HAL
open science

Spectroscopie optique multi-modalités in vivo : instrumentation, extraction et classification diagnostique de tissus sains et hyperplasiques cutanés

Gilberto Diaz-Ayil

To cite this version:

Gilberto Diaz-Ayil. Spectroscopie optique multi-modalités in vivo : instrumentation, extraction et classification diagnostique de tissus sains et hyperplasiques cutanés. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2009. Français. NNT : 2009INPL085N . tel-01748916

HAL Id: tel-01748916

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748916

Submitted on 29 Mar 2018

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université
INPL

École doctorale IAEM Lorraine
DFD Automatique et Production Automatisée

Institut National Polytechnique de Lorraine

Spectroscopie optique multi-modalités *in vivo* : instrumentation, extraction et classification diagnostique de tissus sains et hyperplasiques cutanés

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 16 novembre 2009

pour l'obtention du

Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Spécialité Automatique et Traitement du Signal

par

Gilberto DÍAZ AYIL

Composition du jury

Rapporteurs :	Anne Humeau	Université d'Angers
	Pierre Gouton	Université de Bourgogne
Examinateurs :	Walter C. P. M. Blondel	Nancy Université, UHP, CRAN (Co-directeur de thèse)
	Yves Granjon	Nancy Université, INPL, CRAN (Directeur de thèse)
	Geneviève Bourg-Heckly	Université Pierre et Marie Curie, ANBioF

CRAN

Centre de Recherche en Automatique de Nancy CNRS – UMR 7039
Nancy Université

ALBAN
CENTRE ALEXIS VAUTRIN

Mis en page avec la classe thloria.

Remerciements

Cette thèse à été développée au Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), dans le thème Ingénierie pour la Santé (IPS).

Tout d'abord, je remercie Monsieur le Professeur Didier WOLF de m'avoir accueilli au sein du groupe Ingénierie pour la Santé (IPS) du CRAN et de m'avoir permis de réaliser ma thèse.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Yves GRANJON d'avoir accepté de diriger ma thèse, ainsi que pour ses conseils et ses corrections qui m'ont permis de mener à bien mon projet doctoral.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Walter BLONDEL pour m'avoir encadré, conseillé et corrigé tout au long de ma thèse. Je le remercie également pour sa patience et surtout pour sa manière de travailler et sa perception de la recherche qui m'ont amené à progresser professionnellement.

Je remercie aussi les membres du jury : Madame le Professeur Anne HUMEAU, Monsieur le Professeur Pierre GOUTON, Madame Geneviève BOURG-HECKLY et Monsieur le Professeur François GUILLEMIN, pour l'intérêt et le temps qu'ils ont consacré à ma thèse, ainsi que pour leurs remarques qui ont permis de l'enrichir.

Je remercie Madame Geneviève BOURG-HECKLY pour sa participation, ses conseils pertinents, sa sympathie et pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire BioMoCeTi.

Je remercie aussi tout le personnel du CRAN qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ma thèse.

Je tiens à remercier mes amis les plus proches pour leur grande amitié, leur agréable conversation et leur soutien lors des bons ou mauvais moments : Juanito, Gabriel, Rebeca, Hugo et Ricardo.
Juanito ("mi Compadrito"), merci pour être une personne formidable et pour ton soutien lors des difficiles moments d'adaptation. Comment oublier les week-ends de poulet rôti et de tortillas, les blagues partagées, les fameuses deux heures de formation... Merci "Compadre".
Señor Gabriel, j'ai apprécié les longues et plaisantes conversations que l'on a partagé. Je me souviendrai toujours de la phrase célèbre "para no hacerla larga ni cansada", et de toutes tes citations "Chapulinescas" même si je ne les comprenais pas toujours... Un grand merci.
Rebeca, "la hija predilecta de la Barca", merci pour les agréables discussions concernant le foot, le base-ball, les thèmes socioculturels... Et même si on n'était pas toujours d'accord, les conversations n'en demeuraient pas moins intéressantes... Merci.
Hugo, mon chère Hugo, merci pour ton amitié, les plaisantes conversations, les blagues, les conseils et ton soutien dans les bons ou mauvais moments. Merci pour être un grand ami.
Ricardo, un bon ami que j'ai connu en dernière année de thèse. Je remercie pour ton amitié, pour ta conversation agréable et surtout pour ton grand soutien lors des moments difficiles en fin de thèse.

Je remercie aussi mes autres amis et collègues pour leur soutien et les bons moments partagés ensemble : Yhair, Diego, Sinhué, Pedro, Silvia, Evaristo, Yvan, Luis, Osar, Dulce et famille, Emilie, Marine, Sophie, Julie, Christophe et Liu.

Je remercie plus particulièrement "mi Peque Danie", ma belle petite femme qui est venue illuminer ma vie. Merci pour les moments merveilleux que l'on a passé ensemble et qui reste à venir, pour ta patience et ton soutien pendant la rédaction de cette thèse et surtout pour ton amour.

Je veux remercier Monsieur le Professeur Lorenzo LEIJA de m'avoir permis réaliser un stage (de deux mois, fin 2009) dans son laboratoire de Bioélectronique-CINVESTAV (Mexique), avec le financement du réseau ALFA-BioSenIntg.

Je souhaite également remercier la Région Lorraine et la Ligue régionale de lutte contre le cancer pour leur soutien financier, notamment à l'action SpID (Spectro-Imagerie de Diagnostic) du groupe IPS.

Pour finir, je remercie le support du programme AlBan, programme de bourses de haut niveau de l'Union Européenne pour l'Amérique Latine, bourse n° E05D057651MX.

À ma jolie Danie,
À mes parents,
À la memoire de mes grands parents,

Table des matières

Production scientifique **1**

Liste des figures **5**

Liste des tableaux **9**

Liste des acronymes **11**

Nomenclature **13**

Introduction générale **15**

Chapitre 1 Contexte et objectifs de l'étude **17**

1.1 Cadre Applicatif de l'étude : cancer cutané 17

1.1.1 Préambule 17

1.1.2 La peau 17

1.1.2.1 L'épiderme 18

1.1.2.2 Le derme 21

1.1.2.3 L'hypoderme 21

1.1.3 Cancers de la peau 21

1.1.3.1 Types de cancers cutanés 22

1.1.3.1.1 Carcinomes Baso-Cellulaires 22

1.1.3.1.2 Carcinomes Epidermoïdes 23

1.1.3.2 États précancéreux et cancéreux précoces 24

1.2 Méthodes optiques pour le diagnostic 25

1.2.1 Méthodes de détection et caractérisation cutanée en clinique 25

1.2.2 Méthodes spectroscopiques de diagnostic *in vivo* : Principe et applications 25

1.2.2.1 Spectroscopie d'autofluorescence (mono et multi-excitation) . . . 26

1.2.2.2 Spectroscopie de diffusion élastique 34

1.2.2.3 Spectroscopie Raman 37

1.2.2.4 Spectroscopies Multi-modalités 40

1.2.2.5 Evaluation d'une méthode diagnostique 41

1.3 But et objectifs des travaux de thèse : Problématiques 43
1.3.1 Développement instrumental 43
1.3.2 Protocole expérimental et validation pré-clinique 44
1.3.3 Traitement des données 44

Chapitre 2 Instrumentation et expérimetation *in vivo* **45**
2.1 État de l'art en instrumentation pour la spectroscopie bimodale (fibrée) 45
2.1.1 Les systèmes d'excitation lumineuse 46
2.1.1.1 Excitation d'AF 46
2.1.1.1.1 Sources de "mono-excitation" d'autofluorescence 46
2.1.1.1.2 Sources de "multi-excitation" d'autofluorescence 47
2.1.1.2 Excitation en RD 48
2.1.1.3 Excitation bimodale (AF et RD) 48
2.1.2 Les systèmes d'acquisition spectrale 49
2.1.3 Les sondes fibrées 49
2.1.4 Filtres d'excitation et de réception (émission) 50
2.1.5 Les Méthodes de calibrage métrologique 50
2.2 Instrumentation existante et nouveaux développements 52
2.3 Considérations préliminaires, solutions testées et retenues de l'instrumentation . . 53
2.3.1 Considérations et principe des sources d'excitations 53
2.3.2 Considérations pour la partie réception 54
2.3.3 Solutions technologiques envisagées, testées et retenues pour le système d'excitation 54
2.3.3.1 Excitation multiple à DELs et LASERs 55
2.3.3.2 Excitation multiple à filtres optiques linéairement variables . . . 56
2.3.4 Solutions technologiques pour l'acquisition spectromètrique 59
2.3.4.1 Spectromètre 59
2.3.4.2 Sonde multifibres 59
2.4 Schéma global de l'instrumentation 60
2.4.1 Synchronisation et contrôle global de l'instrumentation 61
2.5 Caractérisation métrologique et calibrage de l'instrumentation 61
2.6 Protocole expérimental *in vivo* pré-clinique 71
2.6.1 Modèle animal 71
2.6.2 Induction de tumeurs cancéreuses précoces cutanées 71
2.6.3 Mesures spectroscopiques bimodales 72
2.6.3.1 Configuration instrumentale 73
2.6.3.2 Préparation des animaux 73

2.6.3.3 Acquisition des spectres 74
2.6.4 Etude histopathologique 76
2.7 Conclusion et perspectives 78

Chapitre 3 Études spectroscopiques sur tumeurs cancéreuses précoces cutanées *in vivo* 79
3.1 Etat de l'art sur le traitement des données en spectroscopie optique UV-Visible . 79
3.1.1 Méthodes développées pour le prétraitement des données spectroscopiques 80
3.1.2 Extraction/sélection de caractéristiques 82
3.1.3 Etat de l'art sur la classification de données en spectroscopie 86
3.2 Prétraitement des spectres d'autofluorescence et de diffusion 87
3.3 Traitement et analyses des données spectroscopiques (deux approches) 94
3.3.1 Extraction/sélection/élimination des variables explicatives pour la classification des données 94
3.3.2 Classification spectroscopique 97
3.3.2.1 Classification supervisée (concepts et intérêts) 99
3.3.2.2 Algorithmes développés pour la classification des états précancéreux cutanés 109
3.4 Résultats et discussion 110
3.4.1 Mono-et multi-excitation en fluorescence (première approche) 110
3.4.2 Réflectance Diffuse (première approche) 112
3.4.3 Multi-excitation AF, RD et bimodalité (première approche) 112
3.4.4 Spectroscopie bimodale résolue spatialement (deuxième approche) 113
3.5 Discussion des résultats 121
3.6 Conclusion du chapitre 126

Conclusion générale 129

Annexe A Article publié en revue EPJAP 133

Annexe B Article publié en revue JBO 147

Bibliographie 163

Production scientifique

Ce travail de thèse a donné lieu à la publication de 2 articles en revues internationales à comité de lecture, 5 communications internationales à comité de lecture avec actes (toutes en présentation orale), 4 communications nationales à comité de lecture avec actes et 1 communication nationale sans comité de lecture (résumé publié).

Revues Internationales à comité de lecture

[RI1] G. Díaz-Ayil, M. Amouroux, W.C.P.M. Blondel, G. Bourg-Heckly, A. Leroux, F. Guillemin and Y. Granjon. Bimodal spectroscopic evaluation of ultra violet-irradiated mouse skin inflammatory and pre-cancerous stages : instrumentation, spectral feature extraction/selection and classification (K-NN, LDA and SVM). *European Physical Journal Applied Physics*, 47 :12707, 2009. (Impact Factor = 0.938)

[RI2] M. Amouroux, G. Díaz-Ayil, W.C.P.M. Blondel, G. Bourg-Heckly, A. Leroux and F. Guillemin. Complementary classification of UV-induced precancerous mouse skin stages by histology and bimodal spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 14(1) :014011, 2009. (Impact Factor = 3.084)

Communications Internationales à comité de lecture avec actes (Communication orale)

[CI1] G. Díaz-Ayil, M. Amouroux, F. Clanché, Y. Granjon, W.C.P.M. Blondel. Spatially-resolved bimodal spectroscopy for classification/evaluation of mouse skin inflammatory and pre-cancerous stages. *In Proceedings of the SPIE ECBO European Conferences on Biomedical Optics*, 7368, pp. 73680F-73680F-8, June 2009, Munich, Allemagne.

[CI2] E. Péry, M. Amouroux, G. Díaz-Ayil, W.C.P.M. Blondel, G. Bourg-Heckly, M.-A. D'Hallewin, A. Leroux, and F. Guillemin. Multi-modality Point Spectroscopy : interests, development and application to in vivo diagnosis of bladder and skin cancers, Communication invitée. *In Proceedings of the 16th Mediterranean Conference on Control and Automation, MED08*, 25(27) :1353-1358, June 2008, Ajaccio, France.

[CI3] G. Díaz-Ayil, M. Amouroux, W. Blondel, G. Bourg-Heckly, E. Péry, Y. Granjon, F. Guillemin, and O. A'Amar. Instrumentation for in vivo bimodal spectroscopy (autofluorescence and diffuse reflectance) : experimental validation and preliminary results. *In Proceedings of the 1st Jordanian International Biomedical Engineering Conference, JIBEC*, November 2007, Amman, Jordanie.

[CI4] M. Amouroux, G. Díaz-Ayil, E. Péry, W.C.P.M. Blondel, and F. Guillemin. Diffuse reflectance spectroscopy's sensitivity to a melanic layer thickness variations : an in vitro study on skin phantoms. *In Proceedings of the SPIE ECBO European Conferences on Biomedical Optics, SPIE'07*, 6628 : 6628OY-9, June 2007, Munich, Allemagne.

Communications Nationales à comité de lecture avec actes

Communication orale

[CN1] G. Díaz-Ayil, M. Amouroux, G. Bourg-Heckly, Y. Granjon and W.C.P.M. Blondel. Classification de stades précancéreux et cancéreux précoces cutanés par spectroscopie bimodale in vivo. *In Proceedings of the Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine, Opt'Diag'09*, May 2009, Paris, France.

[CN2] G. Díaz-Ayil, M. Amouroux, E. Péry, W. Blondel, G. Bourg-Heckly, and F. Guillemin. Système d'excitation pour spectroscopie bi-modale (autofluorescence et réflectance diffuse) : application à la détection in vivo de cancers de peau. *In Proceedings of the Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation, C2i*, Édition Hermès, Lavoisier, pp 445-453, October 2007, Nancy, France.

Affiche (Posters)

[CN3] G. Díaz-Ayil, M. Amouroux, W.C.P.M. Blondel, G. Bourg-Heckly, E. Péry, Y. Granjon, and F. Guillemin. Système d'excitation pour spectroscopie bi-modale (autofluorescence et réflectance diffuse) : application à la détection in vivo de cancers de peau. *In Proceedings of the Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine, Opt'Diag'07*, May 2007, Paris, France.

[CN4] M. Amouroux, G. Díaz-Ayil, E. Péry, W. Blondel, and F. Guillemin. Sensibilité de la spectroscopie de réflectance diffuse aux variations d'épaisseur d'une couche mélanique : étude in vitro sur fantômes de peau. *In Proceedings of the Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine, Opt'Diag'07*, May 2007, Paris, France.

Communications Nationales sans comité de lecture (résumé publié)

[CN5] E. Péry, M. Amouroux, G. Díaz, F. Guillemin, and W. Blondel. Spectroscopie bimodale (autofluorescence et diffusion élastique) pour la caractérisation tissulaire in vivo. *In Journée de Rencontres du Club SFO Photonique et Sciences du Vivant*, November 2006, Paris, France.

Autres Communications

[CN6] W. Blondel, E. Péry, M. Amouroux, G. Díaz and C. Thomas. Photodiagnostic tissulaire in vivo : modélisation des interactions lumière-tissus en spectroscopie d'autofluorescence et de diffusion élastique pour identifier les propriétés optiques de tissus biologiques. *Actes du groupe Biostats de l'IECN*, January 2007, Nancy, France.

[CN7] W. Blondel, E. Péry, C. Thomas, M. Amouroux, and G. Díaz-Ayil. Modélisation des interactions lumière-tissus : les composantes spectrales. Communication orale invitée, *In Proceedings of the Journée Thématique Imagerie et analyse spectrale en microscopie de fluorescence de l'AFC (Association Française de Cytométrie)*, pages 18-19, June 2006, Paris, France.

