable et les exclure de notre développement algorithmique. En général, ces spectres présentent des formes "aberrantes" non-corrélées à la majorité des autres spectres de même classe. La détection de ces spectres particuliers peut être effectuée automatiquement, en calculant l'inter-corrélation entre tous les spectres de chaque classe. En bref, si la valeur médiane du vecteur de corrélation-croisée pour un spectre donné est inférieure à un seuil (fixé à 0,7 dans notre cas), ce spectre doit être considéré comme différent, car cela signifie que la moitié des spectres possèdent une similitude inférieure à 30 % avec ce spectre. Avec cette méthode, 44 sites sur 59 (nombre total de sites (cf. Table 3.3)) ont été retenus pour l'analyse ultérieure. Parmi ces 44 sites, 22 sont histopathologiquement classifiés hypertrophiques (HT) et 22 comme non-hypertrophiques (NHT). Les photos de la surface du tissu prises au même jour



4.17.1:



4.17.2:

FIGURE 4.17 – La figure 4.17.1 montre des exemples de spectre d'intensité d'AF correctement mesuré (continu) à l'excitation de $360nm$ et celui aberrant (pointillé). Par leurs spectres de RD correspondants (cf. Fig.4.17.2), on voit bien qu'il y a une absorption importante de lumière dans la bande $350 - 580nm$ pour le spectre aberrant (pointillé), ce qui élimine tout le signal d'AF dans cette bande

des mesures confirment une concentration élevée de sang présent sur la plupart de ces 15 sites éliminés. Cela pourrait expliquer, dans une certaine mesure, la forme aberrante observée sur ces spectres : l'hémoglobine absorbe la quasi-totalité du signal AF émis par le tissu et déforme le spectre mesuré.

Puis, les spectres moyens de chaque classe qui représentent la forme générale des spectres dans le même groupe (HT ou NHT) sont calculés. Nous visons à extraire des caractéristiques

spectrales de chaque groupe de spectre, en comparant la forme générale de leurs spectres moyens.

Extraction de caractéristiques Une caractéristique spectrale discriminante est un paramètre calculé à un endroit de la courbe d'intensité où la variation de celle-ci est la plus cohérente pour les spectres de même classe, mais diffère le plus pour des classes différentes. A partir de cette hypothèse, notre stratégie consiste à chercher tout d'abord des bandes spectrales où il y a potentiellement des caractéristiques "intéressantes", en comparant la forme de la courbe d'intensité pour les spectres de même classe et les spectres moyens de classes différentes.

Par ailleurs, nous avons normalisé chaque spectre par rapport à leur pic principal afin que leurs formes soient comparables à une même échelle.

Pour ce faire, nous calculons les spectres moyens et les écart-types pour les classes HT et NHT, respectivement. Des exemples de spectres moyens pour ces deux classes sont affichés dans les figures 4.18.1 et 4.18.2. Nous pouvons remarquer que les écart-types sont plus grands dans la bande $360 - 450nm$ (spectres plus divergents dans cette bande). On considère ainsi que l'on a moins de chance de trouver des caractéristiques discriminantes situées dans cette bande que dans la bande $450 - 650nm$ où ces écarts sont moins importants.

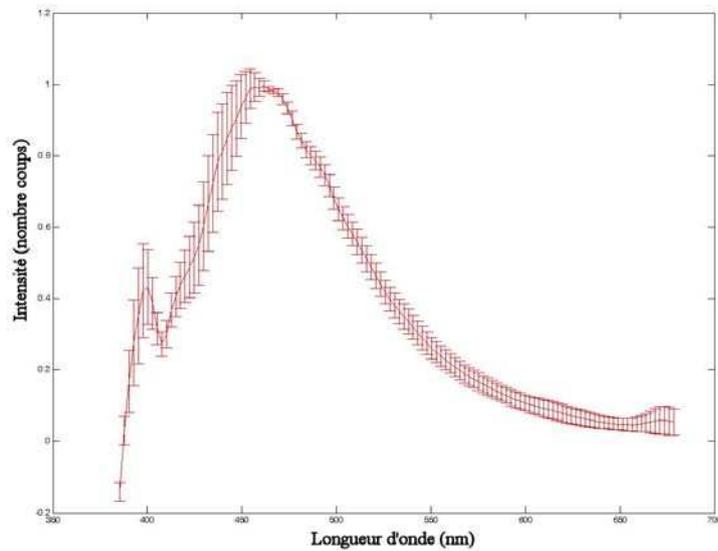
De même, nous cherchons ensuite les bandes de longueur d'onde où les deux types de spectres (spectres moyens) diffèrent le plus. Au final, nous avons déterminé un découpage des spectres moyens en n sous-bande (par exemple, 4 sous-bandes A,B,C,D représentés sur la figure 4.19), puis calculé la corrélation entre les spectres moyens de HT et NHT pour chaque sous-bande. Celle-ci nous permet d'évaluer la similitude entre deux morceaux de signaux. En effet, lorsque deux morceaux de signaux possèdent des caractéristiques de forme de courbe différentes, comme les spectres mesurés sur les tissus HT et NHT cicatriciels, ils doivent être indépendants ou avoir une valeur de corrélation relativement faible. Ainsi, les caractéristiques spectrales d'intérêt doivent être plus probablement contenues dans ces sous-bandes où la valeur de corrélation est faible. Nous fixons un seuil de 0,95 pour définir la significativité de la dépendance entre deux morceaux de spectres. Tous les fragments avec une valeur de corrélation inférieure à ce seuil sont considérés comme décorrélés et conservés pour l'extraction de caractéristiques.

Les bandes intéressantes pour l'extraction de caractéristiques sont les bandes possédant à la fois une grande variance pour les spectres de même classe et une faible corrélation inter-classes entre les spectres.

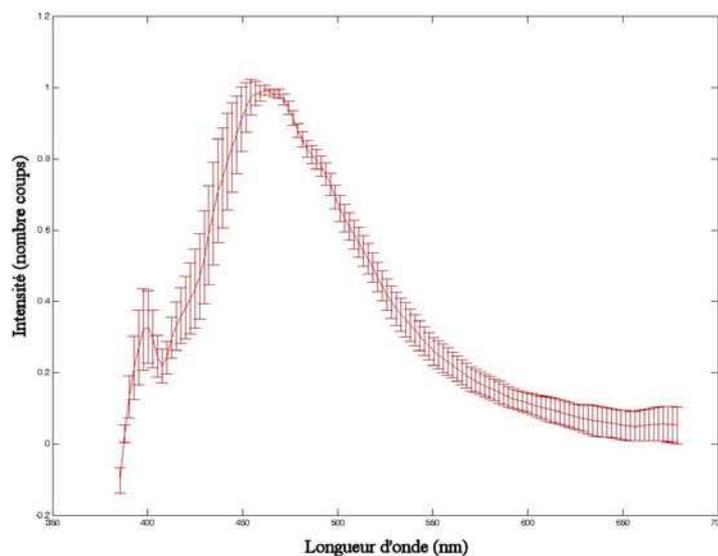
Pour l'analyse de forme, nous nous sommes concentrés sur le calcul des pentes des droites correspondant à chaque sous-bande (linéarisation par morceaux de tailles et nombres variables) pour toutes les sous-bandes trouvées à l'issue de l'étape précédente.

Finalement, 486 caractéristiques de pente ont été extraites des 10 spectres AF et RD mesurés à 6 distances inter-fibres différentes.

Sélection de caractéristiques La sélection de variables est un aspect essentiel de l'apprentissage supervisé. Pour sélectionner un jeu de caractéristiques les plus discriminantes pour la



4.18.1:



4.18.2:

FIGURE 4.18 – Les figures 4.18.1 et 4.18.2 montrent les spectres moyens d'intensité (normalisés par rapport à leurs pics d'intensité) \pm écart-type obtenue à l'excitation de $360nm$ et CEFS de $438\mu m$ et pour les individus de la classe hypertrophique et non-hypertrophique.

classification, nous avons procédé en deux temps, en commençant tout d'abord par un test de Mann-Whitney-Wilcoxon. Il s'agit d'un test non-paramétrique qui nous permet d'évaluer la significativité de la discrimination des distributions de valeurs de caractéristiques entre les classes HT et NHT, sans faire d'hypothèse sur ces distributions. Après cette étape, le nombre de caractéristiques est réduit à 112.

Comme mentionné précédemment, nous avons utilisé la méthode "wrapper" qui relie la sélection à la performance donnée par la méthode de classification. L'approche "wrapper" consiste à

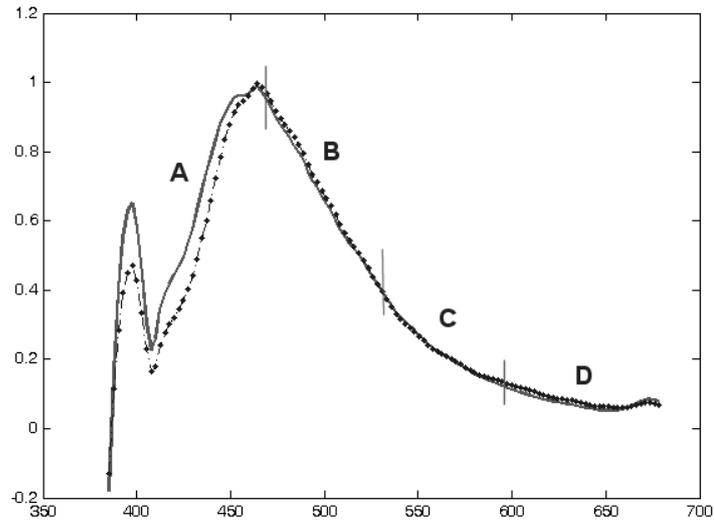


FIGURE 4.19 – Comparaison par morceaux des spectres moyens (excités à $360nm$ et mesurés au 5^{ime} CEFs) pour les tissus HT et NHT. Les corrélations entre les spectres moyens (HT et NHT) pour ces 4 sous-bandes sont respectivement : $r_A = 0,943$, $r_B = 0,999$, $r_C = 0,999$, $r_D = 0,866$. On voit bien que les spectres diffèrent plus pour les sous-bandes A ($385 - 456nm$) et C ($606 - 680nm$) où les valeurs de corrélation sont relativement plus faibles.