Liste des figures

1.1 Représentation de la structure du tissu cutané humain 18
1.2 Image d'une coupe histologique de peau humaine 19
1.3 Schéma montrant les principales structures de l'épiderme 19
1.4 Carcinomes Baso-Cellulaires 23
1.5 Carcinome Epidermoide 24
1.6 Schéma de principe de base pour la spectroscopie tissulaire résolue spatialement . 26
1.7 Diagramme de Jablonsky 27
1.8 Spectres d'absorption et d'émission de quelques fluorophores 28
1.9 Représentation schématique de la propagation directe, simplement diffusée et multiplement diffusée d'un faisceau lumineuse. 34
1.10 Formes globales de la fonction de phase de Henyey-Greenstein 35
1.11 Schéma du mécanisme de la diffusion Raman 38
1.12 Spectres Raman moyens des tissus du col de l'utérus normaux et tumoraux . . . 39
1.13 Exemple de courbe ROC 42

2.1 Configuration expérimentale générale pour les expériences de spectroscopie fibrée résolue spatialement en autofluorescence et en réflectance diffuse 45
2.2 Schéma de principe du système mis en œuvre pour l'expérimentation (Pery 2007) 53
2.3 Principe de la source d'excitation UV-Visible à bande variable 54
2.4 Schéma fonctionnel de la solution à LEDs 55
2.5 Schéma de la première configuration pour la solution à lampe et filtres optiques linéairement variables 57
2.6 Schéma de la seconde configuration pour la solution à lampe et filtres linéairement variables 58
2.7 Image de la disposition réelle des fibres de la sonde utilisée 59
2.8 Schéma de synthèse de l'instrumentation développée pour la spectroscopie bimodale 60
2.9 Fenêtre de l'interface développée sous Visual C++ pour le contrôle du système d'excitation et la synchronisation des mesures du spectromètre 62
2.10 Spectres mesurés à la sortie de chaque élement du système d'excitation 64
2.11 Exemples de spectres générés pour l'excitation d'autofluoresnce et la diffusion élastique 65
2.12 Schéma bloc du calibrage de la réponse spectrale de l'instrumentation développée 66
2.13 Schéma de la configuration expérimentale mise en œuvre pour réaliser les mesures de calibrage de la réponse spectrale du système d'acquisition. 66
2.14 Courbes des coefficients spectraux calculés pour corriger la réponse spectrale du système d'acquisition 67
2.15 Courbes des coefficients spectraux calculés pour corriger la réponse spectrale du système d'acquisition... continuation 68

2.16 Schéma de la configuration du système expérimental pour la mesure en diffusion élastique sur un standard en réflexion diffuse . . . 69
2.17 Courbes typiques de variation de la puissance relative au cours du temps d'utilisation de la lampe Xénon 300 W . . . 70
2.18 Courbes des mesures quotidiennes de puissance d'excitations . . . 70
2.19 Photographie de l'appareil d'irradiation ultraviolette et Spectre d'émission . . . 72
2.20 Spectres d'intensité d'excitation choisis . . . 73
2.21 Configuration géométrique de l'extrémité distale de la sonde multi-fibres . . . 74
2.22 Localisation schématique des sites anatomiques de mesure en spectroscopie bimodale sur la peau de souris . . . 74
2.23 Schéma du cache en plastique translucide . . . 75
2.24 Photographie d'une souris anesthésiée installée sur la couverture chauffante et portant sur le dos le cache troué fixé à l'aide de sparadrap . . . 75
2.25 Mise en place de l'animal après sacrifice, pour prélèvement cutané . . . 76

3.1 Organigramme du prétraitement des données en spectroscopie de fluorescence . . . 81
3.2 Principe de l'extraction de caractéristiques . . . 83
3.3 Organigramme d'un processus de sélection de caractéristiques . . . 84
3.4 Organigramme des fonctions de prétraitement implémenté pour nos spectres de fluorescence . . . 88
3.5 Cache mis en place pour couvrir et isoler le site de mesure . . . 89
3.6 Matrice 2D des mesures spectroscopiques . . . 90
3.7 Matrice 3D regroupant l'ensemble des mesures bimodales résolue spatialement (6 distances) réalisées sur un site tissulaire . . . 90
3.8 Suppression des artefacts . . . 91
3.9 Exemple de spectres d'émission de fluorescence avec une mesure erronée . . . 91
3.10 Spectres accumulés moyennés . . . 92
3.11 Spectre lissé en utilisant le filtre de lissage polynomial Stavizky-Golay. . . . 92
3.12 Réduction de la bande spectrale d'étude pour un spectre d'émission d'autofluorescence . . . 93
3.13 Organisation des matrices 3D contenant toutes les mesures pour un site du tissu biologique. . . . 94
3.14 Exemple de spectres prétraités moyennés acquis à la distance D1 = 271 μm, pour les quatre classes histologiques . . . 95
3.15 Exemples de caractéristiques extraites des spectres AF et RD . . . 96
3.16 Organisation hiérarchique des techniques d'Apprentissage Automatique . . . 100
3.17 Schéma de l'apprentissage supervisé . . . 101
3.18 Exemples de la classification k-NN . . . 102
3.19 Approche géométrique de la méthode ADL . . . 103
3.20 Matrices de variance-covariance . . . 104
3.21 Ensemble de points séparables et hyperplan dans l'espace dimensionnel $\Re^2$ . . . 106
3.22 Exemple des hyperplans séparateurs pour le cas de données non linéairement séparables . . . 107
3.23 Algorithmes de classification développés . . . 110
3.24 Moyenne de Sensibilité et Spécificité obtenues en mono-excitation de fluorescence et en multi-excitation de Fluorescence . . . 111
3.25 Sensibilités et Spécificités moyennes obtenues à partir des caractéristiques en réflectance diffuse . . . 112

3.26 Sensibilités et Spécificités moyennes en multi-excitation d'autofluorescence, en réflectance diffuse seule et en bimodalité . . . 113
3.27 Sensibilités et Spécificités moyennes calculées à partir d'un jeu de 13 caractéristiques spectrales capables de discriminer les 6 paires de classes histologiques . . . 115
3.28 Sensibilités et Spécificités moyennes calculées à partir d'un jeu de 13 caractéristiques spectrales capables de discriminer les 6 paires de classes histologiques... (continuation) . . . 116
3.29 Sensibilités et Spécificités moyennes calculées à partir d'un jeu de 186 caractéristiques spectrales capables de discriminer au moins 5 des 6 paires histologiques . . 117
3.30 Sensibilités et Spécificités moyennes calculées à partir d'un jeu de 186 caractéristiques spectrales capables de discriminer au moins 5 des 6 paires histologiques... (continuation) . . . 118
3.31 Sensibilités et Spécificités moyennes calculées à partir d'un jeu de 306 caractéristiques spectrales capables de discriminer au moins 4 des 6 paires de classes histologiques . . . 119
3.32 Sensibilités et Spécificités moyennes calculées à partir d'un jeu de 306 caractéristiques spectrales capables de discriminer au moins 4 des 6 paires de classes histologiques... (continuation) . . . 120
3.33 Sensibilités et Spécificités en utilisant les caractéristiques qui discriminent exclusivement HA (Hyperplasie Atypique) vs D (Dysplasie) + moyennes calculées à partir d'un jeu de 13 caractéristiques spectrales capables de discriminer les 6 paires de classes histologiques . . . 122
3.34 Sensibilités et Spécificités en utilisant les caractéristiques qui discriminent exclusivement HA (Hyperplasie Atypique) vs D (Dysplasie) + moyennes calculées à partir d'un jeu de 13 caractéristiques spectrales capables de discriminer les 6 paires de classes histologiques... (continuation) . . . 123
3.35 Sensibilité et Spécificité en utilisant les caractéristiques qui discriminent exclusivement HA (Hyperplasie Atypique) vs D (Dysplasie) + moyennes calculées à partir d'un jeu de 186 caractéristiques spectrales capables de discriminer au moins 5 des 6 paires de classes histologiques . . . 124
3.36 Sensibilité et Spécificité en utilisant les caractéristiques qui discriminent exclusivement HA (Hyperplasie Atypique) vs D (Dysplasie) + moyennes calculées à partir d'un jeu de 186 caractéristiques spectrales capables de discriminer au moins 5 des 6 paires de classes histologiques... (continuation) . . . 125

Liste des tableaux

1.1 Rappels de terminologie 25
1.2 Excitations et émissions maximales des principales molécules biologiques 30
1.3 Principaux avantages et inconvénients de l'utilisation clinique de la fluorescence exogène et endogène 31
1.4 Définition des caractéristiques d'un test de dépistage 42

2.1 Test de répétabilité des excitations générées en AF et diffusion élastique 63
2.2 Test de répétabilité des mesures en émission d'AF et diffusion élastique 63
2.3 Seuils d'épaisseurs de l'épiderme des souris SKH1 du groupe contrôle (non irradiées) pour distinguer un épiderme "normal" d'un épiderme hyperplasique 77
2.4 Résultats de classification histopathologique 78

3.1 Caractéristiques extraites dans le cadre d'une étude portant sur la discrimination des mélanomes de la peau humaine 85
3.2 Caractéristiques spectrales utilisées pour le première approche de classification . . 97
3.3 Caractéristiques extraites des spectres pour chaque excitation en autofluorescence et des spectres en RD, pour le seconde approche 98
3.4 Nombre de caractéristiques finalement retenues après les tests statistiques 99
3.5 Nombre de composantes principales (CPs) utilisées pour évaluer l'algorithme k-NN avec chacune des quatre modalités spectroscopiques étudiées 99
3.6 Nombre de composantes principales employées pour évaluer chacun des trois algorithmes de classification et chacune des combinaisons des trois distances inter-fibres 99
3.7 Fonctions noyaux couramment utilisées en SVM 109
3.8 Résumé des meilleurs résultats en sensibilité, en spécificité et les valeurs prédictives positives et négatives (première approche) 114
3.9 Résumé des meilleurs résultats en sensibilité, en spécificité et les valeurs prédictives positives et négatives (deuxième approche) 121

Liste des acronymes

ACP Analyse en Composantes Principales
AF AutoFluorescence
AFA Alcool Formolé Acétique
KA « Actinic Keratoses » ou Kératoses Actiniques

CBC « Carcinomes Baso-Cellulaires » ou BCC, Basal Cell Carcinoma
CCD « Charged Couple Device » ou Dispositif à Transfert de Charge
CE « Carcinome Epidermoïde » ou SCC, Squamous Cell Carcinoma
CIN3 Dysplasie grave
CIN2 Dysplasie modérée
CIN1 Dysplasie légère
CN Columnar Normal

D Dysplasique
DE Diffusion Elastique

EEMs « Excitation Emission Matrices » ou Matrices d'Excitation-Émission
ET Ecart Type

FN Faux Négatif
FOLV Filtres Optiques Linéairement Variables
FOV « Fields of View » ou Champ de vision
FP Faux Positif
FWHM « Full Width at Half Maximum » ou Largeur à mi-hauteur

h-ALA « Aminolevulinic Acid Methyl Ester » ou Méthyl Ester d'Acide d'Aminolévulinique
HA Hyperplasie Atypique
HC Hyperplasie Compensatoire
HGSILs « High Grade Squamous Intraepithelial Lesions » ou Lésions épidermoïdes d'haute grade

k-NN « k Nearest Neighbors » ou k plus proches voisins

LASER « Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation » ou amplification de la lumière par émission stimulée de radiations

LDA « Linear Discriminant Analysis » ou Analyse discriminante linéaire

LED « Light-Emitting Diode » ou Diode électroluminescente

LGSILs « Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions » ou Lésions épidermoïdes de bas grade

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

LSS « Light-Scattering Spectroscopy » ou Spectroscopie de diffusion simple

NADH reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen

NADPH reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen

ND Négatif pour la Dysplasie

ON Ouverture Numérique ou « Numerical Aperture » (NA)

PpIX Protoporphyrine IX

RD « Réflectance Diffuse » ou DR, Diffuse Reflectance

Se Sensibilité

SN Epithélium malpighien normal

Sp Spécificité

SVM « Support Vector Machine » ou machine à support vectoriel

TIS Transition Inter-Système

UV UltraViolet

VN Vrai Négatif

VP Vrai Positif

VPN Valeur Prédictive Négative

VPP Valeur Prédictive Positive

Nomenclature

E_i	Niveaux d'énergie dits virtuels
g	Facteur d'anisotropie
S_i	État singulet
T_i	État triplet
λ	Longueur d'onde, nm
μ_a	Coefficient d'absorption, cm^{-1}
μ_s	Coefficient de diffusion, cm^{-1}
$\mathrm{p}(\theta)$	Fonction de phase

Introduction générale

Les cancers cutanés figurent parmi les plus fréquents des cancers humains. L'incidence des cancers cutanés augmente régulièrement depuis plusieurs décennies dans les populations à peau claire. En France, les cancers cutanés constituent une préoccupation croissante pour la santé publique comme pour les populations. La détection des cancers à un stade précoce est un enjeu majeur car elle augmente de façon significative les chances de guérison et simplifie considérablement la thérapie, en utilisant des traitements moins agressifs et moins coûteux. L'utilisation des interactions de la lumière avec les tissus à des fins diagnostiques *in vivo* constitue en recherche fondamentale, appliquée et clinique, un axe de développement prometteur et en plein essor.

Les techniques spectroscopiques *in vivo* examinent différents types d'interactions de la lumière avec les tissus biologiques et fournissent des informations biochimiques et morphologiques au niveau moléculaire, cellulaire et tissulaire [Georgakoudi *et al.*, 2003]. L'intérêt clinique de l'approche spectroscopique provient de la nature non ionisante de la lumière, du caractère non traumatique (non invasif) de la mesure, de sa grande sensibilité [Valette, 2002] ainsi que de sa capacité de mise en œuvre *in vivo*, en clinique au moyen de systèmes à fibres optiques. Historiquement la première à être utilisée à des fins diagnostiques, la spectroscopie d'AutoFluorescence (AF) reste aujourd'hui la méthode la plus employée. La spectroscopie de Réflectance Diffuse (RD), plus récente, suscite un intérêt croissant. Ne présentant pas de difficulté technique majeure, son exploitation nécessite en revanche le développement de modèles mathématiques de diffusion-absorption complexe de la lumière dans les tissus. La spectroscopie Raman, phénomène de diffusion non élastique, présente le grand intérêt de fournir directement une information sur la composition chimique du tissu ; bien que peu de données soient disponibles *in vivo*, les derniers travaux publiés permettent d'envisager la possibilité d'une utilisation clinique.
L'efficacité diagnostique de chaque technique a été étudiée séparément sur une grande variété d'organes (bouche, col de l'utérus, colon, sein, bronches, etc.) [Mallia *et al.*, 2008][Marín *et al.*, 2005][Li and Xie, 2005][Zhu *et al.*, 2006][Zellweger *et al.*, 2001]. Mais ces techniques spectroscopiques sont complémentaires et quelques travaux récents montrent des augmentations de la spécificité et surtout de la sensibilité diagnostiques, notamment en couplant les modalités en autofluorescence et en diffusion élastique simple [Chang *et al.*, 2005][de Veld *et al.*, 2005][Breslin *et al.*, 2004][Nordstrom *et al.*, 2001], ou en combinant les informations d'autofluorescence, de diffusion élastique simple et de diffusion élastique multiple [Muller *et al.*, 2003] [Georgakoudi *et al.*, 2002][Georgakoudi *et al.*, 2001].

Le but de ce travail de thèse est de développer et valider expérimentalement une méthode de caractérisation diagnostique *in vivo* de différents états précancéreux cutanés en exploitant la combinaison/fusion des spectroscopies d'autofluorescence et réflectance (spectroscopie bimodale) afin d'optimiser l'efficacité de la classification diagnostique exprimée en termes de sensibilité (Se) et spécificité (Sp).

Ce mémoire est divisé en quatre chapitres principaux :
Le premier chapitre est consacré au contexte et objectifs de l'étude. Il y est décrit le cadre applicatif de l'étude. D'abord nous abordons les principales définitions et données bibliographiques liées aux caractéristiques histologiques de la peau et aux types de cancers cutanés. Ensuite nous présentons une étude bibliographique des principales méthodes optiques de détection et de caractérisation cutanée, d'intérêt pour nos travaux (AF, RD et Raman) en décrivant leur principe et applications au diagnostic *in vivo*. Cette étude bibliographique nous a servi pour situer notre problématique et affiner les objectifs spécifiques de nos travaux.

Le chapitre 2 est dédié à l'instrumentation de spectroscopie bimodale résolue spatialement développée, validée et mise en œuvre dans le cadre d'un protocole expérimentale *in vivo*. Nous présentons tout d'abord une étude bibliographique des outils de spectroscopie bimodale existants à partir desquels nous avons défini nos besoins. Les principales caractéristiques des dispositifs choisis et mis en œuvre au laboratoire sont décrites. Nous exposons ensuite les différentes étapes d'étude réalisées et les difficultés rencontrées pour le développement d'un nouveau dispositif couplant les mesures en diffusion élastique et en multi-excitation de fluorescence et passant par l'étude de solutions technologiques optimisées notamment pour le système d'excitation multi-bandes. Enfin, nous précisons les caractéristiques techniques, la validation métrologique et le calibrage de l'instrumentation finalement mise en place.

Le chapitre 3 est consacré à la description du protocole expérimental pré-clinique choisi et mis en place. Nous exposons tout d'abord le choix du modèle de tumeur induite par rayonnements UV sur souris, visant l'étude de lésions précancéreuses cutanées. Ensuite, nous décrivons la méthodologie de mesure spectroscopique *in vivo*. Enfin, nous terminons par la présentation des résultats de l'analyse histopathologique en termes de données de référence des tissus sains et précancéreux prélevés.

Le dernier chapitre concerne le traitement des données spectroscopiques recueillies. Nous présentons tout d'abord une étude bibliographique sur le traitement de données spectroscopiques comprenant trois parties : le prétraitement des spectres d'AF et RD, l'extraction de caractéristiques, et la classification des données spectroscopiques. Ensuite nous présentons les solutions techniques et méthodologiques développées pour l'analyse des données spectroscopiques comprenant :

a) le prétraitement des spectres acquis ;
b) la réduction de la dimension du jeu de données en réalisant l'extraction/sélection de caractéristiques spectrales discriminantes ; et
c) l'évaluation de trois algorithmes de classification supervisée linéaire : k-NN [1], LDA [2] et SVM [3].

Finalement nous comparons la capacité de discrimination des différentes combinaisons de modalités spectroscopiques : simple excitation d'AF seule, multi-excitation en AF, RD seule, couplage "multi-AF + RD" et couplage "multi-AF + RD" résolue spatialement.

1. k-NN : « k Nearest Neighbors » ou k plus proches voisins
2. LDA : « Linear Discriminant Analysis » ou analyse discriminante linéaire
3. SVM : « Support Vector Machine » ou machine à support vectoriel

1

Contexte et objectifs de l'étude

1.1 Cadre Applicatif de l'étude : cancer cutané

1.1.1 Préambule

Le cancer cutané est le plus répandu parmi les populations à peau claire [Mogensen and Gregor, 2007]. Deux types principaux de lésions cancéreuses de la peau concernent les cellules de l'épiderme : les kératinocytes et les mélanocytes [LeBoit *et al.*, 2006]. Les tumeurs de kératinocytes sont les plus communes et parmi elles, le Carcinome Epidermoïde, CE (ou SCC "Squamous Cell Carcinoma") est le type de cancer le plus dangereux car il métastase dans plus de 7% des cas [Kelso *et al.*, 2006]. La meilleure chance de traiter entièrement le CE est de l'exciser dès ses premières phases de développement avant son invasion dans le derme, où se trouvent les premiers réseaux vasculaires. Ainsi, la détection de ces premières étapes précancéreuses (par exemple : kératoses actinique et maladie de Bowen) est d'intérêt primordial pour le diagnostic clinique.

Cette détection vise à être à la fois spécifique et sensible. D'une part, les "faux négatif" (nombre d'individus malades avec un test négatif) peuvent avoir comme conséquence qu'une lésion non détectée poursuive sa croissance et la rende ensuite trop étendue pour la résection chirurgicale. Par ailleurs, le retard dans la présentation du patient au clinicien et dans la détection d'une lésion cancéreuse augmente le risque d'évolution métastatique avec de possibles conséquences mortelles. D'autre part, les "faux positifs" (nombre d'individus non-malades avec un test positif) entraînent des procédures inutiles, des inconvénients et du stress pour les patients, une augmentation de la morbidité et des coûts de prise en charge [Tehrani *et al.*, 2007].