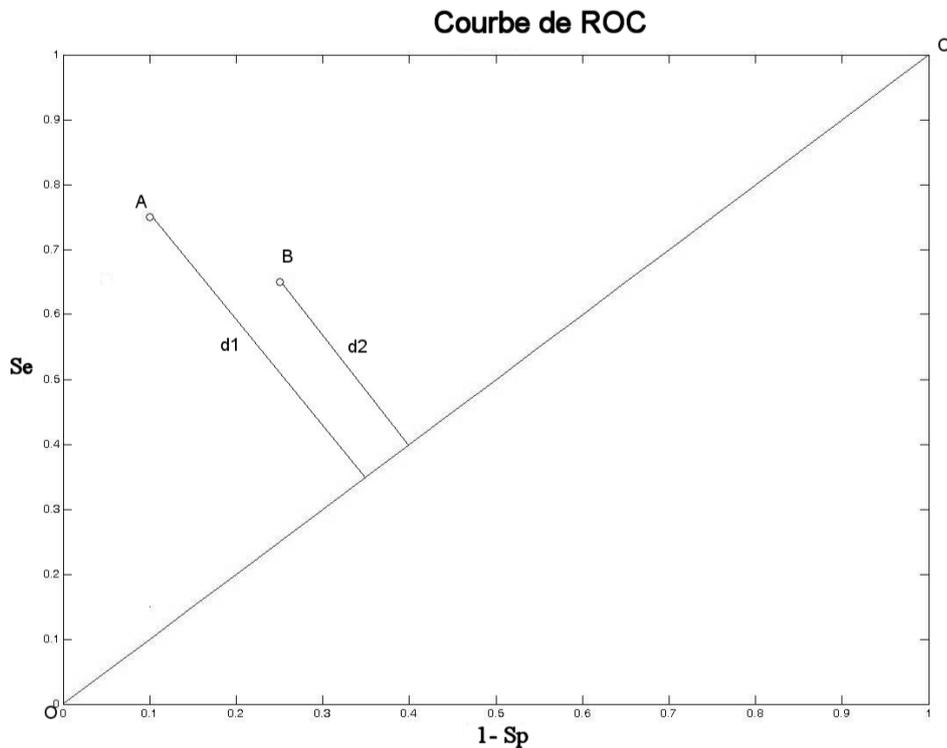


FIGURE 4.20 – Les efficacités de deux caractéristiques C_A et C_B en termes de classification sont représentées par les distances (d_1 et d_2) entre leurs points (A et B) sur le graphique de ROC et la ligne diagonale liant les points C et O.

optimiser un critère de performance en présentant à la méthode d'apprentissage différents jeux de solutions. Dans notre cas, la performance de classification de chaque caractéristique a été évaluée en utilisant ses coordonnées sur le graphe de ROC (cf. Fig. 4.20). Une caractéristique est d'autant plus discriminante qu'elle est plus proche du coin en haut à gauche du graphe, donc que la distance (d_1 pour le point A dans la figure) est plus grande entre ce point et la ligne diagonale (OC). En fonction de cette distance, nous avons rangé les caractéristiques pré-sélectionnées en ordre décroissant de performance discriminante. Puis, la sélection a commencé par méthode "forward" décrite dans la section 4.1.2.3. Les caractéristiques qui, lors de leur introduction dans le jeu, entraînent une augmentation de la distance sont retenues. Après la sélection "forward", une élimination de caractéristiques (parmi celles retenues) de type "backward" est effectuée. Si le retrait d'une caractéristique du jeu augmente la distance ROC, celle-ci est éliminée définitivement.

4.2.4 Classification supervisée

Comme mentionné précédemment, nous avons choisi de comparer les performances diagnostiques de 3 méthodes de classification (k-ppv, RNA et ADL) appliquées (individuellement ou en combinaison) à nos données pour distinguer les tissus hypertrophiques de ceux non-hypertrophiques.

Avec la méthode des k-ppv, nous avons testé plusieurs valeurs de k ($k = 1, 3, 5$) afin de définir le meilleur choix pour notre application. Ce choix est un compromis entre la variabilité associée à une faible valeur de k et le lissage de la frontière des classes par une grande valeur de k . Pour développer le modèle ADL, nous avons adopté une fonction quadratique dans le but de traiter des problèmes non-linéaires. Quant au réseau de neurones artificiels, nous avons utilisé un réseau en 3 couches. Le nombre des entrées du réseau correspond à celui des variables, et est augmenté ou diminué au fur et à mesure de la procédure de sélection "forward-backward". Le nombre de sorties reste toujours à un, suffisant pour représenter l'état binaire des tissus pour deux classes. Ceci nous permet de définir en même temps le jeu optimal de caractéristiques et le meilleur modèle pour la classification pendant la sélection. En outre, pour éviter tout problème de sur-apprentissage, nous adoptons un nombre "d'epochs" (nombre de fois d'une même donnée présentée à l'entrée du réseau) égal à 100 et un taux d'erreur tolérée de 0.01.

Les modèles développés à partir de ces trois méthodes sont utilisés pour la classification finale. Afin d'évaluer leurs performances pour la classification des tissus HT et NHT sans biais, nous avons utilisé une méthode de validation croisée "Leave-One-Out". Un élément est retiré du jeu chaque fois pour le test de performance et le reste de l'échantillon entraîne le modèle. Si le modèle développé réussit à classer le sujet exclu, on note 1, sinon 0. Le processus est répété de sorte que chaque sujet soit utilisé pour le test de l'algorithme. La performance globale est donnée par le taux de sujets bien classés ($N_{reussis}/N_{total}$). Pour tester la robustesse de chaque algorithme, une autre méthode de validation, avec un plus grand biais d'estimation, est appliquée : 66% de l'échantillon de chaque classe est tiré au hasard pour l'entraînement du modèle. Ensuite, le modèle développé est appliqué sur le reste de l'échantillon pour valider la performance finale. celle-ci est évaluée par le taux de réussite moyen pour 500 répétitions de l'algorithme. Par ailleurs, pour la méthode RNA, nous avons utilisé le réseau à l'issue de l'étape de sélection pour classer 30% des sujets, afin de limiter le problème de surapprentissage auquel la méthode RNA est sensible.

4.3 Résultats et Discussion

4.3.1 Performances comparées des différents classifieurs testés

TABLE 4.1 – Valeurs de S_e et S_p obtenues pour les caractéristiques sélectionnées en utilisant classifieur k-ppv avec valeur de k différentes. k est le nombre de voisins utilisé

Valeur de k	CEFS	$\lambda_{ex}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$	Sensibilité	Spécificité
1	429	368	484 – 531	94%	90%
	438	410	528 – 599		
	453	420	532 – 591		
	672	410	626 – 648		
3	438	390	490 – 525	78%	81%
	672	410	626 – 648		
5	696	390	429 – 439	78%	90%
	1094	390	441 – 463		
	696	410	626 – 648		
	438	440	512 – 522		

Dans le cas du classifieur k-ppv, la performance de classification varie en fonction de la valeur de k . Pour notre jeu de données, elle est maximale lorsque $k = 1$. Donc, nous avons pris $k = 1$.

A l'issue de la sélection par méthode "forward-backward", les caractéristiques optimales retenues pour la classification des tissus hypertrophiques et non-hypertrophiques par chacune des 3 méthodes de classification sont regroupées dans le tableau(4.2). Nous pouvons constater que ces trois méthodes utilisent un nombre identique de caractéristiques, ce qui tend à valider l'efficacité de la méthode de sélection en termes de réduction du nombre de caractéristiques. Une de ces caractéristiques (pente du spectre d'intensité d'AF émise dans la bande 626 – 648nm et excitation à 410nm), est commune à ces trois méthodes utilisées. Elle présente donc un intérêt particulier en termes de robustesse de classification, quelque soit la méthode utilisée, et directement liée au phénomène hypertrophique. On peut noter que les méthodes RNA et ADL partagent 3 caractéristiques communes et 1 seule avec la méthode k-ppv. Ceci peut être dû au fait que la méthode k-ppv classe un sujet selon la distribution locale de ses voisins, alors que les deux autres méthodes utilisent plutôt toutes les données dans le jeu d'apprentissage pour développer le modèle de classification.

Le tableau (4.3) montre les paires de sensibilité et spécificité calculées avec chaque classifieur. La méthode k-ppv donne la meilleure performance globale ($S_e = 90,5\%$ et $S_p = 94,5\%$), alors que le RNA est relativement moins performant (surtout en spécificité $S_p < 83,1\%$). Ces résultats nous semble raisonnables, car comme mentionné dans la section 4.1.2.4, la méthode k-ppv, exploitant une distribution locale des voisins, fonctionne bien lorsque la taille du jeu de données est petite. Le réseau de neurones basé sur une solution d'optimisation a besoin généralement de plus d'éléments pour établir un modèle optimal. Notre protocole expérimental nous a permis de ne disposer que de 44 sites de mesure. Donc, utiliser la méthode k-ppv nous semble plus approprié pour notre étude. En revanche, le réseau de neurones possède le potentiel de garder, voire de faire évoluer, sa performance, si la taille de l'échantillon augmente [Wallace *et al.*, 2000b]. Donc, lorsqu'un plus grand nombre de sujets sera présenté au système, au fur et à mesure d'autres résultats expérimentaux, le RNA pourrait fournir des résultats diagnostiques plus précis.

TABLE 4.2 – Caractéristiques sélectionnées pour la classification finale

Méthode de classification	CEFS (μm)	$\lambda_x(nm)$	$\lambda_e(nm)$
k-ppv	429	368	484 – 531
	438	410	528 – 599
	453	420	532 – 591
	672	410	626 – 648
RNA	696	400	478 – 488
	696	410	650 – 660
	696	410	626 – 648
	438	430	607 – 617
ADL	429	390	429 – 438
	696	410	650 – 660
	696	410	626 – 648
	438	430	607 – 617

TABLE 4.3 – Performance générale des 3 méthodes testées pour la classification des tissus hypertrophiques et non-hypertrophiques

	k-ppv	RNA	ADL
sensibilité	90.5%	88.4%	85.7%
spécificité	94.4%	82.7%	94.4%

En outre, un des objectifs de cette étude est de chercher à associer une interprétation biologique aux caractéristiques spectrales sélectionnées pour la classification.

Le premier constat sur les caractéristiques extraites pour ces trois méthodes de classification est qu’aucune d’entre elles n’est liée aux spectres de RD. Implicitement, la variation de l’absorption et de la diffusion de la lumière par les chromophores ne contribue pas à une distinction significativement utile à la classification des tissus hypertrophiques et non-hypertrophiques. En effet, l’inflammation, première phase de la cicatrisation, survient à la fois sur les cicatrices hypertrophiques et non-hypertrophiques. Cette phase cicatricielle ayant une période normale entre 4 et 8 semaines selon les sujets est plus longue que le délai d’attente pour les mesures spectroscopiques, ce qui laisse une quantité plus ou moins importante de sang sur les sites de mesure. Ici, la présence de sang est une caractéristique plutôt liée au degré inflammatoire qu’à l’hypertrophie, donc le spectre RD, en tant que mesure de l’absorption lumineuse par le sang, n’est pas aussi discriminant pour la classification. A l’extrême, si la concentration de sang est trop importante, les intensités mesurées sont tellement faibles que les spectres peuvent être inexploitable. Pour résoudre ce problème, un algorithme permettant d’éliminer automatique les spectres inexploitable a été développé, à partir de mesures de corrélations et l’ensemble des spectres de même classe (cf. Section 4.2.3.2).

Pour les caractéristiques calculées à partir des spectres d’AF, certaines longueurs d’onde d’excitation et d’émission peuvent être reliées aux divers fluorophores présents dans la peau. Le tableau 4.4 résume les pics ou les bandes spectrales d’émission des fluorophores principalement rapportés dans les études sur la peau. Les longueurs d’onde d’excitation utilisées dans les études citées sont toutes dans les mêmes bandes que celles que nous avons utilisée.

TABLE 4.4 – Rappel des pics et bandes spectrales d’émission de plusieurs fluorophores rapportés dans les études sur la peau pour les longueurs d’onde d’excitation liées à nos caractéristiques extraites

Excitation $\lambda_{ex}(nm)$	370	410	420	couche histologique
NADH [Sokolov <i>et al.</i> , 2002] [Palero <i>et al.</i> , 2006] [Wagnieres <i>et al.</i> , 1998]	450-470	450-470	450-470	cellules
Flavine [Wagnieres <i>et al.</i> , 1998]	530-550	530-550	530-550	
Porphyrine [Wagnieres <i>et al.</i> , 1998]		635,670	635,670	
Lipopigment [Wagnieres <i>et al.</i> , 1998]	560	560	560	
Collagène [Stamatas <i>et al.</i> , 2006] [Sokolov <i>et al.</i> , 2002]	460	490	490	derme
Elastine [Stamatas <i>et al.</i> , 2006] [Benninger <i>et al.</i> , 2005]	470	480	480	
Kératine [Palero <i>et al.</i> , 2006] [Pena <i>et al.</i> , 2005] [Kollias <i>et al.</i> , 2002]	475		500	épiderme

Les caractéristiques finalement sélectionnées (Table 4.2) montrent que l’excitation de 410nm contribue le plus à la classification. Sauf pour la méthode k-ppv, toutes les caractéristiques discriminantes issues d’une excitation à 410nm sont liées à la bande d’émission entre 620 et 670nm, une bande d’émission spécifique pour les porphyrines (Table (4.4)). Ceci nous permet de penser que l’hypertrophie peut provoquer une variation de concentration des porphyrines pendant la cicatrisation. Les porphyrines sont impliquées dans le processus de formation de l’hème, un cofacteur contenant un atome de fer servant à accueillir le dioxygène O_2 et contenu dans des protéines, telle que l’hémoglobine. Une augmentation de l’hème liée à la vascularisation de carcinomes a été confirmée par des études ([Sanamura *et al.*, 2003]) qui utilisent la fluorescence émise par les porphyrines comme marqueur pour la détection de cancers. En référence à ces connaissances *a priori*, les variations d’intensité d’AF émise dans la bande 620 – 720nm (porphyrine) pourrait donc être reliée à la néovascularisation plus importante dans les tissus cicatriciels hypertrophiques. En effet, comme mentionné dans la section 1.2.4.2, l’hypertrophie cicatricielle est une cicatrice proliférant avec hyperémie dans la couche dermique qui présente une plus grande quantité d’hème contenue dans l’hémoglobine. Ce point de vue n’est pas contradictoire avec ce qu’on a prouvé pour expliquer la non-implication de caractéristiques de RD dans la classification. En fait, dans la section

1.3.1.2, nous avons mentionné que les mesures en AF et RD sont toutes deux sensibles aux variations liées à la vascularisation, mais liées à des aspects différents : les modifications structurales pour la RD, et la composition biochimique pour l'AF. Dans le cas de l'hypertrophie cutanée, si les changements biochimiques sont plus significatifs que les modifications structurales, les informations extraites des spectres d'autofluorescence peuvent être plus utiles dans la classification.

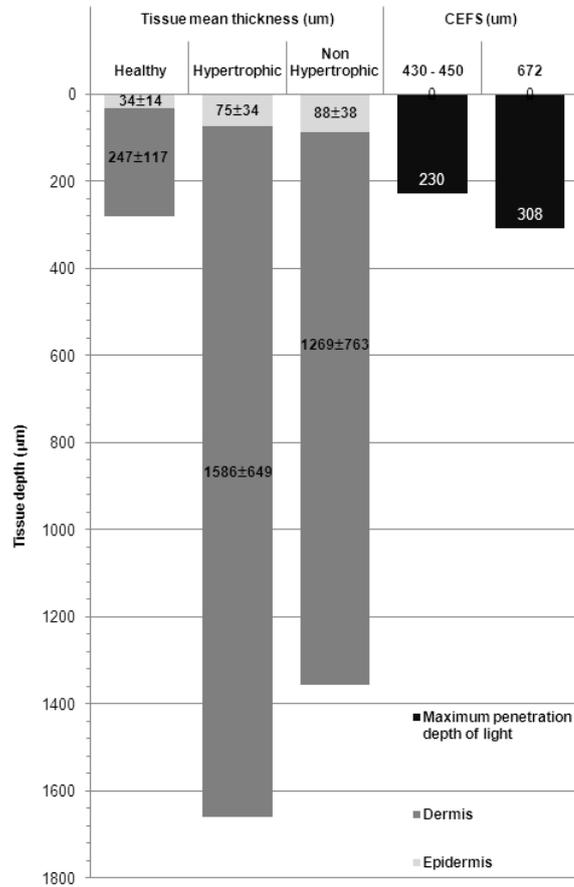


FIGURE 4.21 – Schéma illustrant les profondeurs d’exploration permises par les CEFS 440µm et 670µm pour une excitation de 420nm, en correspondance avec les épaisseurs profondes moyennes ± EC des couches explorées pour les tissus cutanés (sains, cicatriciels hypertrophiques et non-hypertrophiques) de notre étude

Sachant que les spectres d’autofluorescence mesurés sont influencés à la fois par la contribution des fluorophores et par l’atténuation d’intensité due à l’absorption et à la diffusion par les chromophores [Richards-Kortum *et al.*, 1991], nous pensons qu’il peut être intéressant de trouver une interprétation liée au changement structural du tissu. En observant les caractéristiques liées à la porphyrine (Table 4.4), nous remarquons qu’elles sont toutes extraites des spectres mesurés à une distance interfibrilles de 696µm. Tout d’abord, cette distance assez grande nous permet d’explorer une zone tissulaire plus profonde, qui atteint la couche dermique (pour la peau des oreilles de lapins de notre étude) où se trouvent principalement des vaisseaux sanguins. Ensuite, la modification structurale due à la prolifération hypertrophique fait varier cette profondeur, ce qui rend différentiable la quantité de fluorescence détectée. La figure 4.21 montre les épaisseurs moyennes (± écart-type) pour les tissus sains, hypertrophiques et non-hypertrophiques. Les profondeurs de

pénétration maximale pour les CEFS utilisées et par rapport à la lumière d'excitation en dessous de $420nm$ sont calculées par l'équation 2.4 que nous avons introduite dans la section 2.1.2.1 (p. 47). Pour le tissu sain, les CEFS utilisées permettent l'exploration d'une grande partie de l'épaisseur du derme. Lors de la cicatrisation, l'épaisseur de l'épiderme a tendance à augmenter, ce qui modifie la portion de zone explorée en faveur de l'épiderme. Comme mentionné dans la section précédente, les couches de derme et d'épiderme constituées de composantes biochimiques diverses donnent chacune des profils différents de spectres d'intensité d'AF. Etant donné que la profondeur d'exploration change, ce phénomène peut apparaître sur les spectres mesurés, car la contribution spectrale par des fluorophores contenus dans ces deux couches a changé. La figure 4.21 montre aussi que l'épaisseur d'épiderme est plus grande pour les tissus non-hypertrophiques que pour ceux hypertrophiques ($88 \pm 38\mu m$ vs $75 \pm 34\mu m$). Ainsi, une plus grande partie de derme contribue à l'émission d'autofluorescence mesurée sur le tissu hypertrophique. Cette observation est en cohérence avec les remarques précédentes concernant la fluorescence des porphyrines, car l'hème est trouvé principalement dans la couche dermique.

4.3.2 Classification combinée et fusion de décision

Avant de combiner les classifieurs testés, nous avons dû décider quelles caractéristiques optimales combinées devaient être utilisées pour la classification. Sachant que la redondance ou le manque de caractéristiques peut entraîner une diminution de performance de classification, nous avons effectué une comparaison de deux options possibles sur chaque classifieur individuellement : réunir toutes les caractéristiques optimales ou ne prendre que celles communes pour ces 3 classificateurs. Selon les résultats obtenus, utiliser toutes les caractéristiques nous a permis d'obtenir de meilleures performances de classification pour les méthodes RNA et ADL, mais pas pour k-ppv. Cette observation est en cohérence avec le fait que la méthode k-ppv a tendance à devenir moins efficace lorsqu'un nombre important de caractéristiques parasites est impliqué dans le modèle (cf. la section 4.1.2.4).

TABLE 4.5 – Valeurs moyennes de sensibilité et de spécificité obtenues pour les 3 méthodes de classification en utilisant toutes les caractéristiques optimales ou seulement les caractéristiques communes

	k-ppv		RNA		ADL	
	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp
Union de toutes les caractéristiques	56%	72%	100%	100%	72%	81%
Caractéristiques Communes	78%	57%	56%	62%	72%	57%

Pour combiner les trois méthodes de classification, une règle de décision doit être définie afin de synthétiser les résultats des 3 classifieurs pour donner une décision de classe finale. Selon [Andrea Sboner *et al.*, 2003], il est préférable que le classifieur combiné soit le plus sensible possible plutôt que le plus spécifique. En effet, une méthode diagnostique sensible a plus de chance de détecter des sujets malades qui peuvent être éventuellement soumis à une autre méthode pour la vérification. Une méthode plus spécifique, mais moins sensible, aura tendance à "négliger" les sujets malades qui évoluent en situation plus grave. A partir de cette idée, nous avons créé notre règle de décision : si au moins une des 3 méthodes seule classifie un sujet comme hypertrophique, la décision finale est pour l'hypertrophie. En classifiant les sujets à nouveau avec cette règle, nous obtenons une sensibilité de 100% et une spécificité de 57%.

4.4 Conclusion et perspectives

Après une étude bibliographique sur le traitement des données en spectroscopie bimodale, nous avons développé une série d’algorithmes afin d’effectuer une caractérisation des tissus hypertrophiques et non-hypertrophiques à l’aide d’une classification automatique de caractéristiques spectroscopiques issues des mesures en AF et en RD. Les algorithmes développés comprennent :

- des procédures de prétraitement sur les spectres bruités (filtrage, correction de forme spectrale et normalisation) ;
- la détection et l’élimination des spectres aberrants qui peuvent éventuellement influencer le développement des algorithmes de traitement suivants et fausser les résultats finaux ;
- l’extraction de caractéristiques liées aux différences de forme spectrale entre les classes de spectres ;
- la sélection de caractéristique, incluant des tests statistiques et des algorithmes de sélection exhaustive (de type “wrapper”), en vue de réduire la taille du jeu initial de caractéristiques en quelques uns tout en préservant ou en améliorant la performance du classifieurs utilisé.

Nous avons comparé l’efficacité de 3 méthodes de classification (k-ppv, ADL et RNA) pour discriminer les tissus hypertrophiques et non-hypertrophiques. Selon les résultats obtenus, la méthode des k-ppv donne la meilleure performance globale ($S_e = 90,5\%$ et $S_p = 94,5\%$). Bien que le RNA soit relativement moins performant ($S_e = 88,4\%$ et $S_p = 82,7\%$) à cause d’une petite taille du jeu d’entraînement, il possède le potentiel de garder une performance stable, voire d’accroître la performance si la taille de l’échantillon augmente.

En outre, nous avons combiné ces trois méthodes de classification dans un diagnostic “synthétique” avec la sensibilité mise en priorité. Alors que nous avons eu une sensibilité à 100%, la sensibilité était beaucoup plus faible ($S_p = 57\%$).

L’originalité des algorithmes développés réside dans l’extraction automatique des caractéristiques (à la base d’une comparaison par morceaux des valeur de corrélation entre les classes de spectres) et la réduction des données par une sélection exhaustive des caractéristiques spectroscopiques. En effet, par rapport à d’autres méthodes de la réduction de données (comme ACP [Heintzelman *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2005; Diaz, 2009]), notre méthode permet de trouver des caractéristiques interprétables en terme de phénomènes photo-biologiques liées aux différents états tissulaires (cf. p.119).