Ainsi de nouveaux outils et méthodes de diagnostic en clinique sont nécessaires pour détecter les lésions pré-cancéreuses et cancéreuses les plus précoces et limiter au maximum les faux négatifs et positifs. Dans ce travail de thèse nous proposons une approche de détection de lésions précancéreuses cutanées visant à améliorer l'efficacité diagnostique en évaluant plusieurs modalités de spectroscopie optique tissulaire.

1.1.2 La peau

La peau est un organe protecteur recouvrant la surface externe du corps, et constituant une barrière protectrice vis-à-vis de nombreux agents physiques, chimiques, bactériens ou viraux. Chez l'adulte moyen sa superficie varie entre 1,5 et 2 m^2 et elle possède une épaisseur qui varie globalement entre 1,5 et 4 mm.

La peau est un organe multi-couches, composé de plusieurs types cellulaires et constituants extra-cellulaires (figure 1.1). Elle remplit un rôle dans plusieurs fonctions vitales, notamment :

- Le maintien de l'homéothermie (sudation, isolation thermique) et de l'équilibre hydrique grâce à la couche cornée (imperméabilité, hydratation),
- Le maintien de l'intégrité de l'organisme dans son environnement grâce au sens du toucher et a un ensemble de nocicepteurs thermiques ou mécaniques,
- La reconnaissance du soi et du non-soi par plusieurs types de cellules immunitaires
- L'équilibre neuro-endocrinien grâce aux glandes sudorales apocrines, aux glandes sébacées et aux cellules de Merkell.

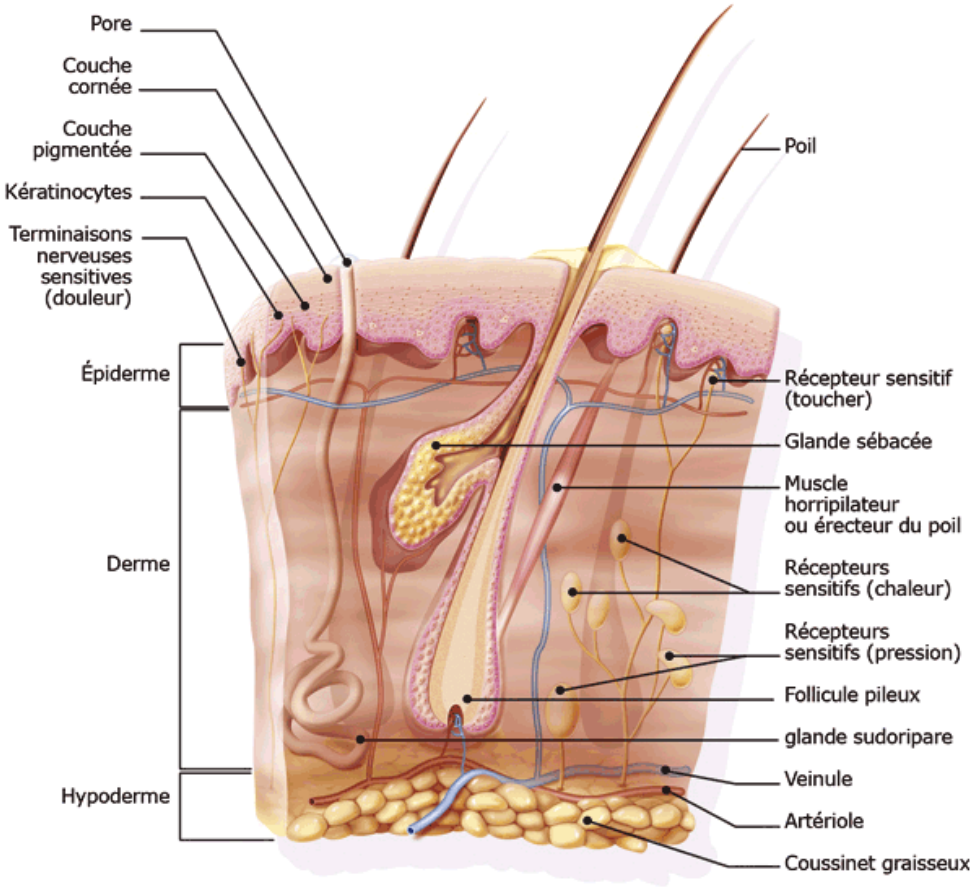

FIGURE 1.1 – Représentation de la structure du tissu cutané humain montrant les différentes couches constitutives de l'épiderme, du derme et de l'hypoderme (Copyright sanofi-aventis France 2006).

D'un point de vue histologique et anatomique, trois couches sont identifiées : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (figure 1.2).

1.1.2.1 L'épiderme

L'épiderme (figure 1.3) est formé d'un épithélium stratifié squameux kératinisé qui se compose de quatre types de cellules dont les kératinocytes et les mélanocytes et de quatre ou cinq couches distinctes (cornée et claire, granuleuse, épineuse, basale) selon le type de peau (épaisse ou fine).

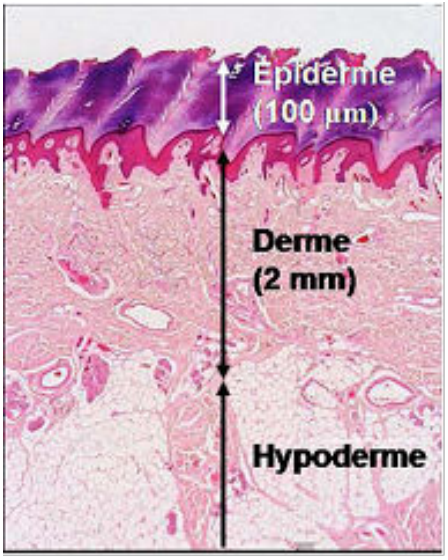

FIGURE 1.2 – Image d'une coupe histologique de peau humaine avec les dimensions typiques des trois couches : épiderme, derme et hypoderme. Iconographie adaptée du site *web* de la *School of Anatomy and Human Biology, The University of Western Australia.*

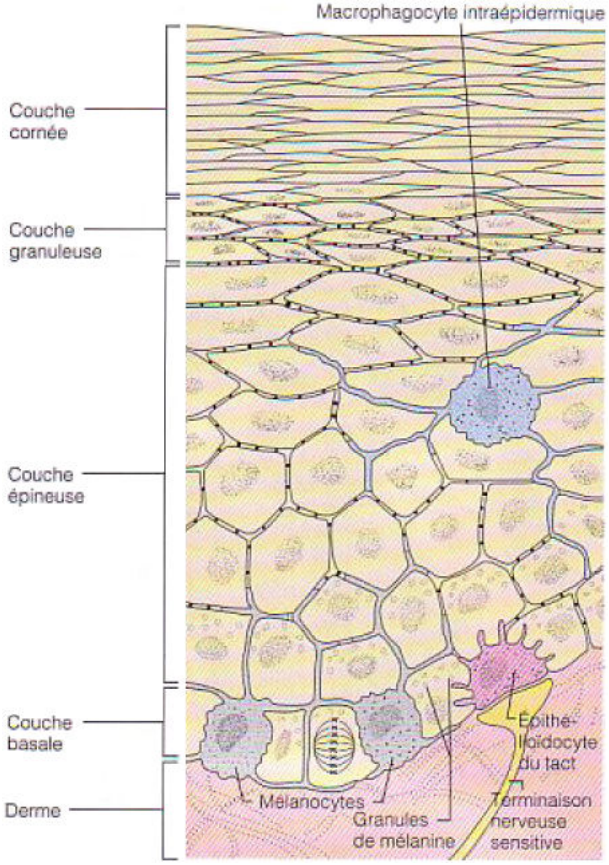

FIGURE 1.3 – Schéma montrant les principales structures de l'épiderme (peau fine) : couches et quantité relative des différents types de cellules. Les kératinocytes (en beige) forment la majeure partie de l'épiderme [Marieb, 1999].

Cellules de l'épiderme

Les **kératinocytes** sont les cellules majoritaires au sein de l'épiderme. Le rôle principal des kératinocytes (kera = corne) consiste à produire de la kératine, une protéine fibreuse qui confère aux cellules de l'épiderme leurs propriétés protectrices mais également leur fluorescence intrinsèque. Les kératinocytes proviennent de cellules qui se divisent de façon quasi continue par mitose et qui sont situées dans la partie plus profonde de l'épiderme (couche basale). A mesure que les kératinocytes sont poussés vers la surface de la peau par les nouvelles cellules, ils commencent à produire de la kératine molle qui va devenir leur constituant majeur. Les kératinocytes meurent durant leur migration vers la surface de la peau. Les **mélanocytes** sont des cellules épithéliales spécialisées qui synthétisent un pigment appelé mélanine (melas = noir) qui possède des propriétés d'absorption de la lumière. On les retrouve dans les couches profondes de l'épiderme. Les granules de mélanine s'accumulent sur la face du noyau des kératinocytes tournée vers le milieu externe et forment ainsi une sorte de bouclier pigmentaire qui protège le noyau des effets pathogènes des rayons ultraviolets du soleil. Tous les êtres humains possèdent à peu près le même nombre de mélanocytes et les variations individuelles et raciales observées dans la coloration de la peau relèvent de différences dans la synthèse et la sécrétion de la mélanine par ces cellules.

Couches de l'épiderme

L'épiderme de la peau épaisse (qui recouvre par exemple la paume des mains, le bout des doigts et la plante des pieds) est constituée de cinq couches cellulaires ou strates. Dans la peau fine, qui recouvre le reste du corps, il n'y a pas de couche claire et les quatre autres couches sont plus minces.

La **couche basale** est fixée au derme sous-jacent par une bordure ondulée. 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. De 10 à 25% des cellules de la couche basale sont des mélanocytes. Leurs prolongements s'étendent vers les kératinocytes et peuvent atteindre les cellules épineuses du stratum spinosum. Environ 10% des kératinocytes basaux sont des cellules souches, **cible de l'accumulation de mutations génétiques délétères associées aux néoplasies causées par exemple par une exposition au rayonnement solaire**.

La **couche épineuse** (stratum spinosum) est appelée ainsi à cause de l'apparence histologique des kératinocytes qui y séjournent (forme légèrement aplatie et irrégulière). On trouve de nombreux granules de mélanine et des macrophagocytes intraépidermiques disséminés parmi les kératinocytes.

La **couche granuleuse** (stratum granulosum) est constituée de trois à cinq strates de cellules dans lesquelles les kératinocytes changent considérablement d'aspect : il s'aplatissent, leur noyau et leurs organites commencent à se désintégrer et ils accumulent des granules de kératohyaline et des granules lamellés.

La **couche claire** (stratum lucidum) est formée de plusieurs strates de kératinocytes clairs, aplatis et morts, aux contours mal définis.

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.

1.1.2.2 Le derme

La seconde couche de la peau, le derme (derma = peau), est constitué d'une épaisseur de tissu conjonctif à la fois résistante et flexible. Le derme est formé de deux couches, la zone papillaire et la zone réticulaire.

La **zone papillaire** est une mince couche de tissu conjonctif lâche formée de fibres entrelacées qui permettent le passage de nombreux vaisseaux sanguins ainsi que de neurofibres.

La **zone réticulaire**, plus profonde, occupe environ 80% du derme. Elle est formée de tissu conjonctif dense irrégulier. Sa matrice extracellulaire renferme des faisceaux de fibres de collagènes enchevêtrées, diversement orientées mais pour la plupart parallèles à la surface de la peau. La trame collagénique (de types I et III) est majoritairement constituée de longues fibres peu flexibles de section régulière (diamètre de 50 à 100 nm). Le derme réticulaire est abondamment vascularisé dans sa partie la plus superficielle ; les fibres de collagène y sont assemblées en faisceaux denses regroupant un nombre de fibres croissant avec la profondeur. Les fibres élastiques, en nombre à peu près équivalent aux faisceaux de fibres de collagène, leur sont liées par l'appareil microfibrillaire qui déborde de leur axe chargé d'élastine. Le collagène et l'élastine sont les principaux constituants fluorescents.

1.1.2.3 L'hypoderme

La frontière entre le derme réticulaire profond et le hypoderme est abrupte. Les deux structures sont cependant structurellement et fonctionnellement imbriquées grâce aux réseaux vasculaires et nerveux et aux appendices épidermiques. Les follicules pileux en phase active de croissance s'étendent jusque dans la graisse sous-cutanée. Les adipocytes originaires du mésenchyme sont les principales cellules de l'hypoderme et sont regroupées en lobules.

1.1.3 Cancers de la peau

Le cancer de la peau, est la forme de cancer la plus répandue dans le monde ; son incidence double tous les 15 à 20 ans [Schwartz, 2008]. Il en existe trois grands types : les carcinomes, tumeurs développées aux dépens des cellules épidermiques, et qui peuvent être basocellulaires, épidermoïdes ou annexiels ; les mélanomes, développés aux dépens des cellules pigmentaires de la peau, les mélanocytes ; les sarcomes, développés à partir des cellules du tissu conjonctif dermique. La majorité des lésions cancéreuses de la peau se développent au sein de l'épiderme. Comme décrit précédemment, les deux types cellulaires les plus fréquents au sein de l'épiderme sont les kératinocytes et les mélanocytes.

Le facteur principal induisant la plupart des cancers primaires de la peau est l'exposition aux rayonnements UV. Cependant, les rayons X et les rayons infrarouges peuvent également être cancérogène. En outre, la carcinogenèse virale et chimique peut également être très importante.

En terme de prévention, la protection réelle de la peau dépend principalement des protections solaires employées [Nicol *et al.*, 2006]. La prévention devrait commencer tôt, dans l'enfance [Azfar *et al.*, 2004]. Le second objectif est la détection précoce, car la plupart des cancers sont

guérissables s'ils sont détectés aux premiers stades. L'identification de symptômes et des bilans de santé réguliers aident à la détection précoce. La détection des cancers à un stade précoce constitue un enjeu sociétal, économique et humain majeur puisqu'elle permet une augmentation importante des chances de guérison et simplifie la thérapie, en utilisant des traitements moins agressifs et aux coûts réduits.

1.1.3.1 Types de cancers cutanés

Dans ce chapitre nous nous limiterons à la présentation des cancers cutanés les plus fréquents et objet de l'étude expérimentale du présent travail de thèse : les cancers kératinocytaires.

Les cancers kératinocytaires incluent principalement les Carcinomes Baso-Cellulaires, CBC (en anglais : Basal Cell Carcinoma, BCC) et les Carcinomes Epidermoïdes (CE) aussi appelés " spino-cellulaires " (en anglais : Squamous Cell Carcinoma, SCC). Ces deux formes de cancers sont souvent regroupées sous l'appellation de " tumeurs cutanées non mélanocytaires ".

Le carcinome épidermoïde est moins fréquent que le carcinome basocellulaire ; 80% des tumeurs cutanées non mélanocytaires sont des CBC et 20% sont des CE [Kwa *et al.*, 1992].

Le mélanome est une tumeur maligne développée aux dépens des mélanocytes, cellules différenciées pour la fabrication du pigment assurant la coloration de la peau.

1.1.3.1.1 Carcinomes Baso-Cellulaires

Il s'agit d'une tumeur extrêmement fréquente survenant le plus souvent de manière sporadique après 40 ans et notamment chez des patients à phototype clair ayant subi des expositions solaires intenses et répétées sans protection au cours de leur vie [Guillot, 2008][Maksimovic *et al.*, 2006].

À la différence du mélanome et du carcinome épidermoïde, le CBC métastase rarement ; en revanche, c'est un envahisseur local, qui peut envahir et détruire des structures fondamentales. Le CBC est dérivé de kératinocytes immatures différenciés et incomplets de l'épiderme. Il est localisé dans les zones photo-exposées dans plus de 85% des cas.

Aspects histocliniques

Le CBC (figure 1.4)se manifeste initialement sous forme d'une lésion de petite taille : grains saillants à consistance ferme, couleur peu anormale ou grisâtre. La chronicité de ces lésions et leur absence de guérison spontanée doit conduire à une biopsie à visée diagnostique. Trois types cliniques de carcinome basocellulaire sont décrits :

- *le carcinome basocellulaire nodulaire* ; papule ou nodule lisse translucide .
- *le carcinome basocellulaire superficiel* ; plaque rouge, plane, bien limitée, à extension centrifuge, localisé surtout sur le tronc ou les membres.
- *le carcinome basocellulaire sclérodermiforme* ; plus rare, plaque dure, brillante, mal limitée et ressemblant à une cicatrice blanche.

Ces trois variétés cliniques de CBC peuvent toutes s'ulcérer ou se pigmenter par dépôt de pigment mélanique posant alors parfois un problème de diagnostic différentiel avec le mélanome.

Sous le microscope, les CBC apparaissent comme des masses cutanées irrégulières avec des tailles et des formes variables, entourées par une couche de cellules périphériques avec noyaux palissadés. Les différentes cellules tumorales sont habituellement uniformes et atypiques [Ono *et al.*, 1985][Hanke and Temofeew, 1986][Sakamoto *et al.*, 1985]. Les différentes cellules du CBC sont habituellement uniformes en apparence, avec des noyaux relativement grands et une affinité forte pour les colorants basiques. Leur cytoplasme est limité et basophile. Les différents contours de cellules peuvent être indistincts.

FIGURE 1.4 – Exemples de Carcinomes Baso-Cellulaires : a) superficiel, b) nodulaire translucide et c) pigmenté [Schwartz, 2008].

Epidémiologie

En France l'incidence réelle des CBC est difficile à préciser. Ils sont en effet rarement inclus dans les statistiques des registres des cancers où ils sont parfois regroupés avec l'ensemble des carcinomes cutanés non mélaniques. Le taux d'incidence standardisé par rapport à la population mondiale issu du registre départemental des cancers du Haut-Rhin en 1999 est de 81,8 pour 100.000 habitants/an chez les hommes et de 67,6 pour 100.000 habitants/an chez les femmes. Ainsi, dans le Haut-Rhin, 1 homme sur 11 et 1 femme sur 15 risquent de développer un CBC avant 75 ans [Dandurand, 2008][Guillot, 2008].
Le CBC affecte 750.000 Américains tous les ans [Athar *et al.*, 2006]. Son incidence est corrélée avec la latitude géographique et l'exposition cumulative du soleil [Madan *et al.*, 2006]. La plupart des CBC surgissent sur les zones du corps exposées au soleil.

Etiologie

Le modèle étiologique principal du CBC est l'exposition solaire avec des épisodes brûlants à court terme [MacKie, 2006][Neale *et al.*, 2007]. Bien que l'exposition à la lumière UV soit l'agent cancérogène le plus fréquent, les rayons X, particulièrement s'ils sont superficiels, peuvent également produire des CBC.