Selon les résultats obtenus par notre méthode de sélection/classification, aucune caractéristique utilisée en classification n’est liée à la mesure de RD. Ce constat nous indique que la variation de l’absorption et de la diffusion de la lumière par les chromophores ne contribue pas à une distinction significativement utile à la classification des tissus hypertrophiques et non-hypertrophiques. Les caractéristiques sélectionnées pour la classification sont, quelque soit le classifieur utilisé, extraites de la bande d’émission d’AF 620 – 670nm (sous excitation à 410nm). En référence à la bibliographie (les porphyrines contribuent principalement à l’émission de fluorescence dans cette bande), nous concluons que l’hypertrophie peut provoquer une variation significative de la concentration des porphyrines pendant la cicatrisation.

En considérant les résultats prometteurs obtenus dans cette étude, les travaux réalisés (pré-traitement spectral et traitement de données) mériteraient d'être étendus à un jeu de données plus grand. L'évolution des algorithmes peut se faire en :

- testant d'autres méthodes de sélection des caractéristiques et de classification ;
- incorporant des algorithmes de correction afin de diminuer l'influence des chromophores sur les spectres d'AF et décomposer les spectres corrigés en plusieurs courbes élémentaires afin de quantifier la concentration de chaque fluorophore individuellement.

Conclusion générale et Perspectives

Les méthodes de spectroscopie optique multi-modalités ont prouvé leur efficacité en caractérisation tissulaire *in vivo* au travers des travaux de recherche cités dans la littérature et ceux effectués au sein de notre laboratoire. L'objectif est de fournir une méthode diagnostique simple, non-invasive et objective pour caractériser les tissus biologiques, ou guider les biopsies.

Dans le premier chapitre de la présente thèse, nous avons tout d'abord présenté les principes physiques sur lesquelles sont basées les méthodes spectroscopiques (SAF, SRD et SDS) largement utilisées dans la littérature. Les avantages de ces méthodes spectroscopiques sont présentés respectivement au contexte clinique de notre étude sur les tissus cicatriciels hypertrophiques.

L'étude expérimentale a été conduite pendant la première année de thèse en collaboration avec une chirurgienne plastique désirant tester l'efficacité du *Tacrolimus*® dans le traitement des cicatrices hypertrophiques. Par analogie aux tissus cancéreux, la cicatrice hypertrophique correspond à un développement excessif et non-régularisable du collagène à cause d'un déséquilibre du mécanisme cicatriciel. Elle est considérée comme une tumeur dermique fibreuse bénigne [Marneros and Krieg, 2004] qui pose des problèmes esthétiques et fonctionnels selon le site anatomique. Dans certaines conditions, elles vont conduire à des problèmes plus graves comme des risques de cancers, telle que le sarcome Kaposi [Oluwasanmi *et al.*, 1969]. Dans le cadre du développement d'un instrument de spectroscopie multi-modalités pour le diagnostic de tissus cancéreux, nous avons mise en place cette collaboration pour évaluer l'efficacité de notre système dans la caractérisation d'un tissu tumoral bénin et effectuer quelques modifications techniques pour un champ d'application élargi.

Avant l'expérimentation, le système a été amélioré sur plusieurs points techniques pour augmenter l'efficacité d'acquisition spectrale. Ces points, détaillés dans le chapitre 2, comprennent : l'augmentation de puissance lumineuse pour les excitations d'AF ; la réduction du temps de mesure en RD ; l'automatisation complète du système avec une interface logicielle unique ; l'intégration matérielle du système dans un rack mobile. Le nouveau système réalisé est un outil programmable et automatique d'excitation multiple (en AF et RD), qui possède une certaine mobilité pour une utilisation quotidienne en clinique. Néanmoins, l'intégration du système dont les travaux étaient confiés à un sous-traitant industriel (Kaluti, Paris) a été retardée d'un an et demi, ce qui fait qu'un test préliminaire en clinique ne pouvait plus être envisagé pour la période de la thèse. En revanche, après l'amélioration du système d'instrumentation, ce dernier a dû être recalibré pour assurer la fiabilité et la comparabilité des données expérimentales acquises. Un protocole proche de celui utilisé par [Diaz, 2009] a été établi pour calibrer notre système et aussi pour corriger nos spectres acquis pendant l'expérimentation.

D'après la littérature, l'oreille de lapin Néo-Zélandais est le seul modèle disponible pour une

étude *in vivo* de cicatrice hypertrophique. Face aux difficultés posées par ce modèle (taux limité de création de cicatrices hypertrophiques et impossibilité d’anesthésie pendant la mesure spectroscopique), nous avons défini un protocole expérimental spécifique (cf. Chapitre 3) permettant de tester notre médicament et d’assurer la répétabilité de nos mesures spectroscopiques. Pour cette étude nous avons acquis des spectres d’intensité d’AF à 9 longueurs d’onde d’excitation centrées à 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430 et 440nm, et de RD à large bande (350 – 750nm), à 6 distances inter-fibres (CEFS = 429, 438, 453, 672, 696 et 1094 μ m). Ainsi, chaque caractéristique spectrale extraite des spectres mesurés à une longueur d’onde d’excitation et une distance inter-fibre données cible un type de fluorophores/chromophores à une certaine profondeur dans le tissu. En exploitant ces mesures en multi-excitations, l’objectif est d’une part, d’augmenter l’efficacité du diagnostic de tissus hypertrophiques et non-hypertrophiques et d’autre part, de déterminer une relation entre le phénomène hypertrophique et la variation spectrale.

Après la mesure spectroscopique, tous les sites cicatriciels ont été prélevés pour une analyse histologique sous microscope. Selon les résultats obtenus, les tissus prélevés de cicatrices hypertrophiques ont été caractérisés par un développement excessif et une structure organisée des réseaux de collagène et d’élastine dans la couche dermique, augmentant significativement l’épaisseur tissulaire. Selon ces observations, nous avons donc classifié les tissus prélevés en deux classes (cicatrices hypertrophiques et non-hypertrophiques) par deux critères histologiques : l’indice d’élévation cicatricielle et la densité cellulaire.

L’objectif de nos travaux de thèse dans cette étude est d’effectuer une classification automatique des tissus hypertrophiques et non-hypertrophiques en fonction des caractéristiques spectroscopiques. Pour ce faire, nous avons développé un algorithme original d’extraction de caractéristiques discriminantes en comparant les spectres moyens des deux classes tissulaires et sur la base de corrélations par segments de spectres. La longueur des segments peut être réglée de façon à s’adapter aux différentes bandes caractéristiques citées dans la littérature. Pour une recherche plus exhaustive, nous avons adopté des longueurs de segments entre 4,05 et 67,5nm. Les caractéristiques trouvées par cette méthode ont été soumise à une sélection par “wrapper” (méthode “forward-backward”) pour éliminer les caractéristiques redondantes et non-significatives. Finalement, nous avons comparé 3 méthodes de classification (k-ppv, RNA et ADL) pour différencier les sites hypertrophiques et non-hypertrophiques à partir des caractéristiques extraites/sélectionnées. Selon les résultats que nous avons obtenus, la méthode des k-ppv plus adaptée à un jeu de données avec un échantillon d’individus de taille limitée donne la meilleure performance en terme de sensibilité (90,5%) et de spécificité (94,4%).

Les perspectives de travaux à suivre concernent trois aspects :

- En ce qui concerne l’instrumentation, l’intégration d’une modalité temporelle au présent système est un axe d’intérêt. En effet, comme présenté dans la section 1.3 (p. 24) du chapitre 1, la mesure temporelle apporte à la fois des informations qualitatives liées aux caractéristiques intrinsèques des fluorophores (durée de vie) et quantitatives liées aux temps de vol des photons diffusés dans le milieu biologique. Ces informations complémentaires permettraient de caractériser plus finement les tissus précancéreux.

En revanche, à travers l’expérimentation que nous avons menée, nous avons mesuré qu’il est très délicat d’obtenir une identité parfaite entre les sites prélevés et mesurés en spectroscopie. [Georgakoudi *et al.*, 2002] a mentionné que l’incohérence des sites de mesure et de

prélèvement peut engendrer des décisions différentes pour la classification supervisée. Ainsi, l'utilisation de la spectroscopie optique fibrée en clinique pour guider la biopsie impose une précision telle que le site de biopsie ne dévie pas de celui repéré par la spectroscopie. Donc, une réflexion est engagée pour renforcer l'assurance de colocalisation entre les sites de prélèvement et de mesure. Une solution est d'intégrer un système mécanique de prélèvement, comme celui de "Biopsy Punch" (NA-2105-030, medical solution gmbh, Rothusstrasse 23, 6331 Hünenberg) ou "Biopsie Punch stériles KAI" (*LABODERM*®, 14 rue Ferdinand de Lesseps, 95190 Goussainville) à la sonde optique fibrée, ce qui permet d'enlever directement le tissu après la mesure spectroscopique. Nous pensons que cette conception apporte une fiabilité supplémentaire à l'étude en spectroscopie, parce qu'elle diminue des erreurs de classification liées à la déviation du site de prélèvement et simplifie les procédures expérimentales.

- En ce qui concerne l'étude expérimentale, le système développé jusqu'à présent est prêt pour une utilisation en clinique. Une étude clinique pour la détection de tissus cutanés pré-cancéreux sur patient est envisageable, sous réserve qu'un protocole approuvé par les instances hospitalières soit bien mis en place pour assurer la gestion efficace des patients et la conformité aux conditions d'hygiène et sécurité requises. Cette étude pourrait commencer dans les mois à venir avec le soutien du CAV et la collaboration étroite existant.
- En ce qui concerne le développement algorithmique, il serait pertinent de tester nos méthodes de classification sur un ensemble de données plus grand (plus grande taille d'échantillon) pour fiabiliser la sensibilité et la spécificité pour le diagnostic général. Par ailleurs il pourrait être envisagé de développer des algorithmes complémentaires pour diminuer l'influence des chromophores sur les spectres d'autofluorescence et pour décomposer ces derniers en spectres élémentaires qui correspondent chacun à la distribution d'un fluorophore.

Bibliographie

- [Aggarwal and Yu, 1999] Charu C. Aggarwal and Phillips S. Yu. Data mining techniques for associations, clustering and classification. *Lecture Notes in Artificial Intelligence, Proceedings of the Third Pacific-Asia Conference on Methodologies for Knowledge Discovery and Data Mining*, 1574 :13–23, 1999.
- [Akaishi *et al.*, 2008] Akaishi, Satoshi, Akimoto, Masataka, Ogawa, Rei, Hyakusoku, and Hiko. The relationship between keloid growth pattern and stretching tension : Visual analysis using the finite element method. *Annals of Plastic Surgery*, 60(4) :445–451, 2008.
- [American Osteopathic College Of Dermatology, 2010] AOCD American Osteopathic College Of Dermatology. Dermatologic disease database, 2010.
- [Anderson and Parrish, 1981] R. Rox Anderson and John A. Parrish. The Optics of Human Skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 77(1) :13–19, 1981.
- [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.
- [Andrea Sboner *et al.*, 2003] Claudio Eccher Andrea Sboner, Enrico Blanzieri, Paolo Bauer, Mario Cristofolini, Giuseppe Zumiani, and Stefano Forti. A multiple classifier system for early melanoma diagnosis. *Artificial Intelligence in Medicine*, 27(1) :29–44, 2003.
- [Anidjar *et al.*, 1998] M. Anidjar, O. Cussenot, S. Avrillier, D. Ettore, 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.
- [Arridge *et al.*, 1992] S.R. Arridge, M. Cope, and D.T. Delpy. Theoretical basis for the determination of optical pathlengths in tissue. *Physics in Medicine and Biology*, 37 :1531–1560, 1992.
- [Backman *et al.*, 1999] V. Backman, R. Gurjar, K. Badizadegan, I. Itzkan, R.R. Dasari, L.T. Perelman, and M.S. Feld. Polarized Light Scattering Spectroscopy for Quantitative Measurement of Epithelial Cellular Structure In Situ. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 5(4) :1019–1026, 1999.
- [Bellman, 1961] R. Bellman. *Adaptative Control Processes : A Guided Tour*. Princeton University Press, 1961.