1.1.3.1.2 Carcinomes Epidermoïdes

La plupart des CE évoluent en kératoses (actiniques) solaires et sont rarement agressifs. Cependant, les nouveaux CE qui se développent à partir des kératoses cicatricielles, des kératoses chroniques irradiées, des kératoses chimiques, des kératoses thermiques ou sur les muqueuses ont un plus grand potentiel malin [Friedman *et al.*, 1985][Rudolph *et al.*, 2000]. Ces CEs invasifs peuvent être biologiquement agressifs et ont tendance à se reproduire [Mullen *et al.*, 2006].

Le CE est une prolifération maligne des kératinocytes épidermiques, le plus abondant type de cellules de l'épiderme. À la différence de presque tous les CBC, les CE sont associés à un risque substantiel de métastase.

Aspects histocliniques

Contrairement aux carcinomes basocellulaires, les carcinomes épidermoïdes (figure 1.5) surviennent très fréquemment sur des lésions précancéreuses. Le carcinome épidermoïde apparaît habituellement après 60 ans. Il est plus fréquent chez l'homme que chez la femme. L'atteinte des zones photo exposée est observée dans plus de 80% des cas. Cliniquement, la lésion se présente sous forme d'une lésion nodulaire, croûteuse, souvent ulcérée. Un carcinome épidermoïde invasif est par définition une prolifération de kératinocytes malins au delà de la membrane basale de

FIGURE 1.5 – Exemples de Carcinomes Epidermoïdes : a) nodule hyperkératoide, b) kératose actinique et c) CE hyperbourgeonnant [Schwartz, 2008][Guillot, 2008].

l'épiderme. Le CE est constitué de kératinocytes de grande taille, organisés en travées ou en lobules, souvent mal limitées. Le degré de différenciation cellulaire est variable, certaines tumeurs étant constituées de kératinocytes très différenciées, d'autres au contraire très indifférenciées.

Epidémiologie

En France l'incidence des CE cutanés est plus faible que celle des CBC : 10 à 20 pour 100.000 habitants/an chez l'homme et 5 à 10/100.000 habitants chez la femme [DRENO and BERNIER, 2000][Basset-Seguin *et al.*, 2002].
Aux Etats-Unis, plus d'un million de cas de cancer de la peau non mélanocytaires sont estimés annuellement, dont 1/5 de CE [Scotto and T.R. Fears and, 1983][Jemal *et al.*, 2006][Jemal *et al.*, 2007]. En Hollande, le nombre de CE cutanés au cours des dernières années a augmenté, annuellement de 1,2% chez les hommes et de 3,4% chez les femmes [Czarnecki *et al.*, 2002][de Vries *et al.*, 2006]. En Espagne, l'âge moyen d'apparition de CE est de 77 ans. Dans 93,8% des cas, ces lesions sont dues à l'exposition solaire [Arranz *et al.*, 2004].

Etiologie

Le risque de CE est principalement lié à deux facteurs : la quantité d'exposition au soleil et le degré de pigmentation. L'exposition aux radiations ultra-violettes de la lumière du soleil est la cause la plus fréquente de développement de CE à partir de kératoses actiniques (AK) [Fears and Scotto, 1983][Press *et al.*, 1992], en particulier les rayonnements UVB (290 à 320 nm) et A (320 à 400 nm) [Rundel, 1983][Johnson *et al.*, 1992][Liang *et al.*, 1999]. Les rayonnements UV produisent en effet des mutations dans l'ADN [Grossman and Leffell, 1997]. D'autres facteurs d'induction de CE sont par exemple : des irradiations ionisantes, des agents chimiques mutagènes, etc.

1.1.3.2 États précancéreux et cancéreux précoces

Une lésion est qualifiée de "cancéreuse" si elle présente un caractère invasif. Les lésions précancéreuses regroupent toutes les lésions allant jusqu'au Carcinome In Situ (CIS), défini comme une lésion proliférative dysplasique pour laquelle le risque statistique d'évolution vers un cancer invasif est significativement élevé [Lacave *et al.*, 2005]. Les lésions précancéreuses sont donc une cible d'intérêt potentiel d'un dépistage qui doit permettre une diminution de la mortalité due au cancer. Le tableau 1.1 rappelle la définition de plusieurs termes relatifs à des notions histologiques dont certains seront utilisés dans la suite de ce travail.

Table 1.1 – Rappels de terminologie [Franco and Rohan, 2002].

Cancer	• Multiplication cellulaire autonome et anormale • Envahissement des structures voisines • Métastases
Tumeur	Terme non spécifique désignant une grosseur
Néoplasie	Processus d'expansion clonale dû à des ratés dans le contrôle moléculaire qui régule la prolifération et/ou la mort cellulaire ; pouvant être bénigne ou maligne
Hyperplasie	Augmentation de la taille d'un tissu ou d'un organe due à l'augmentation du nombre de cellules. Elle peut être physiologique, compensatoire ou pathologique
Métaplasie	Substitution adaptative d'un type tissulaire adulte par un autre type tissulaire ; sous (contrainte) un type tissulaire plus vulnérable est remplacé par un autre type tissulaire plus à même de résister à cette contrainte
Dysplasie	Prolifération cellulaire anormale dans laquelle on retrouve la perte de l'architecture et de l'orientation normale associée a une irritation et une inflammation chronique. Ce terme est souvent employé dans le contexte des lésions prénéoplasiques/précurseurs du cancer

1.2 Méthodes optiques pour le diagnostic

1.2.1 Méthodes de détection et caractérisation cutanée en clinique

La dermoscopie est une technique d'observation de la peau qui permet d'améliorer la qualité et la précocité du diagnostic de certaines tumeurs cutanées et est la plus répandue en pratique quotidienne. En dermoscopie, la lésion est examinée avec une lentille de grossissement x10 à x100 placée contre la peau en immersion dans une huile d'adaptation d'indice. Toutefois, la dermoscopie de lésions kératinocytaires semble en être encore à ses débuts car un consensus en ce qui concerne les critères de diagnostic n'a pas encore été créé [Mogensen and Gregor, 2007]. De plus cette technique basée sur l'appréciation visuelle dépend fortement de l'expérience personnelle du médecin.

1.2.2 Méthodes spectroscopiques de diagnostic *in vivo* : Principe et applications

Plusieurs techniques de diagnostic de lésions tumorales font l'objet de travaux de recherches fondamentaux et de transfert clinique (telles que les techniques de biopsie, marqueurs moléculaires, l'échographie, la microscopie confocale, spectroscopie, imagerie de fluorescence, dermoscopie, impédance électrique, etc.). Les approches non-invasives sont particulièrement bien adaptées pour une utilisation quotidienne en clinique, car elles fournissent un moyen de suivre l'évolution des lésions et de donner immédiatement l'information. Parmi elles, les méthodes optiques ont déjà montré leur potentiel de sensibilité pour détecter les lésions pré-cancéreuses et les tumeurs précoces [Bigio and Mourant, 1997] et d'éviter de nombreuses biopsies. C'est pourquoi, la spectroscopie optique (également appelée "biopsie optique") *in vivo* [Bigio and Mourant, 1997], est une technique potentiellement utile, car elle vise à fournir aux médecins des informations quantitatives, donc plus objectives.

Le principe des méthodes spectroscopiques repose sur le fait que l'émission spectrale d'un tissu renvoie des informations sur sa nature histologique, morphologique et biochimique. A partir de l'analyse comparative de spectres provenant de sites tissulaires sains et tumoraux, il est possible de déterminer des indicateurs spectraux permettant de les différencier.

L'intérêt clinique de l'approche spectroscopique réside dans son caractère non invasif et sa grande sensibilité, permettant la détection de lésions cancéreuses précoces à un stade où elles ne sont pas encore visibles. Différentes méthodes spectroscopiques peuvent être envisagées. Les spectroscopies optiques actuellement en cours d'évaluation sont, par ordre d'importance décroissante, la fluorescence, la diffusion élastique et la diffusion Raman.

La figure 1.6 présente le schéma de principe de l'instrumentation de base utilisée pour réaliser la spectroscopie tissulaire. En général on utilise une excitation lumineuse à une certaine longueur d'onde centrale et une largeur à mi-hauteur comprise dans la bande spectral UV-Visible-proche infrarouge ; un capteur à fibres optiques et un spectromètre.

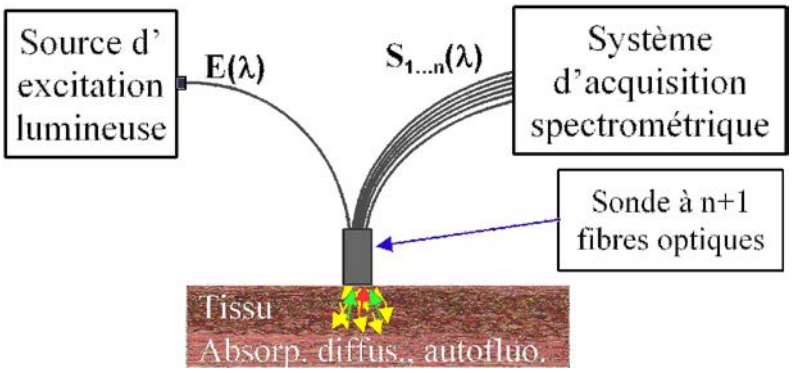

FIGURE 1.6 – Schéma de principe de base pour la spectroscopie tissulaire résolue spatialement (1 fibre d'excitation, n fibres d'acquisition).

1.2.2.1 Spectroscopie d'autofluorescence (mono et multi-excitation)

Dans les dernières décennies, la spectroscopie de fluorescence a fait progresser bon nombre de champs de recherche dont celui du diagnostic biomédical. Dans ce domaine, la spectroscopie de fluorescence est exploitée pour l'analyse de types variés d'échantillons, s'étendant de différentes espèces biochimiques in vitro identifiées (par exemple, NADH, tryptophane, etc.) aux organes humains *in vivo*. Avec des applications à de nombreuses pathologies dentaires, vasculaires, cardiaques, du cancer et beaucoup d'autres [Vo-Dinh, 2003].

Principe physique de fluorescence

Une molécule ne peut exister que dans un certain nombre d'états d'énergie discrets correspondant à des configurations électroniques données (figure 1.7). On distingue deux types d'états électroniques :

- les états singulets, désignés par S [4] dans lequel tous les électrons sont appariés, c'est-à-dire groupés par paires de spins opposés. Le spin global de la molécule est alors nul (S=0) ;

4. Les dénominations triplet et singulet viennent du fait que, lorsque la molécule est soumise à un champ magnétique, deux électrons non appariés possèdent trois niveaux d'énergie différents alors que deux électrons appariés n'en possèdent qu'un.

– les états triplets, désignés par T, dans lequel il existe deux électrons non appariés ayant un spin de même sens.

L'état électronique correspondant d'énergie la plus basse (état fondamental) est dans la plupart des cas un état singulet. Les états électroniques d'énergie supérieure à S_0 sont soit des états singulets de même configuration électronique que l'état fondamental (S_1, S_2, etc.), soit des états triplets (T_1, T_2, etc.).

La transition radiative est le passage d'une molécule d'un état d'énergie à un autre par absorption ou émission d'un photon. En absorbant un photon d'énergie appropriée, la molécule est portée dans un des niveaux vibrationnels de l'état excité électronique S_i et acquiert ainsi une énergie excédentaire par rapport à l'état fondamental. Cet excédent d'énergie va être restitué à l'environnement suivant différents mécanismes schématisés sur le diagramme de Jablonski représenté sur la figure 1.7.

Relaxation non radiative. La molécule est soumise à de nombreuses collisions au cours desquelles elle perd une fraction de son énergie et retourne ainsi au niveau vibrationnel inférieur $S_{1,0}$ de S_1. Ce phénomène très rapide (de l'ordre de 10^{-12} secondes) n'engendre pas d'émission lumineuse. A partir du niveau $S_{1,0}$ le retour à l'état fondamental peut s'effectuer par transition non radiative directe (retour non radiatif) ou passage à l'état triplet (transition inter-systèmes).

Emission de fluorescence. Dans le cas d'un retour radiatif, l'énergie est perdue par émission spontanée de photons (de fréquences supérieures par rapport à l'absorption) correspondant aux transitions entre le niveau $S_{1,0}$ et les différents niveaux vibrationnels de l'état fondamental. Cette émission lumineuse est appelée fluorescence. L'émission de fluorescence est un processus radiatif qui a une durée de l'ordre de quelques nanosecondes.

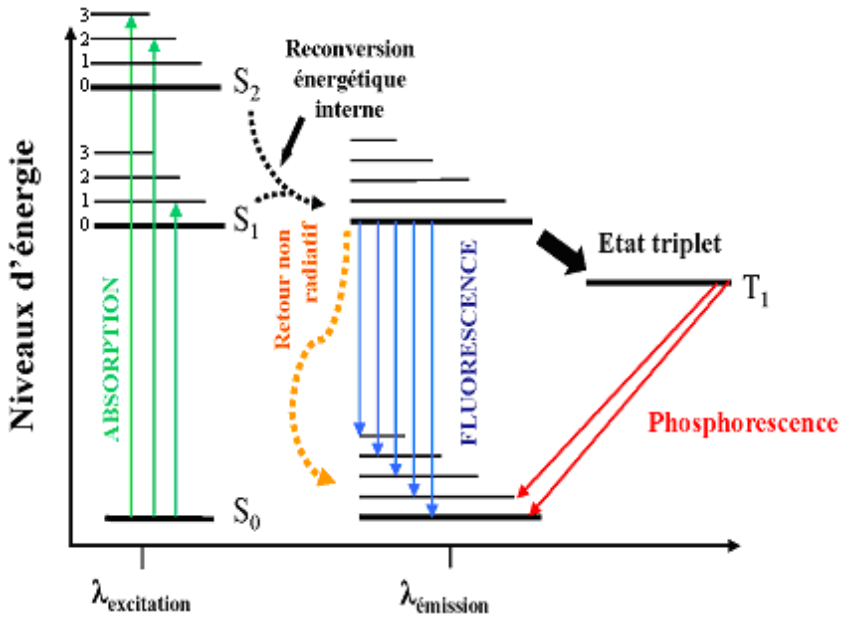

FIGURE 1.7 – Diagramme de Jablonsky représentant les différentes transitions énergétiques possibles entre les états singulets S_0 (stable), S_1 et S_2 (excités) et l'état triplet T_1.

Les méthodes diagnostiques de détection de tumeurs précoces exploitant le phénomène de fluorescence peuvent être regroupées dans deux catégories principales : celles qui détectent ou emploient des fluorophores exogènes ou des fluorophores précurseurs et celles qui visent des fluorophores endogènes.

L'utilisation des fluorophores exogènes

La méthode consiste à administrer au patient un fluorophore qui s'accumule préférentiellement dans les tissus tumoraux, à provoquer sa fluorescence par irradiation à une longueur d'onde appartenant à son spectre d'absorption et à mesurer l'intensité de fluorescence du site irradié.
Les tissus tumoraux présentant une concentration en fluorophore plus élevée que le tissu sain environnant émettent une fluorescence d'intensité supérieure, créant un contraste entre zones saines et tumorales qui permet de les différencier. Cette méthode permet de localiser la tumeur et d'évaluer son extension.

Nous avons choisi de privilégier une approche totalement non-invasive et donc de nous consacrer a la fluorescence endogène.

L'utilisation des fluorophores endogènes

En réponse à une excitation lumineuse appropriée allant de l'UV au visible, les fluorophores intrinsèques, c'est-à-dire présents naturellement dans les tissus biologiques sont susceptibles d'émettre une fluorescence (endogène) appelée autofluorescence.
Un grand nombre de fluorophores endogènes sont présent dans les tissus biologiques [Kortum and Muraca, 1996][Vo-Dinh, 2003]. La figure 1.8 montre des spectres typiques d'absorption et d'émission des principaux fluorophores endogènes de tissus biologiques.

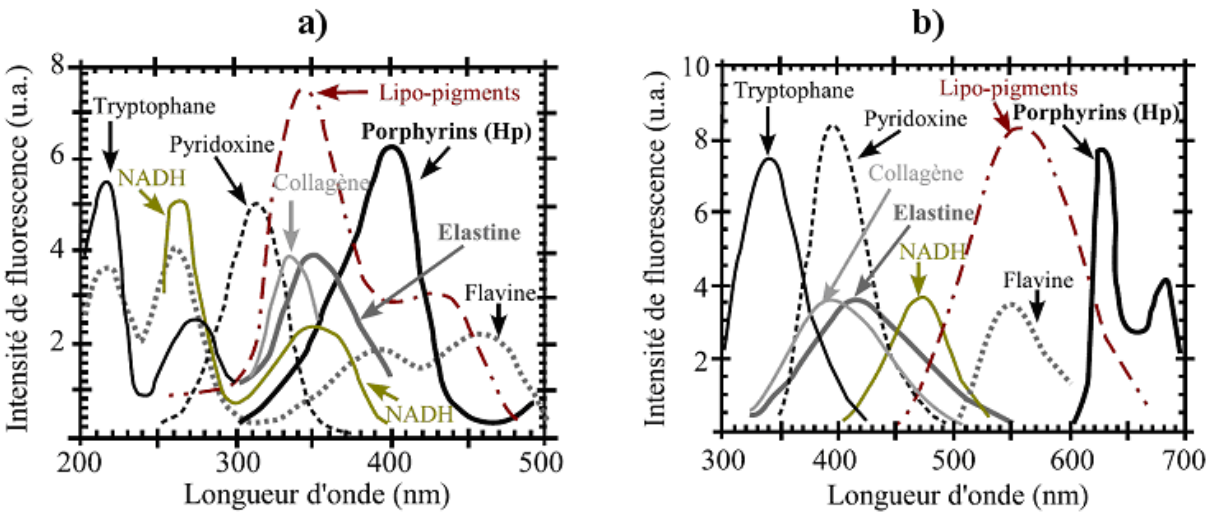

FIGURE 1.8 – (a) Spectres d'absorption, (b) Spectres d'émission de quelques fluorophores endogènes (modifié de [Wagnieres *et al.*, 1988]).

La majorité de ces espèces sont généralement associées aux protéines de la matrice structurelle des tissus (collagène et élastine [Valette, 2002] ou à diverses voies métaboliques cellulaires (NAD et NADH) [Wagnieres *et al.*, 1988]. Les espèces enzimatiques prédominantes dans cette catégorie incluent la forme réduite de Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen (NADH) ,

les flavines (FAD)[Lakowicz, 2006], et les lipo-pigments [Tsuchida *et al.*, 1987] pris de [Lakowicz, 2006]. Les autres fluorophores intrinsèques incluent des composés aromatiques, acides aminés tels que le tryptophane, la tyrosine, et la phénylalanine [Kortum and Muraca, 1996] ainsi que diverses porphyrines (hémoglobine, myoglobine, etc.) [Kortum and Muraca, 1996][Wagnieres *et al.*, 1988].

Le tableau 1.2 recense les longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission des principaux fluorophores endogènes et les longueurs d'onde d'absorption de chromophores des tissus biologiques.

Le nombre de fluorophores qui va être excité et l'importance de leur contribution respective à l'émission d'autofluorescence tissulaire dépendent de la longueur d'onde choisie pour illuminer le tissu. Par exemple, une excitation lumineuse dans le bleu (vers 470 nm) provoquera une forte émission des flavines (coefficient d'extinction molaire maximum autour de cette longueur d'onde), mais n'excitera pratiquement aucun autre fluorophore. En revanche, une longueur d'onde vers 330 nm permettra l'excitation du collagène, du NADH et dans une bien moindre mesure, des flavines. Selon la longueur d'onde d'excitation utilisée, on pourra donc observer de manière sélective les émissions des différents fluorophores et le spectre d'autofluorescence tissulaire résultera de la superposition de ces différentes émissions.

Principe de détection en cancérologie

Le principe de détection repose sur le fait que l'autofluorescence des tissus sains et tumoraux présente de fortes différences à la fois sur le plan de l'intensité et de la forme des spectres d'émission. En effet, l'autofluorescence tissulaire dépend de plusieurs paramètres qui varient suivant la nature saine ou tumorale des tissus : la concentration et la distribution spatiale des fluorophores dans le tissu, le métabolisme cellulaire (modification de l'état d'oxydo-réduction du NADH et des flavines, que peuvent être considérés comme des indicateurs du métabolisme cellulaire), la structure et la vascularisation tissulaire (angiogenèse tumorale).

Les tissus normaux, précancéreux et cancéreux présentent des différences au niveau des spectres d'intensité en autofluorescence, absorption et diffusion dans la bande Visible - Proche IR. Ces modifications spectrales sont associées aux altérations des types de tissus, des concentrations des fluorophores, de la structure et de la vascularisation des tissus qui varient suivant sa nature saine ou tumorale [Ramanujam, 2000b].

Si les principaux fluorophores responsables de l'autofluorescence sont bien identifiés, il faut garder à l'esprit que leurs émissions ne sont pas seulement proportionnelles à leurs concentrations tissulaires mais dépendent fortement de multiples facteurs : pH, liaisons aux protéines plus ou moins importantes et états d'oxydoréduction pour les cofacteurs, conformation des protéines pour les résidus tryptophane, etc. Enfin, l'intensité et la distribution spectrale de l'autofluorescence sont affectées par les propriétés optiques d'absorption et de diffusion des tissus. Ces propriétés, qui dépendent de la longueur d'onde, déterminent à la fois la profondeur de pénétration de la lumière excitatrice dans le tissu et la fraction de la lumière de fluorescence collectée.

Chaque cancer ayant un mode propre d'évolution selon sa localisation anatomique, son tissu d'origine et sa nature histologique, chaque type de tumeur nécessite une étude spécifique. Cependant, il existe des éléments caractéristiques indicateurs de la cancérisation d'un tissu que l'on retrouve dans la majorité des spectres tissulaires. Ces caractéristiques sont le reflet des changements structurels du tissu et de l'interaction de l'activité métabolique liée à la transformation néoplasique.

Table 1.2 – Excitations et émissions maximales des principales molécules biologiques qui présentent une fluorescence endogène par [Andersson-Engels and Wilson, 1992] et [Ramanujam, 2000b]

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

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

Table 1.3 – Principaux avantages et inconvénients de l'utilisation clinique de la fluorescence exogène et endogène

	Avantages	**Inconvénients**
Fluorescence exogène	– Un seul fluorophore prédomine – Forte intensité du signal	– Administration du fluorophore – Allergie – Toxicité – Sélectivité/affinité limitées
Fluorescence endogène	– Aucun produit à administrer au patient	– Information difficile à extraire car provenant de plusieurs fluorophores – Faible intensité du signal

Avantages et limitations de la spectroscopie d'autofuorescence

La spectroscopie d'autofluorescence est plus souvent utilisée que les techniques exploitant les fluorophores exogènes, compte tenu des contraintes liées à l'utilisation de marqueurs en clinique (autorisation de mise sur le marché difficile à obtenir, sélectivité moyenne, photosensibilité résiduelle). Le tableau 1.3 montre les principaux avantages et inconvénients de l'utilisation clinique de la fluorescence exogène et endogène.

Les principaux avantages cliniques de la détection par autofluorescence résident dans le caractère non invasif et atraumatique de la mesure. De plus, en raison de sa résolution spectrale elle présente une grande sensibilité à la composition biochimique des tissus, ce qui permet de révéler *a priori* l'existence de tumeurs précoces et de fournir de nombreuses informations sur la constitution des échantillons étudiés. Elle permet également d'accéder facilement à l'intérieur des cavités anatomiques en utilisant une sonde à fibres optiques flexible et de faible diamètre (en général < 2 mm).

Paradoxalement, l'inconvénient de cette méthode provient de sa richesse d'information : le spectre d'autofluorescence fournit une information globale dont les variations d'amplitude (pics, creux) sont dus à l'absorption par les chromophores et les fluorophores du tissu. L'interprétation quantitative des spectres pour connaître les mécanismes à l'origine des modifications lors de la cancérogénèse est difficile et les critères de discrimination entre tissus sains et tumoraux sont souvent déterminés de façon empirique. Néanmoins, la faible intensité des signaux d'émission d'autofluorescence mesurés est relativement bien compensée par la sensibilité des capteurs existants.

Spectroscopie de fluorescence (mono et multi-excitation)

La spectroscopie de fluorescence appliquée au diagnostic sur les tissus humains normaux et anormaux exige souvent une complète caractérisation des propriétés d'absorption et de fluorescence dans la bande de longueur d'onde UV-Vis-NIR [Zângaro *et al.*, 1996]. Ainsi, l'excitation à l'aide de plusieurs longueurs d'onde successives permet potentiellement d'exciter différents fluorophores, ayant pour résultat des modèles d'émission plus complexes sous la forme de matrices d'excitation-émission (EEMs) [Richards-Kortum et al.,, 1989], porteuse d'information plus complètes concernant les changements biochimiques comparée à l'autofluorescence avec une simple excitation.

Etat de l'art des travaux réalisés en LIFS [5] sur l'humain

La spectroscopie de fluorescence est utilisée pour étudier la composition chimique et l'organisation structurelle des milieux complexes comme les tissus. Initialement elle a été utilisée pour étudier les tissus *in vitro* et *ex vivo* et évaluer des caractéristiques spectrales visant à distinguer les tissus sains des tissus tumoraux.

De nombreux travaux ont été menés *in vivo* en mono-excitation pour la discrimination entre tissus normaux, inflammatoires, hyperplasiques et dysplasiques de la bouche [Mallia *et al.*, 2008], du sein [Hage *et al.*, 2003], de la peau [Brancaleon *et al.*, 2001], du col de l'utérus [Ramanujam *et al.*, 1994], et du côlon [Cothren *et al.*, 1990].

Seules quelques études utilisant des systèmes en multi-excitation-réception, ont été menées pour différencier les états sains, cancéreux et précancéreux.

[Diagaradjane *et al.*, 2005] ont utilisé 19 longueurs d'onde d'excitation entre 280-460 nm pour discriminer les états précancéreux de la peau de souris. Ils ont établi 5 catégories histologiques (normal, inflammation/hyperplasie, hyperplasie/dysplasie, CE modérément différencié et CE mal différencié) et ont mise en évidence 4 longueurs d'onde d'excitation (280, 320, 340, et 410 nm) discriminantes. Ils concluent à une augmentation moyenne de 11,6% de la précision de classification entre l'utilisation d'une seule longueur d'onde d'excitation et la combinaison de ces 4 longueurs d'onde d'excitation. Plusieurs fluorophores endogènes jouent un rôle important dans la discrimination des différentes étapes du processus de transformation du tissu (tryptophane, NADH, flavines et des porphyrines). Ils suggèrent que les fluorophores endogènes tryptophane et porphyrine peuvent être employées comme marqueurs de tumeur pour discriminer des changements néoplasiques précoces.

[Heintzelman *et al.*, 2000] ont utilisé des excitations comprises entre 330 et 500 *nm* pour différencier des tissus oraux normaux, précancéreux et cancéreux. A l'aide d'algorithmes discriminants multi-variés, ils ont montré qu'un ensemble d'excitations optimales (350, 380 et 400 *nm*), menait à une sensibilité de 100% et une spécificité de 88%. Ils ont notamment remarqué une forte absorption par l'hémoglobine à 420 nm, visible dans les spectres de fluorescence. Il est intéressant de noter que les spectres d'émission obtenus pour l'excitation à 400 nm font partie d'une majorité de combinaisons, suggérant que des différences dans l'absorption due à la perfusion soient porteuses d'informations utiles pour la diagnostic et par ailleurs que la combinaison des spectroscopies de RD et de fluorescence améliorent la performance diagnostique.

[Li and Xie, 2005] ont utilisé des excitations entre 260 et 540 nm pour différencier les tissus normaux et adénomateux du côlon. Ils ont remarqué que les longueurs d'onde d'excitation optimales pour diagnostiquer le cancer du colon étaient 340, 380, 460, et 540 nm ; avec une émission d'autofluorescence augmentée des phorphyrines caractéristique des tissus cancéreux (excitation supérieure à 380 nm).

A notre connaissance, trois études de spectroscopie d'autofluorescence sur la peau ont été menées *in vivo* chez l'homme pour tester la capacité à discriminer les tissus sains des lésions précancéreuses ou cancéreuses non mélanocytaires.

5. LIFS : « Light Induced Fluorescence Spectroscopy » ou Spectroscopie de Fluorescence Induite

Brancaleon et al. [Brancaleon *et al.*, 2001] en 2001 ont réalisé des mesures d'autofluorescence à 2 longueurs d'onde d'excitation (295 et 350 nm) chez 18 patients présentant des CBC (n=20) et des CE (n=5). Les mesures ont été réalisées sur les lésions (diagnostiquées par histopathologie a posteriori) ainsi que sur la peau considérée comme saine à environ 1 cm du bord de la lésion. Les résultats montrent que pour l'excitation à 295 nm les CBC présentent une intensité d'émission de fluorescence 2,9 (±1,4) fois plus importante que la peau saine alors que pour les CE le ratio est de 2 (±0,9). Pour l'excitation à 350 nm, l'intensité de fluorescence obtenue sur les lésions était en revanche plus faible et le ratio des intensités entre lésion et peau saine était de 0,72 (±0,14) et 0,85(±0,11) pour les CBC et CE, respectivement. Ils attribuent les principales variations d'émission de fluorescence au tryptophane et aux liaisons du collagène pour les excitations à 295 et 350 nm. Sur les lésions, l'accroissement d'intensité du tryptophane est attribué à une hyperprolifération cellulaire tandis que la décroissance d'intensité d'émission due au collagène proviendrait de la dégradation de la matrice extracellulaire par les enzymes.
Ils confirment à l'issue de cette étude que les lésions (CBC ou CE) ont des caractéristiques spectrales significativement différentes de la peau saine, et que la spectroscopie de fluorescence est donc un outil qui pourrait à terme être utilisé pour le diagnostic et la détection de marges de lésions non mélanocytaires dans un cadre clinique.

Panjehpour et al. [Panjehpour *et al.*, 2002] en 2002 ont réalisé une étude en autofluorescence à une seule longueur d'onde d'excitation (410 nm), chez 49 patients de 3 phototypes différents et présentant des CBC (88), des CE (13), des lésions précancéreuses (12 kératoses actiniques ou neavi dysplasiques) et des lésions bénignes (kératoses séborhéiques, neurofibromes, etc., n = 47). Leurs résultats indiquent une décroissance de l'intensité d'émission de fluorescence à 510 nm ainsi qu'un léger décalage vers les courtes longueurs d'onde des maxima d'émission pour les carcinomes comparés aux lésions bénignes ou à la peau saine ($I_{saine} > I_{benignes}$). Les performances de classification n'ont pas été exprimées en termes de sensibilité et de spécificité car dans leur cas, le groupe de données d'entraînement était le même que celui des données de validation. Ils ont donc calculé une plage de valeurs (aire sous la courbe entre 430 et 716 nm) correspondant à chaque groupe d'échantillons (sain, bénin, précancéreux, BC et CE), puis ont calculé les pourcentages d'échantillons pour lesquels les valeurs d'aire sous la courbe étaient comprises dans les plages de valeurs correspondantes. Leurs résultats de classification sont meilleurs pour le phototype I que pour les phototypes II et III, soulignant ainsi que la mélanine, absorbant fortement dans l'UV et le bleu, peut diminuer les performances diagnostiques de méthodes optiques.

Na et al. [Na *et al.*, 2000] en 2001 ont réalisé une étude sur la base d'une excitation unique à 337 nm, chez 13 patients avec 21 CBC. Les mesures de spectres d'intensité d'autofluorescence ont été réalisées sur les lésions et sur la peau saine environnante (entre 2 à 4 cm du bord de la lésion) avant et après traitement par 5-hALA [6] pour induire la fluorescence de la Protoporphyrine IX. Les résultats montrent d'une part une diminution de 53% de l'intensité émise à 455 nm par des lésions CBCs par rapport à celle de la peau saine, due à une diminution de la concentration de pro-collagène et NADH, et d'autre part une intensité de fluorescence de la PpIX 3,2 fois plus grande.

La profondeur de tissu sondée dépend de la géométrie de la sonde à fibres optiques, de la puissance de l'excitation, de la longueur d'onde d'excitation (dans la région UV/visible <700 nm, la lumière pénètre seulement les volumes superficiels de tissu sur quelques centaines de microns compte tenu de leur forte absorption (225 μm à $337nm$ [Koenig *et al.*, 1998]) et de la distance

6. 5 - Méthyl Ester d'Acide d'Aminolévulinique ou "5-Aminolevulinic Acid Methyl Ester"

entre les fibres d'excitation et de collection (DFEC). La profondeur sondée augmente avec la DFEC, et une DFEC de 250 μm permet par exemple de sonder jusqu'à 100 μm de profondeur de tissu à une longueur d'onde d'excitation de 442 nm [Katika and Pilon, 2006].

Plusieurs contraintes sont à prendre en compte dans l'application actuelle de ces techniques spectroscopiques d'autofluorescence. D'une part, leur sensibilité aux modifications inflammatoires entraîne notamment de nombreux faux positifs (test positif en l'absence de lésion). D'autre part, leur capacité de détection des différents stades d'évolution dysplasique n'est pas satisfaisante. En réponse à ces insuffisances, deux approches complémentaires ont été développées [Georgakoudi *et al.*, 2001][Muller *et al.*, 2003] :

- la modélisation des interactions de la lumière avec les tissus en vue d'identifier leurs propriétés optiques et remonter ainsi aux spectres intrinsèques des structures morphologiques (corrigés de la dispersion et de l'absorption) [Zonios *et al.*, 1996][Wu *et al.*, 1993][Biswal *et al.*, 2003],
- l'exploitation et la combinaison de données spectrales issues d'autres modalités utilisables simultanément (spectroscopies de diffusion).

1.2.2.2 Spectroscopie de diffusion élastique

Principe

La méthode repose sur le fait que la diffusion de la lumière incidente par un tissu est le reflet de sa morphologie du fait des variations d'indice de réfraction entre les différents éléments constitutifs de ce tissu. Un rayon lumineux de longueur d'onde λ tombant sur un milieu inhomogène peut soit se propager dans le milieu suivant sa direction initial, soit être dévié une fois (diffusion simple) ou plusieurs fois (diffusion multiple) de sa direction initiale (cf. Figure 1.9).

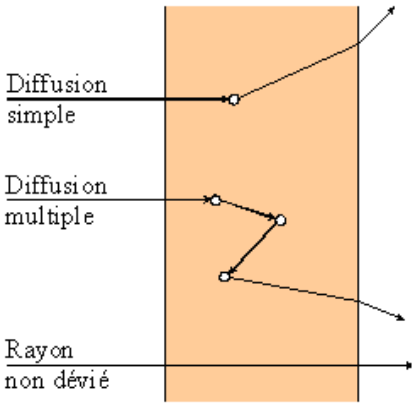

FIGURE 1.9 – Représentation schématique de la propagation directe (bas), simplement diffusée (haut) et multiplement diffusée d'un faisceau lumineuse.

La diffusion élastique correspond à une interaction entre les photons et les particules du milieu au cours de laquelle les photons gardent leur énergie initiale (pas de changement de longueur d'onde), mais changent de direction de propagation. On distingue trois types de diffusion suivant que la dimension des objets diffusants est très inférieure (diffusion de Rayleigh), à peu près égale ou très supérieure (diffusion de Mie) à la longueur d'onde du faisceau incident.

La caractérisation quantitative de la diffusion dans un milieu donné peut-être décrite par 3 paramètres :

- le coefficient de diffusion μ_s (cm^{-1}), défini par l'inverse du libre parcours de diffusion l_s défini comme la distance moyenne parcourue par un photon entre deux événements de diffusion (changement de direction),
- la fonction de phase p(θ) où θ, est l'angle de diffusion pris entre les directions des rayons incident et diffusé. La fonction de phase p(θ) décrit la distribution angulaire des évènements de diffusion, c'est-à-dire, la probabilité que la diffusion ait lieu dans la direction faisant l'angle θ avec la direction initiale,
- le facteur d'anisotropie g est défini comme la valeur moyenne du cosinus de l'angle de diffusion : g = <cos θ>. Si g=0, la diffusion est isotrope ; plus g s'approche de 1, plus la diffusion est anisotrope et orientée vers l'avant. Dans le cas d'une diffusion isotrope, la lumière est répartie dans une volume sphérique alors que dans le cas d'une diffusion très anisotrope, le volume sera elliptique (figure 1.10).