- [Benninger *et al.*, 2005] R. Benninger, O. Hofmann, J. McGinty, J. Requejo-Isidro, I. Munro, M. Neil, A. deMello, and Paul French. Time-resolved fluorescence imaging of solvent interactions in microfluidic devices. *Optics Express*, 13(16) :6275–6285, 2005.
- [Berman *et al.*, 2009] Brian Berman, Whitney Valins, Sadegh Amini, and Martha H Viera. Keloid and hypertrophic scar@MISC. eMedicine, June 2009.
- [Bernard Panneton and Longchamps, 2008] Serge Guillaume Bernard Panneton, Jean-Michel Roger and Louis Longchamps. Effects of preprocessing of ultraviolet-induced fluorescence spectra in plant fingerprinting applications. *Applied Spectroscopy*, 62(7) :747–752, 2008.
- [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.
- [Bissonnette *et al.*, 1998] Robert Bissonnette, Haishan Zeng, David I. McLean, William E. Schreiber, Diane L. Roscoe, and Harvey Lui. Psoriatic plaques exhibit red autofluorescence that is due to protoporphyrin ix. *Journal of Investigative Dermatology*, 11 :586–591, 1998.
- [Blum *et al.*, 1997] Blum, L. Avrim, and Pat Langley. Selection of relevant features and examples in machine learning. *Artificial Intelligence*, 97(1-2) :245–271, 1997.
- [Bohren and Huffman, 2004] C.F. Bohren and D.R. Huffman. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. Wiley-Vch, 2004.
- [Brancaleon *et al.*, 2001] Lorenzo Brancaleon, Anthony J. Durkinc, John H. Tua, Gregg Menakerb, Jerome D. Fallonb, and Nikiforos Kolliasa. *in vivo* fluorescence spectroscopy of non-melanoma skin cancer. *Photochemistry and Photobiology*, 73(2) :178–183, 2001.
- [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.
- [Brito *et al.*, 2007] Paula Brito, Patrice Bertrand, Guy Cucumel, and Francisco de Carvalho. *Selected Contributions in Data Analysis and Classification (Studies in Classification, Data Analysis, and Knowledge Organization)*. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH. and Co. K., Germany, 2007.
- [Brown *et al.*, 2008] R.J. Brown, M.J. Lee, M. Sisco, J.Y. Kim, N. Roy, and T.A. Mustoe. High-dose ultraviolet light exposure reduces scar hypertrophy in a rabbit ear model. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 121 :1165–1172, 2008.
- [Budnyk, 2009] Ivan Budnyk. *Contribution à une étude et Implantation de Systèmes Intelligents Modulaires Auto-Organisateurs*. PhD thesis, Université Paris-Est, 2009.
- [Chance *et al.*, 1998] B. Chance, M. Cope, E. Gratton, N. Ramanujam, and B. Tromberg. Phase measurement of light absorption and scatter in human tissue. *Review of Scientific Instrument*, 69(10) :3457–3481, 1998.
- [Chang *et al.*, 2002] S. Chang, M. Follen, M. Malpica, U. Utzinger, G. Staerkel, 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.*, 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.

-
- [Coghlan *et al.*, 2000] Lezlee Coghlan, Urs Utzinger, Rebekah Drezek, Doug Heintzelmann, Andres Zuluaga, Carrie Brookner, Rebecca Richards-Kortum, Irma Gimenez-Conti, and Michele Follen. Optimal fluorescence excitation wavelengths for detection of squamous intraepithelial neoplasia : results from an animal model. *Optics Express*, 7(22) :436–446, 2000.
- [Cothren *et al.*, 1990] RM Cothren, R. Richards-Kortum, MV Sivak Jr, M. Fitzmaurice, RP Rava, GA Boyce, M. Doxtader, R. Blackman, TB Ivanc, and GB Hayes. Gastrointestinal tissue diagnosis by laser-induced fluorescence spectroscopy at endoscopy. *Gastrointestinal Endoscopy*, 36(2) :105, 1990.
- [Crowell *et al.*, 2005] Ed. Crowell, Gufeng Wang, Jason Cox, Charles P. Platz, , and Lei Geng. Correlation coefficient mapping in fluorescence spectroscopy : Tissue classification for cancer detection. *Analytical Chemistr*, 77 :1368–1375, 2005.
- [Dash and Liu, 1997] M. Dash and H. Liu. Feature selection for classification. *Intelligent Data Analysis*, pages 131–156, 1997.
- [Dawson *et al.*, 1980] J.B. Dawson, D.J. Barker, D.J. Ellis, E. Grassam, J.A. Cotterill, G.W. Fisher, and J.W. Feather. A theoretical and experimental study of light absorption and scattering by *in vivo* skin. *Physics in Medicine and Biology*, 25 :695, 1980.
- [De Veld *et al.*, 2005] D.C.G. De Veld, M.J.H. Witjes, H.J.C.M. Sterenborg, and J.L.N. Roodenburg. The status of *in vivo* autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology : Review. *Oral Oncology*, 41(2) :117–31, 2005.
- [Diagaradjane *et al.*, 2005] Parmeswaran Diagaradjane, Mohammad A Yaseen, Jie Yu, Michael S Wong, and Bahman Anvari. Autofluorescence characterization for the early diagnosis of neoplastic changes in dmba/tpa-induced mouse skin carcinogenesis. *Lasers Surg Med*, 37(5) :382–395, Dec 2005.
- [Diaz, 2009] G. Diaz. *Spectroscopie optique multi-modalités in vivo : instrumentation, extraction et classification diagnostique de tissus sains et hyperplasiques cutanées*. PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, 2009.
- [Ding *et al.*, 2006] H. Ding, J. L. Lu, W.A. Wooden, P.J.Kragel, and X.H. Hu. Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600nm. *Physics in Medicine et Biology*, 51 :1479–1489, 2006.
- [Domingos, 1999] P. Domingos. The role of occam’s razor in knowledge discovery. *Data Mining and Knowledge Discovery*, 3(4) :409–425, 1999.
- [Drezek *et al.*, 2001] R. Drezek, K. Sokolv, U. Utzinger, I. Boiko, A. Malpica, M. Follen, and R. Richards-Kortum. Understanding the contributions of NADH and collagen to cervical tissue fluorescence spectra : Modeling, measurements, and implications. *Journal of Biomedical Optics*, 6(4) :385–396, 2001.
- [Duda and Hart, 1973] R. Duda and P. Hart. *Pattern classification and scene analysis*. Wiley, 1973.
- [Durand, 2007] A. Durand. *Méthodes de sélection de variables appliquées en spectroscopie proche infrarouge pour l’analyse et la classification de textiles*. PhD thesis, Université de Sciences et Technologies de Lille, 2007.
- [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.

- [Evans *et al.*, 2006] J.A. Evans, J.M. Ponerros, 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.
- [Fisher, 1936] R.A. Fisher. The use of multiple measurement in taxonomic prolem. *Annals of Human Genetics*, 7(2) :179–188, 1936.
- [Forrer *et al.*, 1995] M. Forrer, T. Glanzmann, J. Mizeret, D. Braichotte, G. Wagnieres, H. E. van den Bergh, P. Jichlinski, and H.J. Leisinger. Fluorescence excitation and emission spectra of ala induced protoporphyrin ix in normal and tumoral tissue of the human bladder. *Proceedings of SPIE*, 2324 :84–88, 1995.
- [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.
- [Georgakoudi *et al.*, 2003] Irene Georgakoudi, Jason T. Motz, Vadim Backman, George Angheloiu, Abigail S. Haka, Markus Muller, and Michael S. Feld. *Quantitative Characterization of Biological Tissue Using Optical Spectroscopy*, chapter 31. CRC Press, 2003.
- [Gillies *et al.*, 2000] R. Gillies, G. Zonios, R.R. Anderson, and N. Kollias. Noninvasive diagnosis or oral neoplasia based on fluorecence spectroscopy and native tissue autofluorescence. *Journal of Investigative Dermatology*, 115(4) :704–707, 2000.
- [Gisquet *et al.*, 2011] H. Gisquet, H. LIU, W.C.P.M. Blondel, A. Leroux, F. Guillemin, J.L. Merlin, D. Peiffert, and C. Latarch. Intradermal tacrolimus prevent scar hypertrophy in a rabbit ear model. a clinical, histological and spectroscopical analysis. *Skin Research and Technology*, 17(2) :129–255, 2011.
- [Greivenkamp, 2004] J.E. Greivenkamp. *Field Guide to Geometrical Optics*, volume FG01. SPIE Press, 2004.
- [Gupta *et al.*, 2007] Lalit Gupta, Sarif Kumar Naik, and Srinivasan Balakrishnan. A new feature selection and classification scheme for screening of oral cancer using laser induced fluorescence. *International conference on Medical biometrics*, 2007.
- [Guyon and Elisseeff, 2003] Isabelle Guyon and Andre Elisseeff. An introduction to variable and feature selection. *Journal of Machine Learning Research*, 3 :1157–1182, 2003.
- [Hage *et al.*, 2003] R. Hage, P. R. Galhanone, R. A. Zângaro, K. C. Rodrigues, M. T T Pacheco, A. A. Martin, M. M. Netto, F. A. Soares, and I. W. da Cunha. Using the laser-induced fluorescence spectroscopy in the differentiation between normal and neoplastichuman breast tissue. *Lasers Med Sci*, 18(3) :171–176, 2003.
- [Hamamoto *et al.*, 1996] Yoshihiko Hamamoto, Shunji Uchimura, and Shingo Tomita. On the behavior of artificial neural network classifiers in high-dimensional spaces. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, 18(5) :571–574, 1996.
- [Hart and JiJi, 2002] S.J. Hart and R.D. JiJi. Light emitting diode excitation emission matrix fluorescence spectroscopy. *The Analyst*, 127(12) :1693–1699, 2002.