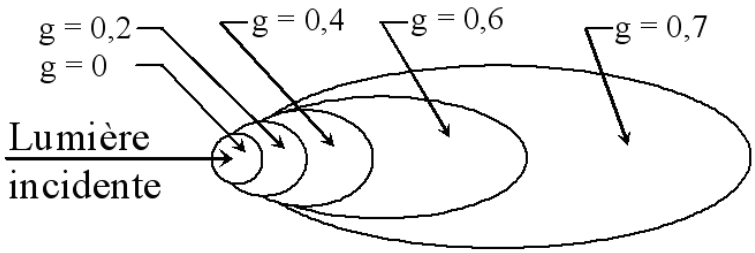

FIGURE 1.10 – Formes globales de la fonction de phase de Henyey-Greenstein pour différentes valeurs de g [Valette, 2002]].

Les paramètres μ_s et p(θ) dépendent de la longueur d'onde du rayonnement incident, de l'indice, de la taille et de la densité des particules diffusantes. Avec le coefficient d'absorption μ_a, ils constituent les propriétés optiques du milieu. La connaissance de μ_s, p(θ) et μ_a permet de décrire mathématiquement la propagation de la lumière dans le milieu.

La diffusion de la lumière par les tissus biologiques

Les tissus biologiques sont des milieux complexes, très hétérogènes et fortement diffusants. Leurs propriétés optiques varient non seulement d'un tissu à un autre mais peuvent varier à l'intérieur d'un même tissu en raison des hétérogénéités locales. La diffusion dans les tissus est causée par la présence de nombreuses particules diffusantes de tailles et d'indices de réfractions variés : cellules, organites subcellulaires tels que les noyaux et les mitochondries, vaisseaux sanguins, fibres de collagène, etc. La taille moyenne des diffuseurs étant de l'ordre du micron, ce qui est l'ordre de grandeur des longueurs d'onde du visible (0,5 μm), il s'agit donc principalement d'une diffusion de Mie. Le coefficient de diffusion μ_s décroît de façon monotone avec la longueur d'onde entre 350 et 950 nm. Pour les tissus mous, μ_s est compris entre 10 et 100 mm^{-1}.

Dans le domaine allant du rouge au proche infrarouge (600 à 1200 nm) où l'absorption globale des tissus est faible, la diffusion est très supérieure à l'absorption et joue donc un rôle prépondérant. L'action simultanée de l'absorption et de la diffusion détermine une région ou "fenêtre" spectrale entre 700 et 1100 nm pour laquelle la transmission est maximum, la pénétration lumineuse pouvant atteindre plusieurs millimètres à quelques centimètres.

Principe de la détection en cancérologie

La réflectance diffuse est une technique optique qui permet la quantification directe de propriétés du tissu en exploitant les modifications morphologiques cellulaires et intracellulaires associées à la transformation néoplasique du tissu, critère majeur de diagnostic histopathologique

sur les prélèvements biopsiques, tels que : l'augmentation de la taille du noyau [7], le rapport nucléo-cytoplasmique [8], l'angiogenèse [9], la dimension de fractale [10] et l'hyperchromatisme [11]. Ces transformations morphologiques produisent une modification des propriétés optiques du tissu et donc des caractéristiques de la lumière diffusée par celui-ci. Les spectres de diffusion élastique apparaissent ainsi comme des indicateurs de la morphologie du tissu [Valette, 2002][Marín *et al.*, 2005].

Avantages et limitations

Le principal avantage est la forte intensité du signal de diffusion (plusieurs ordres de grandeur supérieur au signal de fluorescence) qui permet d'obtenir un bon rapport signal sur bruit avec une instrumentation de coût modéré. La technique est rapide (quelques secondes) et facile à mettre en œuvre.
En revanche, les faibles différences entre les spectres de diffusion des tissus sains et tumoraux, rend délicate leur exploitation directe pour la détection des dysplasies modérées [Valette, 2002].

Applications

En général, les spectres de diffusion élastique sont traités pour obtenir des spectres en réflectance diffuse (RD). La réflectance diffuse est obtenue en divisant le spectre en diffusion mesuré sur le tissu biologique par celui mesuré sur un "standard de diffusion" de référence.

$$RD = \frac{DE_T}{DE_S} \tag{1.1}$$

avec :
RD = Réflectance Diffuse
DET = Diffusion Elastique mesurée sur le tissu
DET = Diffusion Elastique mesurée sur le standard de RD

Plusieurs équipes de recherche ont obtenu des résultats prometteurs en utilisant la RD pour la détection des états précancéreux et cancéreux des tissus épithéliaux. Les travaux confirment que les paramètres les plus discriminants en spectroscopie de RD sont liés aux propriétés de dispersion affectées par le rapport nucléo-cytoplasmique [Mourant *et al.*, 1995] et d'absorption affectée par la concentration totale du sang [Koenig *et al.*, 1998][Zonios *et al.*, 1999].

Utzinger et al. [Utzinger *et al.*, 2001a] en 2001 ont utilisé la RD résolue spatialement dans la bande 390-600 nm, pour caractériser les tissus ovariens normaux, bénins et cancéreux *in vivo*. Ils ont obtenu des valeurs de Se et Sp de l'ordre 86% et 80% respectivement et ont remarqué que

7. La taille d'un noyau cellulaire, qui est normalement de 4 à 7 microns, est typiquement supérieure à 10 microns pour une cellule cancéreuse [Valette, 2002].

8. Le rapport existant entre la taille du noyau et du cytoplasme augmente dans les dysplasies [Foraker, 1954][Maroulakou *et al.*, 1994].

9. L'angiogenèse est un mécanisme de néovascularisation prenant naissance à partir d'un réseau capillaire préexistant. L' angiogenèse pathologique est une caractéristique de diverses maladies ischémiques, inflammatoires et du cancer, en particulier pour la croissance des tumeurs et le développement des métastases [Carmeliet and Jain, 2000].

10. Pour l'analyse fractale d'une cellule ou d'un tissu (mesure morphométrique des structures irrégulières typiques), la caractéristique la plus commune est la dimension de fractale. Différentes tumeurs et cellules pathologiques possèdent aussi une dimension de fractale qui est plus grande que leur dimension topologique (euclidienne) [Demir and Yener, 2005][Cross, 1997][Bauer and Mackenzie, 1995].

11. Contenu plus élevé en chromatine qui rend les noyaux foncés lors de leur coloration pour l'examen au microscope [Valette, 2002]

certains pentes et valeurs d'intensités des spectres de RD (liées à l'absorption par l'hémoglobine et à la diffusion dans le tissu) permettent de discriminer efficacement les tissus ovariens normaux de ceux tumoraux.

Mirabal et al. [Mirabal *et al.*, 2002] ont utilisé la RD résolue spatialement dans la bande 355-655 nm, pour discriminer *in vivo* les tissus normaux et néoplasiques du col de l'utérus (Epithélium malpighien normal SN et columnar normal CN, lésions épidermoïdes de bas grade LGSILs et de haute grade HGSILs). Ils ont réalisé des classifications par paires de discrimination, dont : SN vs HGSIL Se=72%, Sp=81% ; CN vs HGSIL Se=72%, Sp=83% ; CN vs LGSIL Se=75%, Sp=89% ; SN vs LGSIL Se=72%, Sp=56% ; CN vs SN Se=89%, Sp=77%. En général les meilleurs résultats pour Se et Sp ont été obtenus pour une seule distance inter-fibre sans amélioration significative en ajoutant d'autres distances.

Marín et al. [Marín *et al.*, 2005] en 2005 ont exploité la RD résolue spatialement dans la bande 370-650 nm, pour discriminer les tissus précancéreux et cancéreux du col de l'utérus (dysplasies grave CIN3, modérée CIN2, légère CIN1, ou négative). 549 sites de 301 patients, ont été mesurés en utilisant 4 DFEC différentes. Leurs algorithmes de classification ont donné des précisions pour distinguer CIN3 = 98%, CIN2 = 94%, CIN1 = 93% et ND = 73%. Ils ont observé des différences significatives entre les spectres du tissu normal et précancéreux pour toutes les distances de réception, avec une intensité des spectres des tissus précancéreux inférieure à celle du tissu normal et une contribution de l'absorption de l'hémoglobine au travers des pentes spectrales contenant des informations d'intérêt pour la classification. Les spectres recueillis aux distances inter-fibres les plus courtes possèdent un potentiel supérieur pour la discrimination.

Zhu et al. [Zhu *et al.*, 2006] en 2006 ont utilisé des mesures en RD entre 350 à 600 nm, pour discriminer 85 échantillons de tissu de sein *ex vivo* (50 normaux/bénins et 35 cancéreux). Ils ont observé une augmentation d'intensité dans la bande 440-510 nm pour les tissus cancéreux et une diminution entre 510-600 nm pour les tissus normaux. A l'aide de différents types d'analyses de sélection de variables discriminantes ils ont obtenu des résultats de sensibilité et de spécificité de 86 et 80% respectivement.

Murphy et al. [Murphy *et al.*, 2005] en 2005 ont discriminé des mélanomes précoces de naevus commun et dysplasiques sur peau humaine, en utilisant la RD dans la bande spectrale 550-1000 nm. A partir de 115 patients, ils ont étudié 120 lésions dont 64 ont été diagnostiquées comme mélanome. Le meilleur classificateur pour distinguer les lésions bénignes des lésions cancéreuses, a donné des sensibilités/spécificités de 64/69% et de 72/82%.

1.2.2.3 Spectroscopie Raman

Le phénomène de diffusion inélastique de la lumière a été observé expérimentalement en 1928 par Raman et Krishnan [Raman and Krishnan, 1928]. Le rayonnement émis par des molécules sous forte irradiation lumineuse contient des photons de même fréquence que ceux du rayonnement incident, mais aussi des photons de fréquences différentes, mais avec une très faible occurrence (approximativement 1 photon sur 1 million ou 0.0001%). Ce changement de fréquence est appelé effet Raman.

La figure 1.11 montre le schéma du mécanisme de la diffusion Raman. Suite à une puissante excitation lumineuse monochromatique de type laser, la molécule absorbe un photon de fréquence V_{ex}, et acquiert une énergie excédentaire par rapport au niveau de départ. Selon le niveau occupé

initialement ($S_{0,0}$ ou $S_{0,1}$) la molécule va être portée dans des niveaux d'énergie vibrationnels intermédiaires dits virtuels (E' ou E"). La molécule ne reste pas dans ces niveaux, mais se désexcite très rapidement (en 10^{-11} à 10^{-13s}) en retombant sur un des niveaux $S_{0,1}$ (raie Stokes) ou $S_{0,0}$ (raies anti-Stokes). Si le milieu est à l'équilibre thermodynamique, le nombre de molécules est plus élevé dans l'état $S_{0,0}$ que dans l'état $S_{0,1}$, ce qui explique que les raies Stokes soient plus intenses que les raies anti-Stokes.

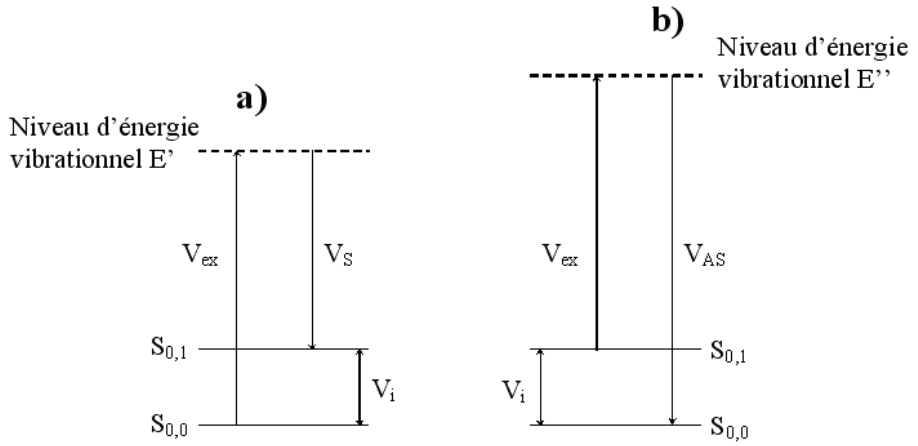

FIGURE 1.11 – Schéma du mécanisme de la diffusion Raman aboutissant à l'émission de raies Stokes (a) et anti-Stokes (b).

Le spectre Raman est exprimé en fonction de la différence d'énergie ($1/\lambda$ en cm^{-1}) entre les photons incidents et diffusés. La région comprise entre 200 et 2000 cm^{-1} est la plus utilisée. Un spectre Raman comprend un grand nombre de bandes étroites, de largueurs spectrales de 10 à 20 cm^{-1}, chaque bande représentant une vibration moléculaire spécifique.

Principe de la détection

La spectroscopie Raman est une technique très répandue en biochimie et en biologie où la plupart des molécules présentent une "activité Raman". D'abord employée pour étudier les molécules pures en solution, la spectroscopie Raman s'est étendue au domaine cellulaire et subcellulaire. Les changements biochimiques et structurels associés à la transformation néoplasique des tissus se traduisent par une modification des caractéristiques vibrationnelles de molécules telles que les protéines, les acides nucléiques et les lipides, provoquant une modification du spectre Raman tissulaire qui doit permettre de différencier les tumeurs des tissus sains. La spectroscopie Raman est une technique prometteuse pour étudier les tissus biologiques, et un outil clinique potentiellement important pour le diagnostic en temps réel de la maladie et l'évaluation *in situ* du tissu vivant [Hanlon *et al.*, 2000].

Avantages et limitations

La spectroscopie Raman est la méthode qui fournit l'information la plus riche au niveau moléculaire et structural car elle donne une information sur la composition chimique du tissu. Sa capacité à détecter des faibles modifications biochimiques induites par la transformation néoplasique lui donne a priori le potentiel de différencier les tumeurs bénignes des tumeurs malignes et de distinguer les différents grades de dysplasies. L'effet Raman est indépendant de la longueur d'onde excitatrice utilisée, ce qui permet de supprimer certains phénomènes indésirables (fluorescence) en choisissant une longueur d'onde adéquate.

La principale limitation de la spectroscopie Raman *in vivo* réside dans les nombreux problèmes techniques à surmonter pour réaliser une instrumentation clinique. Les autres inconvénients sont liés aux risques de présence de signaux de fluorescence (potentiellement beaucoup plus intense) et aux risques d'altération (décomposition) des échantillons due à l'échauffement.

Applications

Divers travaux de recherche ont été menés dans le cadre de la détection du cancer ou de lésions précancéreuses, par exemple, pour : le col de l'utérus *in vivo* [Utzinger *et al.*, 2001b] ou *in vitro* [Mahadevan-Jansen *et al.*, 1998] ou *ex vivo* [Krishna *et al.*, 2006], du poumon *ex vivo* [Yamazaki *et al.*, 2003] , de la peau *ex vivo* [Gniadecka *et al.*, 1997] ou *in vivo* et *in vitro* [Caspers *et al.*, 1998]], de la région nasopharyngée *ex vivo* [Lau *et al.*, 2003], et du sein *ex vivo* [Haka *et al.*, 2005].

Par exemple dans le travail de [Krishna *et al.*, 2006], des différences visibles sont observées entre les spectres Raman moyens recueillis sur col de l'utérus normal et tumoral. Comme montré dans la figure 1.12, le spectre normal (ligne pointillée) est caractérisé par un pic d'amide I plus large, et des crêtes à 1384, 1269, 939 et 854 cm^{-1}, qui sont absentes dans les spectres tumoraux. Ces caractéristiques spectrales de tissus normaux indiquent la présence des protéines structurales comme le collagène. De plus, les spectres tumoraux montrent un pic d'amide I plus pointu, un petit décalage à 1450 cm^{-1} et une bande plus pointue de l'amide III. Ces caractéristiques spectrales peuvent être reliées aux protéines, aux lipides et à l'acide désoxyribonucléique. Dans ce travail, les auteurs ont développé un méthode de discrimination en utilisant l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et ont obtenu 99,5% de sensitivité et spécificité .

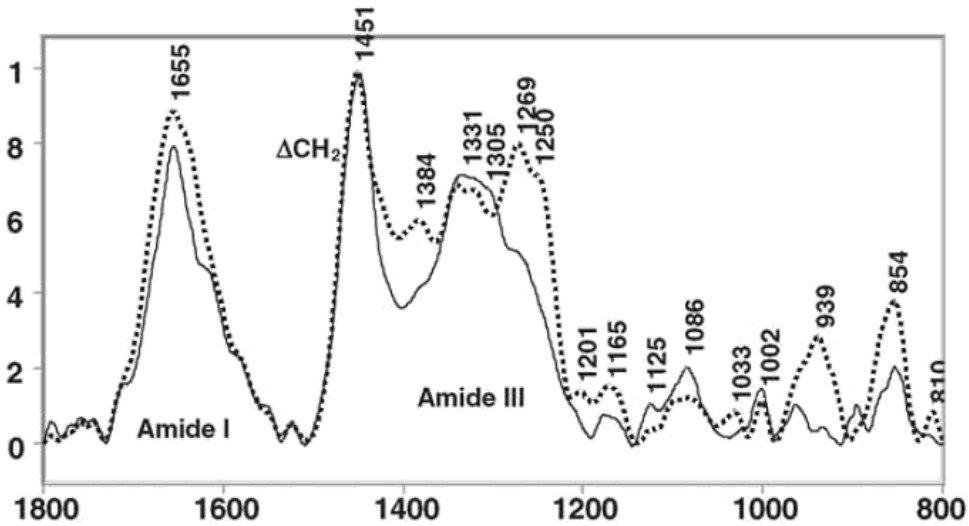

FIGURE 1.12 – Spectres Raman moyens des tissus du col de l'utérus normaux (ligne pointillée) et tumoraux (ligne continue) tirés de [Krishna *et al.*, 2006]

Ces études montrent que la spectroscopie de Raman peut être utilisée comme outil puissant pour sonder les changements biochimiques des tissus *in situ* et pour fournir des informations diagnostiques importantes. La portée des applications cliniques du Raman a été limitée par les évolutions technologiques, principalement dues au manque de sondes à fibres optiques capables d'acquérir effectivement des spectres de tissu à l'intérieur du corps [Motz *et al.*, 2004]. En conséquence, la majorité des recherches en matière de spectroscopie de Ramanin *in vivo* a été confinée aux organes et aux tissus "facilement" accessibles tels que la peau [Caspers *et al.*, 1998] et le col de l'utérus [Utzinger *et al.*, 2001b].

1.2.2.4 Spectroscopies Multi-modalités

Les techniques spectroscopiques décrites dans les sections précédentes fournissent des informations complémentaires sur différents aspects de la composition, de la morphologie, et de la biochimie des tissus [Georgakoudi *et al.*, 2003]. Il apparaît alors intéressant de combiner ensemble certaines de ces méthodes pour mieux détecter ces différents changements dans le milieu. Il est ainsi possible que l'efficacité de classification de différents états tissulaires soit augmentée et contribue à la compréhension des processus qui conduisent au développement d'une lésion. Enfin, associer plusieurs modalités de spectroscopie améliore la fiabilité du diagnostic : meilleure spécificité, meilleure sensibilité.

Principaux travaux et résultats publiés

Quelques travaux ont été menés en spectroscopie multi-modalités appliquée au diagnostic *in vivo* et à la discrimination des états pathologiques de tissus biologiques (précancéreux et cancéreux).

[Georgakoudi *et al.*, 2002] utilisent un système de Spectroscopie "Tri-Modale" pour différencier des lésions intra-épithéliales épidermoïdes cervicales (SILs) de non-SILs. Ils couplent l'autofluorescence, la diffusion multiple (RD) et la diffusion simple (light-scattering spectroscopy, LSS). La réflectance diffuse permet d'enregistrer et d'analyser séparément les photons rétrodiffusés, soit par diffusion multiple, soit par diffusion simple. Il est à noter que les auteurs utilisent le terme " elastic scattering spectra " pour les photons qui sont réfléchis à la surface du tissu après un seul événement de diffusion. D'autres équipes du laboratoire national de Los Alamos considèrent les "spectres de diffusion élastique" comme la résultante de diffusions multiples. Leur système permet d'enregistrer, dans un temps d'acquisition inférieur à la seconde, les spectres d'autofluorescence correspondant à onze longueurs d'onde d'excitation entre 337 et 650 nm, les spectres de diffusion multiple et simple dans la bande 350 - 700 nm. Pour l'excitation en multiple-AF, un laser azote (337 nm) excite successivement à grande vitesse 10 colorants différents. Les auteurs obtiennent une sensibilité et une spécificité respectivement de 62% et 92% en AF ; 62% et 82% en RD ; 77% et 83% en LSS, et 92% et 90% en tri-modalité. La combinaison des trois techniques permet donc d'obtenir de meilleurs résultats dans le cas des cancers du col de l'utérus.

[Palmer *et al.*, 2003b] et [Breslin *et al.*, 2004] utilisent la combinaison de plusieurs longueurs d'onde d'excitation d'AF dans l'intervalle 300 - 460 nm et de réflectance diffuse entre 310 et 600 nm, pour distinguer des tissus bénins et malins de sein *in vitro*. Les auteurs ont analysé la forme des spectres à l'aide d'outils de type SVM et d'ACP. [Palmer *et al.*, 2003b] ont obtenu une sensibilité et une spécificité plus faible en LSS qu'en AF à plusieurs longueurs d'onde d'excitation (70% et 92% versus 30% et 78%). Ainsi, l'application combinée des deux méthodes n'améliore pas, dans cette étude, la qualité du diagnostic.

Enfin, [Chang *et al.*, 2005] combinent les mesures en autofluorescence (donnant Se = 86% et Sp = 89%) et en réflectance diffuse (donnant Se = 74% et Sp = 89%) pour détecter les lésions pré-cancéreuses cervicales *in vivo* et constatent une amélioration de la spécificité mais surtout de la sensibilité de la méthode diagnostique aboutissant à Se = 87% et Sp = 91%.

Les informations finales essentielles restent la sensibilité et la spécificité. Ainsi, les résultats des travaux les plus récents ont permis d'obtenir des augmentations de sensibilité de 75% à plus de 95% et de spécificité de 45% à plus de 95% notamment en optimisant les longueurs d'onde d'excitation en fluorescence, caractérisant et ciblant des fluorophores les plus discriminants.

1.2.2.5 Evaluation d'une méthode diagnostique

Quelle que soit la méthode diagnostique étudiée, il est essentiel d'apprécier sa capacité à prédire la présence ou l'absence de maladie et de pouvoir comparer ses performances à un test de référence (" gold-standard ") et déterminer ainsi son applicabilité en routine clinique. Pour cela, on mesure deux paramètres :

- lorsque le test est positif, la probabilité d'être malade.
- lorsque le test est négatif, la probabilité de ne pas être malade.

Quatre situations d'un test diagnostique (le test peut être positif ou négatif et la maladie présente ou non) peuvent être caractérisées en termes de nombre ou de pourcentage de :

- Vrai Positif (VP) : résultat positif d'un test sur un sujet malade,
- Faux Positif (FP) : résultat positif d'un test sur un sujet sain,
- Vrai Négatif (VN) : résultat négatif d'un test sur un sujet sain,
- Faux Négatif (FN) : résultat négatif d'un test sur un sujet malade.

Les caractéristiques intrinsèques du test, sa capacité à classer correctement les personnes qui ont la maladie dans le groupe ayant un test positif et les personnes qui n'ont pas la maladie dans le groupe ayant un test négatif, sont décrites par la sensibilité et la spécificité.

La Sensibilité (Se) est la probabilité d'obtenir un test positif lorsque la maladie est réellement présente (équation 1.2). Lorsque la sensibilité d'un test augmente, le nombre de faux négatifs diminue.

$$Se = \frac{\text{Nombre de sujets malades avec test positif}}{\text{Nombre total de sujets malades}} = \frac{VP}{VP + FN} \tag{1.2}$$

La Spécificité (Sp) est la probabilité d'obtenir un test négatif lorsque la maladie est réellement absente (équation 1.3). Un test très spécifique générera peu de faux positifs.

$$Sp = \frac{\text{Nombre de sujets sains avec test négatif}}{\text{Nombre total de sujets sains}} = \frac{VN}{VN + FP} \tag{1.3}$$

Deux autres mesures donnent une estimation de la probabilité de la maladie en fonction des résultats du test. Elles définissent la fiabilité du test :

- la valeur prédictive positive (VPP, équation 1.4) est la valeur prédictive d'un test positif c'est-a-dire la capacité de prédire la présence de la maladie ;
- la valeur prédictive négative (VPN, équation 1.5) est la capacité de prédire l'absence de maladie.

La valeur prédictive d'un test varie en fonction de sa sensibilité, de sa spécificité et de la prévalence de la maladie. La fiabilité d'un test mesure la proportion de résultats corrects (vrais positifs et vrais négatifs). Le tableau 1.4 résume les relations entre les résultats du test et la présence ou non de la maladie, déterminée par un diagnostic approprié.

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP} \tag{1.4}$$

TABLE 1.4 – Définition des caractéristiques d'un test de dépistage.

		Cancer	
		Présent	**Absent**
Test de dépistage	+	VP	FP
	-	FN	VN

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN} \tag{1.5}$$

$$\text{Fiabilité du test} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} \tag{1.6}$$

Mesures combinées entre sensibilité et spécificité

La sensibilité et la spécificité sont les mesures de base de la précision d'un test diagnostique. Lorsqu'on compare deux tests diagnostiques, il est plus facile de comparer une seule valeur que d'en comparer deux, i.e. la valeur de Se et la valeur de Sp [Obuchowski, 2003]. Alors, un compromis doit être trouvé entre Se et Sp. La courbe ROC (" Receiver Operating Characteristic " ou courbe caractéristique d'efficacité) permet d'étudier les variations de la spécificité et de la sensibilité d'un test pour différentes valeurs du seuil de discrimination [Zou *et al.*, 2007]. La courbe ROC (cf. Figure 1.13) est un graphique du test de Se (axe X) vs 1-SP (axe Y) ; plus la courbe ROC s'éloigne de la diagonale D pour rejoindre l'angle supérieur gauche (A), plus le test diagnostique est globalement "efficace". Le seuil est idéal quand Se = 1 et 1-Sp = 0, puisqu'il permet de séparer totalement tous les positifs des négatifs, sans faux positif, ni faux négatif. B et C sont les courbes schématiques les plus réalistes de deux examens. Quel que soit le seuil, B a une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité que C.

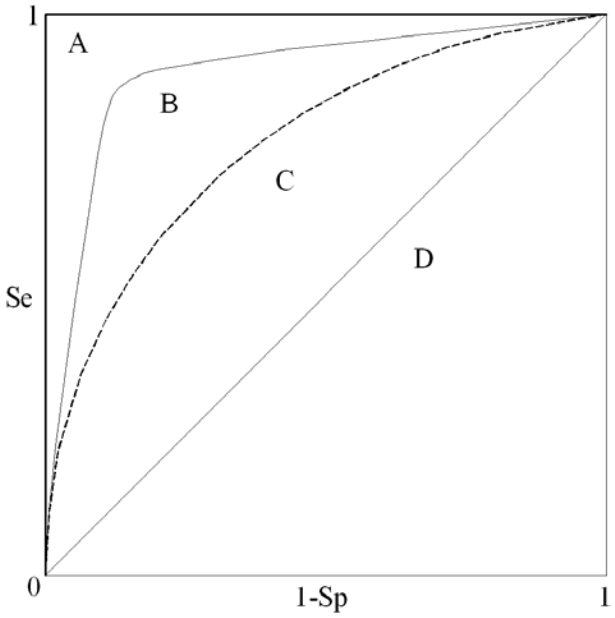

FIGURE 1.13 – Exemple de courbe ROC, avec Se la sensibilité et 1-Sp le taux de faux positif.

1.3 But et objectifs des travaux de thèse : Problématiques

Notre travail de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés au laboratoire, en particulier par [Chalau, 2004] en diffusion élastique, par [Ybarra, 1999] en autofluorescence sur la peau et par [Péry, 2007] en spectroscopie fibrée bimodale (mono-AF et RD). Le travail de [Péry, 2007] a été consacré à la caractérisation de tissus biologiques *in vivo*, en particulier les tissus sains et tumoraux dans la vessie.

Dans cette partie, nous rappelons les problématiques cliniques motivant notre étude et exposons les objectifs de nos travaux, les verrous techniques et méthodologiques liés au développement et à la validation expérimentale d'une méthode de diagnostique tissulaire par spectroscopie bimodale en multi-excitation d'AF et en RD résolue spatialement et son application pour la détection de lésions cancéreuses *in vivo*.

Les objectifs spécifiques de nos travaux concernent trois axes principaux :
- **l'instrumentation**, (conception, développement, mise au point, caractérisation métrologique),
- la mise en place d'**un protocole expérimental pré-clinique** pour la validation *in vivo*,
- **le traitement des données spectroscopiques** (prétraitements, extraction/sélection de caractéristiques) en vue d'une classification automatique des types de tissus.

1.3.1 Développement instrumental

Notre objectif est de concevoir et développer un nouveau dispositif instrumental adapté aux mesures *in vivo* (sur la peau) et capable de réaliser des mesures spectroscopiques résolues spatialement en multi-excitation d'autofluorescence et en réflectance diffuse. Cet instrument fibré doit permettre d'acquérir dans un temps raisonnable ($<$ 1 min) plusieurs émissions spectrales tissulaires colocalisées. Après avoir établi le type d'instrument à développer, plusieurs problèmes sont envisagés : d'abord la génération des multiples excitations pour l'autofluorescence et la diffusion élastique puis l'acquisition colocalisée des spectres sur un même site, et les caractéristiques de la sonde à fibres optiques.

Plus précisément, le système développé doit pouvoir :
- fournir différentes excitations en bande étroite dans la gamme spectrale UV-Visible (spécifiquement entre 350 et 450 nm) pour l'autofluorescence et une excitation à large bande en lumière blanche (entre 350 et 800 nm) pour la diffusion élastique,
- permettre une mesure colocalisée spatialement des spectres d'autofluorescence et de diffusion élastique,
- acquérir simultanément les spectres de fluorescence endogène et de diffusion élastique correspondant à différentes distances entre une fibre d'excitation et plusieurs fibres de réception, et
- gérer de façon automatique la synchronisation entre les différentes excitations et acquisitions des émissions spectrales.

Pour concevoir et développer une nouvelle instrumentation adaptée à l'étude prévue, la première phase consiste à évaluer l'instrumentation pré-existante dans le laboratoire afin d'analyser les optimisations à réaliser ou les éléments utilisables. La seconde étape vise à réfléchir sur la conception des parties manquantes pour le nouveau système instrumental et finalement son développement, sa réalisation et son automatisation.

Suite au développement de l'instrumentation, une méthode de calibrage devra être établie afin de réaliser/obtenir des mesures spectroscopiques répétables et comparables en corrigeant ou compensant notamment les variations ou perturbations sur les mesures dues aux composants optiques et électroniques de l'instrumentation développée.

Le chapitre 2 décrit l'étude instrumentale menée et le développement du dispositif, prenant en compte les différentes contraintes techniques, technologiques et de calibrage rencontrées.

1.3.2 Protocole expérimental et validation pré-clinique

L'évaluation pré-clinique de la capacité de la spectroscopie pour la détection *in vivo* des états précancéreux de peau pose la difficulté de suivre des étapes précoces de cancérogenèse identifiées ou identifiables d'un point de vue histo-pathologique. Le modèle animal est en l'occurrence le seul moyen d'obtenir des prélèvements de tissu à chaque étape de la cancérogenèse. Les contraintes à résoudre sont que le modèle animal doit être proche de l'histologie humaine, et que la méthode d'induction tumorale soit aussi proche que possible de l'étiologie humaine.

La définition des critères de choix et la solution mise en œuvre d'un modèle animal tumoral adapté aux besoins du protocole envisagé (histologie, mode d'induction des tumeurs, étiologie), pour l'identification d'états sains, hyperplasiques et dysplasiques est détaillée au chapitre 3.

1.3.3 Traitement des données

Notre objectif final est de développer et valider une méthode automatique de classification/évaluation des états précancéreux de la peau (sains, hyperplasique et dysplasiques) tels que définis précédemment à partir du prétraitement des spectres et du traitement des données spectroscopiques acquises. Cette méthode doit être capable de traiter un grand volume de données et d'extraire les combinaisons de données, fournies par les deux types de spectroscopie (autofluorescence et diffusion élastique), les plus performantes pour discriminer les états précancéreux définis. Le prétraitement des données spectroscopiques vise à rendre manipulables et comparables tous les spectres collectés quelque soient les conditions d'acquisition. Il inclut les étapes de filtrage, de normalisation et de correction notamment.

La méthode de traitement comprend l'extraction, la sélection et la classification de caractéristiques les plus discriminantes pour les différentes classes histologiques définies.

Après étude bibliographique des différents algorithmes de prétraitement, d'extraction, de sélection, de réduction et de classification existants et utilisés, nous présentons dans le chapitre 4 le choix des techniques adaptées à nos besoins, le développement et l'évaluation des algorithmes en utilisant plusieurs combinaisons des différentes émissions en autofluorescence et en réflectance diffuse en fonction des longueurs d'onde et des distances, et l'évaluation de plusieurs techniques de classification en visant à améliorer l'efficacité de la méthode diagnostique en termes de Sensibilité et de Spécificité.

2

Instrumentation et expérimetation *in vivo*

Présentation détaillée du développement instrumental avec une étude bibliographique, des prototypes testés, la solution retenue, construit, et sa caractérisation métrologique. Finalement, la description synthétique des principaux éléments du protocole expérimental.

2.1 État de l'art en instrumentation pour la spectroscopie bimodale (fibrée)

Au cours des dernières années, la capacité des techniques de mesures spectroscopiques en réflectance diffuse et surtout en autofluorescence pour le diagnostic des tissus biologiques a remarquablement progressée. Ces progrès sont liés fortement aux avancées technologiques de l'instrumentation utilisée. La réussite des expériences en spectroscopie exige une attention particulière aux détails expérimentaux et une compréhension approfondie du fonctionnement de l'instrumentation.

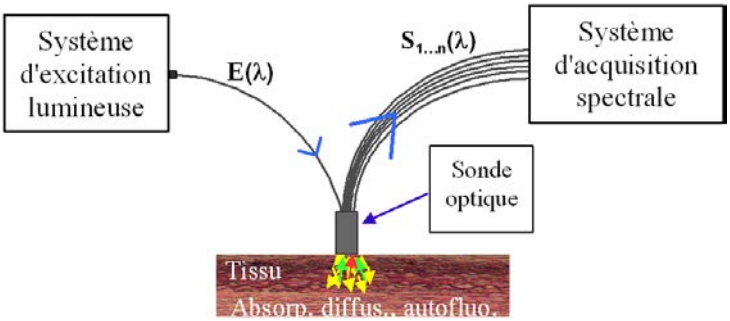

FIGURE 2.1 – Configuration expérimentale générale pour les expériences de spectroscopie fibrée résolue spatialement en autofluorescence et en réflectance diffuse.

La figure 2.1 montre la configuration expérimentale générale pour les expériences de spectroscopie fibrée résolue spatialement en autofluorescence et en réflectance diffuse, composée de 3 grandes parties : a) un système d'excitation lumineuse, b) un système d'acquisition spectrale, c) une sonde multi-fibres optiques. Une description des différentes solutions techniques et technologiques pour chaque partie des systèmes d'instrumentation développés et mis en œuvre dans le cadre de travaux publiés durant les dernières années est donnée dans les sections suivantes.

2.1.1 Les systèmes d'excitation lumineuse

2.1.1.1 Excitation d'AF

Pour la spectroscopie d'autofluorescence une excitation monochromatique (bande étroite de longueurs d'onde de largeur à mi-hauteur, de quelques nanomètres) dans la bande spectrale UV-Visible est nécessaire [Ramanujam, 2000a][Ramanujam, 2000b].

Dans les premières études réalisées en autofluorescence, une large bande d'excitation de 250 à 450 nm était utilisée, excitant ainsi la plupart des fluorophores endogènes [Ramanujam, 2000a][Ramanujam, 2000b] et conduisant à une émission de fluorescence correspondant à la superposition des émissions de tous les fluorophores.
Les avancées technologiques au niveau des sources d'excitation lumineuses "quasi- monochromatiques", ont permis leur mise en œuvre en spectroscopie d'autofluorescence afin d'étudier les contributions "individuelles" des fluorophores endogènes de façon à pouvoir différencier et discriminer divers états tissulaires tumoraux.

Les excitations monochromatiques typiquement utilisées sont issues de LASER, de lampes large bande (lumière blanche) suivies d'un monochromateur ou de filtres optiques, de diodes électroluminescentes.

Ces sources d'excitation pour l'autofluorescence peuvent être classées en deux groupes : sources de mono-excitation (1 seule longueur d'onde) et sources de multi-excitation (plusieurs (longueurs d'onde) d'excitation).

2.1.1.1.1 Sources de "mono-excitation" d'autofluorescence

Il s'agit des sources mises en œuvre dans le cadre de travaux utilisant une seule longueur d'onde d'excitation.