-
- [Haus *et al.*, 2007] Jacob M. Haus, John A. Carrithers, Scott W. Trappe, and Todd A. Trappe. Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 103(6) :2068–2076, 2007.
- [Heintzelman *et al.*, 2000] D. L. Heintzelman, U. Utzinger, H. Fuchs, A. Zuluaga, K. Gossage, A. M. Gillenwater, R. Jacob, B. Kemp, and R. R. Richards-Kortum. Optimal excitation wavelengths for in vivo detection of oral neoplasia using fluorescence spectroscopy. *Photochem Photobiol*, 72(1) :103–113, Jul 2000.
- [Jackson, 2001] J.D. Jackson. *Electrodynamique classique*. Dunod, 2001.
- [Jacques, 2005] S.L. Jacques. Short Course Notes : Tissue Optics. Spie Education Courses, 2005.
- [Jamison *et al.*, 2006] T Jamison, Joel G Breman, Anthony R Measham, George Alleyne, Mariam Claeson, David B Evans, Prabhat Jha, Anne Mills, and Philip Musgrove. *Disease Control Priorities in Developing Countries, 2nd edition*. the World Bank, 2006.
- [Jurgen, 2004] Friedrich Jurgen. *Spatial Modeling in Natural Sciences and Engineering :Software Development and Implementation*. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH. and Co. K., Germany, 1 edition, 2004.
- [Kamath and Mahato, 2007] Sudha D. Kamath and K. K. Mahato. Optical pathology using oral tissue fluorescence spectra : classification by principal component analysis and k-means nearest neighbor analysis. *Journal of Biomedical Optics*, 12(1) :014028, 2007.
- [Karthikeyan *et al.*, 1999] K. Karthikeyan, V. Masilamani, and S. Govindasamy. Spectrofluorimetric detection of dmba-induced mouse skin carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 5(1) :46–48, 1999.
- [Khorshid, 2005] Faten A. Khorshid. Comparative study of keloid formation in humans and laboratory animals. *Medical Science Monitor*, 11(7) :BR212–219, 2005.
- [Kischer and Brody, 1981] C.W. Kischer and G.S. Brody. Structure of the collagen nodule from hypertrophic scars and keloids. *Scan Electron Microsc*, pages 371–376, 1981.
- [Kischer *et al.*, 1989] C.W. Kischer, J. Pindur, M.R. Shetlar, and C.L. SHETLAR. Implants of hypertrophic scars and keloids into the nude (athymic) mouse : viability and morphology. *Journal of Trauma*, 29 :672–677, 1989.
- [Kloeters *et al.*, 2007] O. Kloeters, A. Tandara, and T.A. Mustoe. Hypertrophic scar model in the rabbit ear : a reproducible model for studying scar tissue behavior with new observations on silicone gel sheeting for scar reduction. *Wound Repair and Regeneration*, 1 :S40–45, 2007.
- [Koenig *et al.*, 1998] 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.
- [Kohavi and John, 1997] Ron Kohavi and George H. John. Wrappers for feature subset selection. *Artificial Intelligence*, 97(1-2) :273–324, 1997.
- [Koller and Sahami, 1996] D. Koller and M. Sahami. Toward optimal feature selection. *Proceedings of International Conference on Machine Learning*, 1996 :284–292, 1996.
- [Kollias *et al.*, 2002] Nikiforos Kollias, George Zonios, and Georgios N. Stamatias. Fluorescence spectroscopy of skin. *Vibrational Spectroscopy*, 28 :17–23, 2002.
- [Kraemer *et al.*, 2006] Kraemer, William J., Zatsiorsky, and Vladimir M. *Science and practice of strength training*. Human Kinetics, 2006.
- [Landais and Jais, 2002] P. Landais and J.P. Jais. Biostatistique clinique, épidémiologie et essais cliniques. Faculté de Médecine Necker, 2002.

- [Lau and Scepanovic, 2009] Condon Lau and Obrad Scepanovic. Re-evaluation of model-based light-scattering spectroscopy for tissue spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 14(2) :024031(1–8), Mar/Apr 2009.
- [Li and Xie, 2005] B.H. Li and S.S. Xie. Autofluorescence excitation-emission matrices for diagnosis of colonic cancer. *World journal of gastroenterology*, 11(25) :3931–3934, 2005.
- [Lohmann and Paul, 1988] W. Lohmann and E. Paul. In situ detection of melanomas by fluorescence measurements. *Naturwissenschaften*, 75(4) :201–202, 1988.
- [Lohmann *et al.*, 1991] W. Lohmann, M. Nilles, and RH Boedeker. In situ differentiation between nevi and malignant melanomas by fluorescence measurements. *Naturwissenschaften*, 78(10) :456–457, 1991.
- [Lorenzo-Navarro, 2001] J.J. Lorenzo-Navarro. *SELECCION DE ATRIBUTOS EN APRENDIZAJE AUTOMATICO BASADA EN TEORIA DE LA INFORMACION*. PhD thesis, Las Palmas de Gran Canaria, 2001.
- [Macomber, 2009] Michelle Macomber. Skin physiology 101 : “a tour through the layers of the skin”. « <http://skinipedia.org/skin-essentials/skin-physiology-101-part2.html> », 2009. SIKI-NIPEDIA.
- [Majumder *et al.*, 2005] Shovan K. Majumder, Nirmalya Ghosh, and Pradeep K. Gupta. Relevance vector machine for optical diagnosis of cancer. *Lasers in Surgery and Medicine*, 36 :320–333, 2005.
- [Mallia *et al.*, 2008] R.J. Mallia, S.S. Thomas, A. Mathews, R. Kumar, P. Sebastian, J. Madhavan, and N. Subhash. Laser-induced autofluorescence spectral ratio reference standard for early discrimination of oral cancer. *Cancer*, 112(7) :1503–1512, 2008.
- [Marchesini *et al.*, 1991] R. Marchesini, M. Brambilla, C. Clemente, M. Maniezzo, A.E. Sichirollo, A. Testori, D.R. Venturoli, and N. Cascinelli. In vivo spectrophotometric evaluation of neoplastic and non-neoplastic skin pigmented lesions. *Photochemistry and Photobiology*, 53 :77–84, 1991.
- [Marin *et al.*, 2005] N.M. Marin, A. Milbourne, H. Rhodes, T. Ehlen, D. Miller, L. Benedet, R. Richards-Kortum, and M. Follen. Diffuse reflectance patterns in cervical spectroscopy. *Gynecologic Oncology*, 99(3) :116–120, 2005.
- [Marin *et al.*, 2006] Nena M. Marin, Nicholas McKinnon, and Calum MacAulay. Calibration standards for multicenter clinical trial of fluorescence spectroscopy for *in vivo* diagnosis. *Journal of Biomedical Optics*, page 13, Jan 2006.
- [Marneros and Krieg, 2004] A.G. Marneros and T. Krieg. Keloids—clinical diagnosis, pathogenesis and treatment options. *Dtsch Dermatol Ges*, 2(11) :9005–13, 2004.
- [Martrenchard-Barra, 2006] S. Martrenchard-Barra. *Lumière Matière*. CNRS, Nature des Sciences, 2006.
- [Massart *et al.*,] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, and J. Smeyers-Verbeke. *Supervised Pattern Recognition*.
- [Mauna Kea Technologies, 2007] Mauna Kea Technologies. Cell vizio. <http://www.maunakeatech.com/med/pulimg>, 2007.
- [Maurice King and C. Peter, 1999] Maurice King and C. Peter. Primary surgery. <http://www.meb.uni-bonn.de/dtc/primsurg/index.html>, 1999.
- [McCulloch and Pitts, 1943] W. S. McCulloch and W. Pitts. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bulletin of Mathematical Biophysics*, 5 :115–133, 1943.

-
- [Mccutchen, 1967] Charles W. Mccutchen. Superresolution in microscopy and the abbe resolution limit. *Journal of the Optical Society of America*, 57(10) :1190, 1967.
- [Michalski *et al.*, 1987] Ryszard S. Michalski, Robert E. Stepp, S.C. Shapiro(ed.), D. Eckroth(ed.), and G.A. Vallasi(ed.). *Clustering in Encyclopedia of Artificial Intelligence*, volume 1. John Wiley and Sons Inc., 1987.
- [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.
- [Mitchell *et al.*, 1986] Tom M. Mitchell, John R. Anderson, Jaime G. Carbonel, and Ryszard Stanislaw Michalski. *Machine Learning : An Artificial Intelligence Approach*. Morgan Kaufmann Publishers Inc., USA, 1986.
- [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.
- [Muller *et al.*, 2003] M.G. Muller, T.A. Valdez, I. Georgakoudi, V. Backman, C. Fuentes, S. Kabanani, 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.
- [Murphy *et al.*, 2005] Bruce W. Murphy, Rebecca J. Webster, Berwin A. Turlach, Christopher J. Quirk, Christopher D. Clay, Peter J. Heenan, and David D. Sampson. Toward the discrimination of early melanoma from common and dysplastic nevus using fiber optic diffuse reflectance spectroscopy. *journal of biomedical optics*, 10(10) :064020, 2005.
- [Na *et al.*, 2000] R. Na, I.M. Stender, L. Ma, and H.C. Wulf. Autofluorescence spectrum of skin : component bands and body site variations. *Skin Research and Technology*, 6(3) :112–117, 2000.
- [Na *et al.*, 2001] Renhua Na, Ida Marie Stender, Mette Henriksen, and Hans Christian Wulf. Autofluorescence of human skin is age-related after correction for skin pigmentation and redness. *Journal of Investigative Dermatology*, 116 :536–540, 2001.
- [Nabil, 1999] Belacel Nabil. *Méthodologie et Applications à l'aide au diagnostic médical*. PhD thesis, Université Libre de Bruxelles, 1999.
- [Olivry, 2009] Etienne Olivry. la peau normale :“un organe multi-fonction”. « <http://dermato-info.fr/article/> », 2009. le site d'information de la Société Française de Dermatologie.
- [Oluwasanmi *et al.*, 1969] J.O. Oluwasanmi, A. Olufemi Williams, and A.F. Alli. Superficial cancer in nigeria. *British Journal of Cancer*, 23(4) :714–728, 1969.
- [OMLC, 2004] Oregon Medical Laser Center OMLC. Optical absorption of melanin. « <http://omlc.ogi.edu/spectra/melanin/index.html> », 2004.
- [Palero *et al.*, 2006] J.A. Palero, H.S. de Bruijn, A. van der Ploeg-van den Heuvel, H.J.C.M. Sterenborg, and H. C. Gerritsen. In vivo nonlinear spectral imaging in mouse skin. *Optics Express*, 14(10) :4395–4402, 2006.
- [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.
- [Pena *et al.*, 2005] A. Pena, M. Strupler, T. Boulesteix, and M. Schanne-Klein. Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy. *Optics Express*, 13(16) :46268–6274, 2005.
- [Perny and Henriet, 1996] P. Perny and L. Henriet. Méthodes multicritères non-compensatoire pour la classification floue d’objets. *LFA’96*, 1996.
- [Pery *et al.*, 2011] Pery, Blondel W. C. P. M., Tindel S., Ghribi M., Leroux A., and Guillemin F. Spectral features selection and classification for bimodal optical spectroscopy applied to bladder cancer *in vivo* diagnosis. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions*, (99) :1–1, 2011.
- [Pery, 2007] E. Pery. *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*. PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, 2007.
- [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.
- [Poneros *et al.*, 2001] J.M. Poneros, 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.
- [Poneros *et al.*, 2002] J.M. Poneros, 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.
- [Péry *et al.*, 2005] E. Péry, W.C.P.M Blondel, J.C. Goebel, J. Didelon, and F. Guillemin. Spectral (optical) and mechanical responses of fresh and cryopreserved issued arteries. In *Proceedings of SPIE*, volume 5695, pages 66–74, 2005.
- [Qu *et al.*, 1995] J. N. Qu, C. MacAulay, S. Lam, and B. Palcic. Laserinduced fluorescence spectroscopy at endoscopy : tissue optics, monte carlo modeling, and in vivo measurements. *Optical Engineering*, 33 :3334–3343, 1995.
- [Ramanujam *et al.*, 1994] N. Ramanujam, M.F. Mitchell, A. Mahadevan, S. Warren, S. Thomsen, E. Silva, and R. Richards-Kortum. In vivo diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser-induced fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(21) :10193–10197, 1994.
- [Ramanujam *et al.*, 1996] 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. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Photochemistry and Photobiology*, 2(1-2) :89–117, 2000.
- [Ramos *et al.*, 2008] Ramos, Maria Luiza Christovão, Gragnani, Alfredo, Ferreira, M. Lydia, and Chairwoman. Is there an ideal animal model to study hypertrophic scarring? *Journal of Burn Care and Research*, 29(2) :363–368, 2008.
- [Richard *et al.*, 2008] Judson Richard, Fathi Elloumi, R. Woodrow Setzer, Zhen Li, and Imran Shah. A comparison of machine learning algorithms for chemical toxicity classification using a simulated multi-scale data model. *BMC Bioinformatics*, 9 :241, 2008.
- [Richards-Kortum and Sevick-Muraca, 1996] R. Richards-Kortum and E. Sevick-Muraca. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annual Review of Physical Chemistry*, 47 :555–606, 1996.
- [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.
- [Richards-Kortum *et al.*, 1989] R. Richards-Kortum *et al.*,. Fluorescence contour mapping : applications to differentiation of normal and pathologic human tissues. In *Lasers and Electro-Optics*, pages –, 1989.
- [Robnik-Sikonja and Kononenko, 2003] Marko Robnik-Sikonja and Igor Kononenko. Theoretical and empirical analysis of relief and rrelief. *Machine Learning Journal*, 53 :23–69, 2003.
- [Rojas, 1996] R. Rojas. *Neural Networks - A Systematic Introduction*. Springer, 1996.
- [Rosenblatt, 1962] Frank Rosenblatt. *Principles of neurodynamics; perceptrons and the theory of brain mechanisms*. Spartan Bookstore, 1962.
- [Rummel, 1976] R.J. Rummel. Understanding correlation. <http://hawaii.edu/powerkills/UC.HTM>, 1976.
- [Sanamura *et al.*, 2003] M. Sanamura, D.G. Duda, M.H. Ghattas, L. Lozonchi, F. Motoi, J.I. Yamauchi, S. Shibahara, and N.G. Abraham. Heme oxygenase accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer. *Angiogenesis*, (6) :15–24, 2003.
- [Senga and Minami, 1991] Y. Senga and S. Minami. Excitation-emission matrix scanning spectrofluorometer. *Applied Spectroscopy*, 45(10) :1721–1725, 1991.
- [Sokolov *et al.*, 1999] K. Sokolov, Drezek R., and Richard-Kortum R. Light scattering from cell :the contribution of the nucleus and the effects of proliferative status. *Optics Express*, 5 :302, 1999.
- [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.
- [Sowray, 2009] Carol Sowray. Bioptron light therapy. « <http://www.healthy-matters.co.za/bioptron.html> », 2009. Healthy Matters.
- [Srinivas and Kumaresan, 2011] C.R. Srinivas and M. Kumaresan. Lasers for vascular lesions : Standard guidelines of care. *Dermatosurgery Specials*, 77(3) :349–368, 2011.
- [Stamatas *et al.*, 2006] G.N. Stamatas, R.B. Estanislao, M. Suero, Z.S. Rivera, J. Li, A. Khaiat, and N. Kollias. Facial skin fluorescence as a marker of the skin’s response to chronic environmental insults and its dependence on age. *British Journal of Dermatology*, 154(1) :125–132, 2006.

- [Stryer, 1995] L. Stryer. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, 4th edition, 1995.
- [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.
- [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.
- [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.
- [Tuchin, 1994] V.V. Tuchin. Selected paper on tissue optics :applications in medical diagnostic and therapy. *SPIE Press*, MS102, 1994.
- [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.
- [Tuchin, 2007] V. Tuchin. *Tissue Optics : Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*. SPIE Publications, second edition, April 2007.
- [Tunnell *et al.*, 2003] J.W. Tunnell, A.E. Desjardins, L. Galindo, I. Georgakoudi, S.A. McGee, J. Mirkovic, M.G. Mueller, J. Nazemi, F.T. Nguyen, and A. Wax. Instrumentation for multimodal spectroscopic diagnosis of epithelial dysplasia. *Technology in cancer research & treatment*, 2(6) :505, 2003.
- [Upile *et al.*, 2009] Tahwinder Upile, Wasseem Jerjes, Henricus JCM Sterenberg, Adel K El-Naggar, Ann Sandison, Max JH Witjes, Merrill A Biel, Irving Bigio, Brian JF Wong, Ann Gillenwater, Alexander J MacRobert, Dominic J Robinson, and al. Head and neck optical diagnostics : vision of the future of surgery. *Head and Neck Oncology*, 25 :1186/1758–3284–1–25, 2009.
- [URGO, 2010] Medical URGO. La peau et les plaies. <http://www.urgomedical.fr/Accueil>, 2010.
- [Utzinger *et al.*, 2001] 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, 2002] S. Valette. *Applications de l'optoélectronique*, chapter 2. La spectroscopie tissulaire appliquée à la détection des états précancéreux et cancéreux précoces, pages 103–168. Hermes Science Publications, 2002.
- [Valeur, 2001] B. Valeur. *Molecular Fluorescence : Principles and Applications*. Wiley-VCH, 2 edition, 2001.
- [W. and van der Leun J., 1984] Bruls W. and van der Leun J. Forward scattering properties of human epidermal layers. *Photochemistry and Photobiology*, 40 :231–242, 1984.
- [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.*, 2000a] 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.
- [Wallace *et al.*, 2000b] V P Wallace, J C Bamber, D C Crawford, R J Ott, and P S Mortimer. Classification of reflectance spectra from pigmented skin lesions, a comparison of multivariate discriminant analysis and artificial neural networks. *Physics in Medicine and Biology*, 45(3) :2859–2871, 2000.
- [Wang *et al.*,] Chih-Yu Wang, Tsuimin Tsai, Hsin-Ming Chen, Chin-Tin Chen, and Chun-Pin Chiang. Pls-ann based classification model for oral submucous fibrosis and oral carcinogenesis.
- [Wolf, 2007] D. Wolf. *Traitement ponctuel*, chapter 2, page 4. Ecole nationale supérieure d'électricité et de mécanique, 2007.
- [Wolfbeis, 1985] O. Wolfbeis. *Molecular Luminescence Spectroscopy :Methods and Applications*, chapter 1. Wiley-Interscience, 1985.
- [Wu and Qu, 2006a] Y. Wu and J.Y. Qu. Autofluorescence spectroscopy of epithelial tissues. *Journal of Biomedical Optics*, 11 :054023, 2006.
- [Wu and Qu, 2006b] Yicong Wu and Jianan Y. Qu. Combined depth and time resolved autofluorescence spectroscopy of epithelial tissue. *Optics Letters*, 31(12) :1833–1835, 2006.
- [Xie. *et al.*, 2008a] J. Xie., S. Qi, T. Li, B. Huang, J. Tang., and Y. Xu. Effect of asiaticoside on hypertrophic scar in the rabbit ear model. *Journal of Cutaneous Pathology*, 36(2) :234–239, 2008.
- [Xie *et al.*, 2008b] J. Xie, S. Qi, Y. Xu, J. Tang, T. Li, X. Liu, B. Shu, H. Liang, and B. Huang. Effects of basic fibroblast growth factors on hypertrophic scarring in a rabbit ear model. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 12(4) :155–62, 2008.
- [Yaroslavsky *et al.*, 2004] A. N. Yaroslavsky, V. Neel, and R. R. Anderson. Fluorescence polarization imaging for delineating nonmelanoma skin cancers. *Optics Letters*, 29(17) :2010–2012, 2004.
- [Ye and Patricia, 2008] Y. Ye and R. Patricia. Enzymatic degradation of human skin dermis revealed by fluorescence and reflectance. *Optical Society of America*, 16(13), 2008.
- [Zavadil *et al.*, 2005] J. Zavadil, D. Lezal, L. Horak, V. Duchac, and M. Prochazka. Autofluorescence spectroscopy of malignant tissue. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 7(2) :1023–1028, 2005.
- [Zellweger *et al.*, 2001] M. Zellweger, P. Grosjean, D. Goujon, P. Monnier, H. Van Den Bergh, and G. Wagnieres. *In vivo* autofluorescence spectroscopy of human bronchial tissue to optimise the detection and imaging of early cancers. *Journal of Biomedical Optics*, 6(1) :41–51, 2001.
- [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.*, 2008] G.Y. Zhu, B. Xu, and J.L. Cai. Experimental research of correlation between anatomy structure of rabbit ear and creating hypertrophic scar animal model. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, 24 :216–219., 2008.
- [Zângaro *et al.*, 2006] Renato Amaro Zângaro, Landulfo Silveira, Ramasamy Manoharan, George Zonios, Irving Itzkan, Ramachandra R. Dasari, Jacques Van Dam, and Michael S. Feld. Rapid

- multiexcitation fluorescence spectroscopy system for *in vivo* tissue diagnosis. *British Journal of Urology*, 35(25) :5211–5219, 2006.
- [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.
- [Zuluaga *et al.*, 1999] A.F. Zuluaga, U. Utzinger, A. Durkin, H. Fuchs, A. Gillenwater, R. Jacob, B. Kemp, J. Fan, and R. Richards-Kortum. Fluorescence excitation emission matrices of human tissue : a system for in vivo measurement and method of data analysis. *Applied Spectroscopy*, 53(3) :302–311, 1999.

A

Spectre d'intensité de la lampe de calibrage

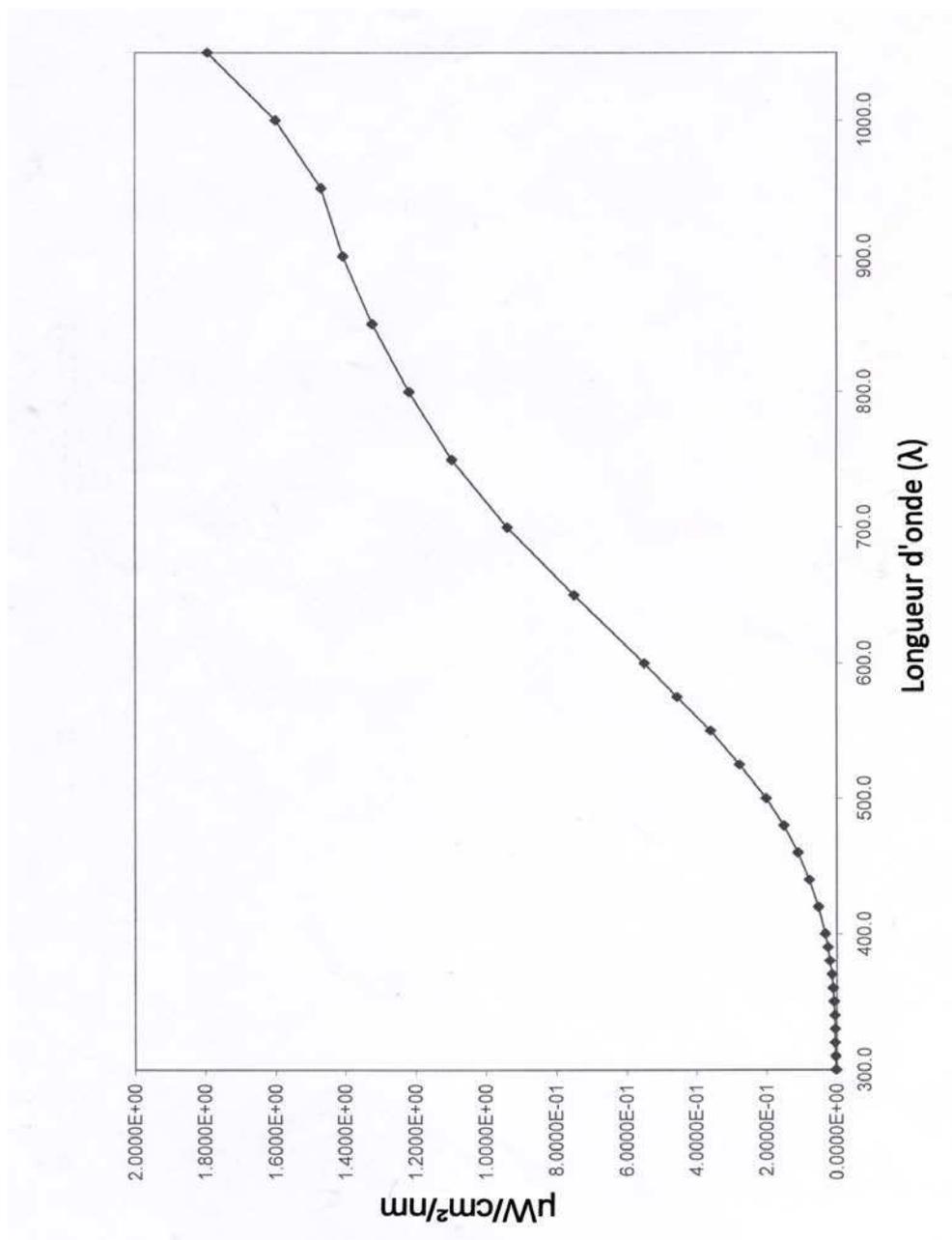


FIGURE A.1 – Spectre étalon de la lampe de calibration (DH 2000-CAL, Ocean Optics).

B

Rappel des caractéristiques spectrales
extraites et composantes principales utilisées
pour la classification (l'étude de [Diaz, 2009])

TABLE B.1 – Caractéristiques extraites des spectres pour chaque excitation en autofluorescence et des spectres en RD dans l'étude [Diaz, 2009]. Aire sous le spectre (A), Aire au-dessus du spectre (AA), Aire sous le spectre avec contribution d'intensité (AT), Aire Normalisée (AN), Pente (P), Pente Normalisée (PN), Rapport (R), Rapport entre aires (A/A), Moyenne (M), Ecart-Type (ET), Médiane (Me), Résidu de Fitting (F).

λ_{exc} (nm)	Caractéristiques spectrales
AF-360, AF-368	$AT_{410-700}, PN_{410-445}, PN_{410-700}, P_{410-445}, P_{410-700}, R_{455-595}, A_{410-500}/A_{500-700}, M, ET, Me$ et F
AF-390	$AT_{460-700}, AT_{460-545}, A_{460-545}, AN_{460-545}, AT_{615-650}, A_{615-650}, AN_{615-650}, AT_{655-690}, A_{655-690}, AN_{655-690}, PN_{460-700}, PN_{460-545}, PN_{615-650}, PN_{655-690}, PN_{460-470}, PN_{470-595}, PN_{633-670}, PN_{470-633}, P_{460-700}, P_{460-545}, P_{615-650}, P_{655-690}, P_{460-470}, P_{470-595}, P_{633-670}, P_{470-633}, R_{470-595}, R_{470-633}, R_{545-633}, R_{470-670}, R_{450-670}, R_{633-670}, A_{615-650}/A_{655-690}, A_{460-545}/A_{545-700}, M, ET, Me$ et F
AF-400	$AT_{460-700}, AT_{460-550}, A_{460-550}, AN_{460-550}, AT_{615-650}, A_{615-650}, AN_{615-650}, AT_{655-690}, A_{655-690}, AN_{655-690}, PN_{460-700}, PN_{460-550}, PN_{615-650}, PN_{655-690}, PN_{460-475}, PN_{485-595}, PN_{633.5-669}, PN_{485-633.5}, P_{460-700}, P_{460-550}, P_{615-650}, P_{655-690}, P_{460-475}, P_{485-595}, P_{633.5-669}, P_{485-633.5}, R_{485-595}, R_{485-633.5}, R_{550-633.5}, R_{485-669}, R_{550-669}, R_{633.5-669}, A_{615-650}/A_{655-690}, A_{460-550}/A_{550-700}, M, ET, Me$ et F
AF-410	$AT_{460-700}, AT_{460-550}, A_{460-550}, AN_{460-550}, AT_{615-650}, A_{615-650}, AN_{615-650}, AT_{655-690}, A_{655-690}, AN_{655-690}, PN_{460-700}, PN_{460-550}, PN_{615-650}, PN_{655-690}, PN_{460-485}, PN_{492-595}, PN_{633-668}, PN_{492-633}, P_{460-700}, P_{460-550}, P_{615-650}, P_{655-690}, P_{460-485}, P_{492-595}, P_{633-668}, P_{492-633}, R_{492-595}, R_{492-633}, R_{550-633}, R_{492-668}, R_{550-668}, R_{633-668}, A_{615-650}/A_{655-690}, A_{460-550}/A_{550-700}, M, ET, Me$ et F
AF-420	$AT_{463-700}, AT_{463-550}, A_{463-550}, AN_{463-550}, AT_{615-650}, A_{615-650}, AN_{615-650}, AT_{655-690}, A_{655-690}, AN_{655-690}, PN_{463-700}, PN_{463-550}, PN_{615-650}, PN_{655-690}, PN_{463-490}, PN_{505-595}, PN_{633-668}, PN_{505-633}, P_{463-700}, P_{463-550}, P_{615-650}, P_{655-690}, P_{463-490}, P_{505-595}, P_{633-668}, P_{505-633}, R_{505-595}, R_{505-633}, R_{550-633}, R_{505-668}, R_{550-668}, R_{633-668}, A_{615-650}/A_{655-690}, A_{463-550}/A_{550-700}, M, ET, Me$ et F
AF-430	$AT_{476-700}, AT_{476-560}, A_{476-560}, AN_{476-560}, AT_{615-650}, A_{615-650}, AN_{615-650}, AT_{655-690}, A_{655-690}, AN_{655-690}, PN_{476-700}, PN_{476-560}, PN_{615-650}, PN_{655-690}, PN_{476-490}, PN_{507-595}, PN_{633-669}, PN_{507-633}, P_{476-700}, P_{476-560}, P_{615-650}, P_{655-690}, P_{476-490}, P_{507-595}, P_{633-669}, P_{507-633}, R_{507-595}, R_{507-633}, R_{560-633}, R_{507-668}, R_{560-669}, R_{633-669}, A_{615-650}/A_{655-690}, A_{476-560}/A_{560-700}, M, ET, Me$ et F
DR 390-720	$AT_{390-710}, AT_{390-450}, AA_{390-450}, AT_{430-540}, AA_{500-600}, AT_{500-600}, PN_{390-720}, PN_{390-450}, PN_{500-600}, PN_{390-600}, PN_{430-540}, PN_{470-600}, PN_{580-600}, PN_{640-720}, PN_{430-450}, P_{390-720}, P_{390-450}, P_{500-600}, P_{390-600}, P_{430-540}, P_{470-600}, P_{580-600}, P_{640-720}, P_{430-450}, R_{390-720}, R_{390-450}, R_{500-600}, R_{390-600}, R_{430-540}, R_{470-600}, R_{600-580}, R_{680-720}, R_{420-470}, R_{420-550}, R_{420-575}, R_{575-470}, R_{575-550}, R_{540-550}, M, ET, Me$ et F

TABLE B.2 – Nombre de caractéristiques finalement retenues après la méthode de sélection (les tests statistiques (Lilliefors et T-Student)) dans l'étude de [Diaz, 2009] pour les différentes combinaisons inter-fibres (chaque distance CEFS1, CEFS2, CEFS3 seules et leur combinaison), ce qui permettent de discriminer 4, 5 ou 6 paires histologiques.

Distance	D1	D2	D3	D1+D2+D3
6 paires	6	2	5	13
\leq 5 paires	44	59	83	186
\leq 4 paires	83	98	125	306

TABLE B.3 – Nombre de composantes principales (CPs) utilisées pour la classification (k-ppv) dans l'étude de [Diaz, 2009] avec chacune des quatre modalités spectroscopiques étudiées : mono-excitation en AF, multi-excitation en AF, réflectance diffuse (DR) et spectroscopie bimodale (DR + multi-excitation en AF).

Mono-excitation AF		Multi-excitation AF	DR	DR + multi-excitation AF
360, 368 nm	390, 400, 410, 420, 430 nm			
PCs = 1,2.	PCs = 1,2, 3.	PCs = 1,2,..., 7.	PCs = 1,2, 3, 4.	PCs = 1,2,..., 10.

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 cutanés cicatriciels hypertrophiques *in vivo*. Ces travaux sont reposés sur trois axes. La première partie des travaux présente l'instrumentation : développement d'un système spectroscopique qui permet de réaliser des mesures de multimodalités *in vivo* de manière automatique et efficace. Des procédures métrologiques sont mise en place pour caractériser le système développé et assurer la répétabilité les résultats de mesure. La deuxième partie présente une étude préclinique. Un modèle animal et un protocole expérimental ont été mises en place pour créer des cicatrices hypertrophiques sur lesquelles nous pouvons recueillir des spectres à analyser. La troisième partie porte sur la classification des spectres obtenus. Elle propose des méthodes algorithmiques pour débruiter et corriger les spectres mesurés, pour extraire automatiquement des caractéristiques spectrales interprétables et pour sélectionner un sous-ensemble de caractéristiques "optimales" en vue d'une classification efficace. Les résultats de classification réalisée respectivement par trois méthodes (k-ppv, ADL et RNA) montrent que la faisabilité d'utiliser la spectroscopie bimodale pour la caractérisation de ce type de lésion cutané. Par ailleurs, les caractéristiques sélectionnées par notre méthode montrent que la cicatrisation hypertrophique implique un changement de structure tissulaire et une variation de concentration de porphyrine.

Mots-clés: Spectroscopy multimodalités, instrumentation, cicatrice hypertrophique, modèle préclinique, extraction, sélection, classification supervisée

Abstract

This research activity aims at developing and validating a multimodal system combining diffuse reflectance spectroscopy and autofluorescence spectroscopy in characterizing hypertrophic scar tissues *in vivo*. The work relies on three axes. The first part concerns the development of an automatic system which is suitable for multimodal spectroscopic measurement. A series of calibration procedures are carried out for ensuring the reliability of the measurement result. The second part presents a preclinical study on an animal model (rabbit ear). An experimental protocol was implemented in order to create hypertrophic scars on which we can collect spectra to analyze. The third part deals with the classification problem on the spectra obtained. It provides a series of algorithmic methods for denoising and correcting the measured spectra, for automatically extracting some interpretable spectral features and for selecting an optimal subset for classification. The classification results arched using respectively 3 different classifiers (knn, LDA and ANN) show the ability of bimodal spectroscopy in characterization of the topic skin lesion. Furthermore, the features selected my selection method indicate that the hypertrophic scarring may involve a change in tissue structure and in the concentration of porphyrins embedded in the epidermis.

Keywords: Multimodal spectroscopy, instrumentation, hypertrophic scar, preclinical model, feature extraction, sélection, supervised classification