Wood's Lamp

Une des premières sources d'excitation utilisées pour observer la fluorescence est la lampe de Wood, conçue par Robert Williams Wood en 1903 en utilisant un filtre passe-bande UV entre 320 et 400 nm avec un pic maximal à 365 nm ("Wood's glass").

En 1924 Policard fut l'un des premiers à observer l'autofluorescence rouge de tumeurs excitée par une lampe de Wood [Policard, 1924]. Il a suggéré que l'hematoporphyrine IX était le fluorophore responsable de cette émission.
Gougerot et Patte [Gougerot *et al.*, 1939] en 1939 et Rochese et al. [Ronchese *et al.*, 1954] en 1954 ont observé la fluorescence rouge émise par des carcinomes de peau humaine en utilisant l'excitation de cette lampe UV et en 1960, Ghadially et Neish [Ghadially and Neish, 1960] ont rapporté que la protoporphyrine IX était le responsable de l'autofluorescence rouge dans les tumeurs chimiquement induites sur la peau de lapins.

Lampe large bande filtrée

Des études en spectroscopie de fluorescence avec une excitation quasi-monochromatique en utilisant une lampe large bande et un filtre optique passe-bande ont été réalisées par Lohmann et al. [Lohmann and Paul, 1988][Lohmann *et al.*, 1991] en 1988 et en 1991. Ils ont utilisé une lampe à haute pression de mercure suivie d'un filtre passe-bande 366/11 (Schott, Mainz) pour obtenir un faisceau quasi-monochromatique centré à 366 nm pour détecter et différencier des mélanomes de peau humaine.

LASER

Fournissant un rayonnement lumineux directif et quasiment monochromatique, le laser est la source d'excitation la plus employée pour la spectroscopie d'autofluorescence appelée "Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy" (LIFS) [Mycek and Pogue, 2003]. Par exemple, Cothren et al. [Cothren *et al.*, 1990] en 1990 ont utilisé un LASER 370 *nm* à colorant pompé par un LASER Azote à 337 *nm*, pour discriminer les tumeurs bénignes de tissus gastro-intestinaux. Ramanujam et al. [Ramanujam *et al.*, 1994] en 1994 ont utilisé un LASER 337 *nm* pour discriminer des tumeurs du col d'utérus. Bourg-Hecly et al. [Bourg-Heckly *et al.*, 2000] en 2000 ont utilisé un LASER 330 *nm* pour discriminer des dysplasies et des carcinomes précoces de l'oesophage. Panjehpour et al. [Panjehpour *et al.*, 2002] en 2002 ont utilisé un LASER 410 *nm* à colorant pompé par un LASER Azote, pour discriminer différents types de carcinomes cutanés. Mallia et al. [Mallia *et al.*, 2008] en 2008 ont utilisé un LASER à 404 *nm* pour discriminer des tumeurs précancéreuses de tissus oraux humains.

2.1.1.1.2 Sources de "multi-excitation" d'autofluorescence

L'utilisation de plusieurs pics d'excitation centrés à différentes longueurs d'onde permet d'exciter différents fluorophores, ayant pour résultat des modèles plus complexes d'émission avec potentiellement plus d'information concernant les changements biochimiques qu'en utilisant une seule excitation, et avec une plus grande probabilité de distinguer les tissus sains et pathologiques [Bigio and Mourant, 1997].

Les spectres d'émission d'AF acquis pour différentes excitations sont regroupés sous la forme d'une matrice d'excitation émission (EEM) [Richards-Kortum et al.,, 1989][Zângaro *et al.*, 1996] [Tunnell *et al.*, 2003].

LASER

Ramanujam et al. [Ramanujam *et al.*, 1996] en 1996 ont utilisé des excitations à l'aide de deux LASERs (380 et 460 nm) pour différencier *in vivo* des tissus sains et cancéreux du col de l'utérus.
Wu et Qu [Wu and Qu, 2006] en 2006 ont utilisé des excitations à l'aide de 4 LASERs (trois LASERs solide à 355, 457 et 473, et un LASER Ti : saphir réglable entre 375-435 nm) pour investiguer les caractéristiques de fluorescence des tissus oraux et oesophagiens de lapin et du col de l'utérus humain.
Zangaro et al. [Zângaro *et al.*, 1996] et Tunell et al. [Tunnell *et al.*, 2003] ont construit une source d'excitations LASERs à 9 colorants (entre 442-480 nm) disposés sur une roue mobile et pompés par un LASER XeCl excimer à 308 nm.

Lampe et monochromateur [12]

Diagaradjane et al. [Diagaradjane *et al.*, 2005] en 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 460 nm tous les 10 nm.

12. Un **monochromateur** est un dispositif utilisé en optique pour sélectionner une gamme la plus étroite possible de longueurs d'onde à partir d'un faisceau lumineux de gamme de longueurs d'onde plus large. Pour séparer ces différentes longueurs d'onde d'un faisceau lumineux, un monochromateur peut utiliser soit le phénomène de dispersion de la lumière par un prisme, soit le phénomène de diffraction par un réseau ou par un cristal. Il comprend généralement un système mécanique permettant de diriger le faisceau de longueur d'onde choisie vers une fente de sortie.

En 1991, Senga et Minami [Senga and Minami, 1991] ont développé un spectrofluorimètre compact dont la source est constituée d'une lampe Xénon (150 W) à arc et d'un monochromateur holographique (Jobin-Yvon, H20-VIS) couplé à un moteur pas-pas pour sélectionner automatiquement la longueur d'onde d'excitation voulue (entre 300-550 nm).

LED et lampe large bande filtrée

Bien qu'elles constituent des sources moins coûteuses par rapport aux systèmes à LASER et à lampe avec monochromateur, les sources à LED et à lampe avec filtres constituent des options d'excitation qui ne sont pas très utilisés dans le cadre d'études *in vivo* notamment à cause des contraintes au niveau mécanique, optique et d'optimisation de la puissance d'excitation nécessaire pour réaliser la spectroscopie d'autofluorescence tissulaire.

En 2002, Hart et al. [Hart and JiJi, 2002] ont développé un spectrofluorimètre dont la source d'excitation était constituée d'une série de 7 diodes électroluminescentes (370, 430, 470, 505, 530, 590 et 636 nm).

En 2004 Gouzman et al. [Gouzman *et al.*, 2004] ont également développé un système de spectrofluorimétrie avec une source d'excitation basée sur une Lampe Halogène suivie de deux filtres interférentiels linéairement variables.

2.1.1.2 Excitation en RD

La réflectance diffuse est obtenue en divisant le spectre de diffusion élastique mesuré sur le tissu par celui mesuré sur un standard de référence, qui doit être caractérisé par une diffusion isotrope (surface lambertienne) et par une réponse spectrale uniforme. Par exemple, un diffuseur Lambertien presque parfait sur une gamme large de longueurs d'onde comprise entre 250 et 2500 nm (Oriel Corporation, model 70496) est utilisé en 1993 par Zeng et al. [Zeng *et al.*, 1993].

Pour la spectroscopie de réflectance diffuse, des excitations large bande dans la gamme 280-1100 nm peuvent être utilisées. Plusieurs études en réflectance diffuse sur la détection de différents états tumoraux de tissus ont été menés à l'aide de sources large bande (principalement des lampes de type Xénon, Deuterium, etc.) suivies de filtres passe-haut ou de monochromateurs configurés en ordre zéro [Bigio and Mourant, 1997]. Par exemple, Marín et al [Marín *et al.*, 2005] en 2005 et Mirabal et al [Mirabal *et al.*, 2002] en 2002 ont utilisé une lampe Xénon (150 W) suivie de filtres passe-bande pour réaliser des mesures entre 355 et 650 nm dans une étude pour distinguer tissus normaux, précancéreux et tumoraux du col de l'utérus. Murphy et al [Murphy *et al.*, 2005]] en 2005 ont utilisé une lampe tungstène-halogène suivie d'un filtre passe-bande pour réaliser des mesures dans la bande spectrale 550-1000 nm afin de différencier des naevus communs dysplasiques et des mélanomes de la peau.

2.1.1.3 Excitation bimodale (AF et RD)

Plusieurs travaux ont montré que le couplage de plusieurs modalités de spectroscopie améliore les performances de diagnostic des états précancéreux et cancéreux de tissus biologiques (section 1.2.2.4).

En 1993 Zeng et al. [Zeng *et al.*, 1993] 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 (1000 W, $200 - 1100$ nm) suivie d'un monochromateur donnant des excitations à bandes étroites en fluorescence. 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.

En 1999 Zuluaga et al. [Zuluaga *et al.*, 1999] ont développé un système de mesures en réflectance diffuse (entre 380 et 950 nm) résolue spatialement et en fluorescence (excitations entre 330 et 550 nm, bande d'émission entre 380 et 700 nm). Ils ont utilisé une lampe Xénon à arc (150 W, sans émission d'ozone) munie d'un réflecteur sphérique suivie 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 $700 - 978$ nm).

En 1996 Zângaro et al. [Zângaro *et al.*, 1996] ont développé un système de mesures combinant autofluorescence et réflectance diffuse ; ce système a été amélioré par Tunell et al. en 2003 [Tunnell *et al.*, 2003]. Cet instrument dispose d'une lampe Xénon 300 W pour l'excitation en réflectance diffuse ($300 - 800$ nm) et de dix excitations LASER (308 à 480 nm) pour la fluorescence, dont 9 sont des LASER à colorant (entre 442 et 480 nm) disposés sur une roue et pompés par un LASER XeCl excimer à 308 nm (8 nm $FWHM$).

2.1.2 Les systèmes d'acquisition spectrale

Le système d'acquisition spectrale mis en œuvre en 1993 par Zeng et al. [Zeng *et al.*, 1993] est un spectrographe (Jarrell-Ash Monospec 27), muni de 2 réseaux de diffraction holographique permettant de couvrir différentes bandes de longueurs d'onde (300 traits/mm blazé à 500 nm et 150 traits/mm blazé à 450 nm) et suivis de deux détecteurs. Le premier, utilisé pour l'autofluorescence, est une barrette intensifiée de 700 diodes au silicium (EG & G PARC, 1455R 700HQ, 350 à 900 nm) avec un gain variable et le second, pour la réflectance diffuse, est une barrette non-intensifiée de 1024 diodes (EG & G PARC, 1453A, 180 à 1100 nm).
Zuluaga et al. [Zuluaga *et al.*, 1999] en 1999 et Tunell et al. en 2003 [Tunnell *et al.*, 2003] ont utilisé un spectrographe imageant muni d'un réseau de diffraction holographique 150 traits/mm blazé à 380 nm et une caméra CCD refroidie thermo-électriquement.

2.1.3 Les sondes fibrées

Pour les systèmes de spectroscopie optique fibrée, différentes configurations géométriques de sonde multi-fibrées (fibres d'excitation et de réception) ont été évaluées et utilisées afin d'optimiser l'acquisition des spectres d'émission et de sonder différentes surfaces et profondeurs de tissu (spectroscopie résolue spatialement).

En 1993 Zeng et al. [Zeng *et al.*, 1993] ont utilisé une sonde à deux fibres optiques (une pour l'excitation et l'autre pour l'émission) de 1 millimètre de diamètre de cœur chacune (gamme spectrale de transmission : 200-2400 nm). En réglant l'angle entre la fibre excitatrice et la fibre de collection, ils ont montré que la profondeur de tissu sondée en réflectance diffuse varie avec l'angle entre les fibres. Ainsi les pics liés à l'absorption de l'hémoglobine augmentent avec l'angle, car l'hémoglobine est plus abondante dans les couches plus profondes (derme).

En 1999 Zuluaga et al. [Zuluaga *et al.*, 1999] ont utilisé une sonde optique à 46 fibres (diamètre de cœur 200 μm, Ouverture Numérique 0.2) disposées dans deux bundles concentriques. En fluorescence, 25 fibres sont utilisées pour l'excitation et 12 pour la réception, avec une disposition aléatoire des fibres. En réflectance diffuse résolue spatialement, 8 fibres en anneau concentrique autour du bundle de fibres pour la fluorescence sont utilisées, dont 1 fibre pour l'excitation et 7 pour la réception, et avec trois fibres disposées à 180° de la fibre d'excitation (3 mm), deux fibres disposées à 90° de la fibre d'excitation (2.1 mm) et deux à 45° (1.1 mm).

2.1.4 Filtres d'excitation et de réception (émission)

Dans le cas de mesures en spectroscopie d'autofluorescence, les filtres optiques (passe-haut) d'excitation sont utilisés pour supprimer le pic d'amplitude du spectre d'excitation rétrodiffusé. Pour la spectroscopie de réflectance diffuse, des filtres optiques passe-bande sont utilisés pour laisser passer une bande spécifique de longueurs d'onde ou des filtres passe-bas pour bloquer la lumière aux longueurs d'onde NIR-IR (émises par les lampes blanches).

En 1993 Zeng et al. [Zeng *et al.*, 1993] ont utilisé pour l'excitation en autofluorescence un filtre passe-bande interférentiel en sortie du monochromateur afin de bloquer les longueurs d'onde de lumière parasite et un filtre passe-haut (NUV-Vis) pour l'excitation en réflectance diffuse. Un filtre passe-haut d'émission a été utilisé lors des mesures en autofluorescence afin de limiter l'intensité d'excitation rétrodiffusée.

En 1999 Zuluaga et al. [Zuluaga *et al.*, 1999] ont utilisé une roue à filtres passe-bande (350-628, 500-778 et 700-978 nm) pour sélectionner trois bandes d'excitation en réflectance diffuse. Une autre roue à filtres d'émission passe-haut a été utilisée lors des mesures en fluorescence afin de bloquer l'intensité d'excitation rétrodiffusée.

2.1.5 Les Méthodes de calibrage métrologique

Dans le cadre des expériences de spectroscopie réalisées en laboratoire et/ou en clinique, des protocoles de calibrage adaptés à l'instrumentation optique développée sont utilisés afin d'assurer la précision des mesures et la capacité de réaliser des comparaisons significatives entre les données acquises au cours du temps.

Dans le travail réalisé par Marín et al. [Marín *et al.*, 2006], différentes méthodes de calibrage sont décrites pour l'instrumentation de spectroscopie de fluorescence et de réflectance diffuse mise en œuvre, en utilisant des références ou standards de calibrage positifs (standards avec une réponse optique connu, i.e. Lampe de calibrage de Mercure-Argon) et négatifs (réponse optique non connu, i.e. eau distillée). Le rôle fondamental des standards est de fournir une base physique solide pour relier le signal mesuré à la vraie réponse de l'échantillon mesuré. Tous les changements d'énergie provenant des autres sources que l'échantillon mesuré sont considérés comme signaux "dépendants du système" qui doivent être détectés et corrigés en utilisant les standards de calibrage appropriés. Ils ont défini 5 types de calibration à réaliser :

- Pour le système d'excitation : a) correction des variations d'intensité.
- Pour le système de réception : b) étalonnage en longueur d'onde, c) soustraction de la lumière ambiante, d) soustraction du courant d'obscurité du détecteur et e) correction de la réponse spectrale du système.

Correction des variations d'intensité

Les sources d'excitation utilisées en spectroscopie de fluorescence et réflectance diffuse (LASERS et lampes large bande) présentent classiquement une diminution de leur puissance lumineuse de sortie au cours du temps d'utilisation. Cette variation en puissance de la source d'excitation entraîne une variation directe des spectres d'émission acquis. Des mesures de puissance optique (concernant ces variations d'énergie d'illumination) ont ainsi été employées pour corriger les spectres d'émission acquis à chaque longueur d'onde d'excitation par [Chang *et al.*, 2002b][Chang *et al.*, 2005][Marín *et al.*, 2006]. Les spectres d'émission acquis sont corrigés en divisant les intensités d'émission acquises par les mesures de puissance de l'excitation correspondante.

Étalonnage en longueur d'onde

Il existe un rapport entre la longueur d'onde de chaque point du spectre lumineuse à mesurer et les pixels du détecteur spectrométrique. L'étalonnage en longueur d'onde est le processus par lequel la longueur d'onde de chaque point du spectre est validée et corrigée au besoin. Le calibrage spectral est réalisé en vérifiant et ajustant la position des pics spectraux caractéristiques d'une référence (i.e. lampe de mercure) [Zângaro *et al.*, 1996][Utzinger *et al.*, 2001a][Marín *et al.*, 2006].

Soustraction de la lumière ambiance

En spectroscopie, la soustraction de la lumière ambiante est le processus par lequel un niveau de rayonnement de fond (ou niveau de rayonnement ambiant) est acquis, puis soustrait aux données mesurées. Par exemple, Zellweger et al. [Zellweger *et al.*, 2001] en 2001 soustraient les mesures réalisées sur un fantôme non fluorescent et Chang et al. [Chang *et al.*, 2005] en 2005 les mesures réalisées sur de l'eau distillée.

Soustraction du courant d'obscurité

Le courant d'obscurité présent dans le système de détection (CCD, composants électroniques) produit un bruit parasite qui interfère avec le signal source à mesurer et s'accumule au cours des mesures. La méthode la plus utilisée pour corriger l'influence du courant d'obscurité est la soustraction d'une mesure réalisée avec le shutter du spectromètre fermé, avant chaque mesure spectroscopique sur le tissu biologique [Zuluaga *et al.*, 1999].

Correction de la réponse spectrale du système.

Dans n'importe quelle mesure réalisée avec un système optique complexe ou avec un système de formation à image, changements peuvent se produire dans les différents composants (fibres optiques, filtres, réseaux, détecteurs, etc.) possédant des caractéristiques propres qui peuvent affecter la fonction de transfert optique, la conversion du signal ou la réponse spatiale du système. Ces effets peuvent être combinatoires, compensatoires, ou synergiques mais il est difficile de prévoir à l'avance quels facteurs ou quelles combinaisons de facteurs peuvent apparaître pendant une étude [Marín *et al.*, 2006].

Différentes méthodes ont été mises au point pour corriger la réponse du système. Une première approche consiste à enregistrer le spectre d'émission d'un composé standard et à le comparer avec ses données spectrales théoriques [Lakowicz, 2006]. [Argauer and White, 1964][Melhuish, 1960][Parker, 1962] cite [Lakowicz, 2006] qui ont utilisé comme référence les spectres d'émission de certains fluorophores (sulfate de quinine, bisulfate de quinine, 3-aminophthalimide, m-nitromethylanine, 4-diméthylamino-4'-nitrostilbene, anthracène, naphtalène, phénol et benzène) pour obtenir les facteurs de correction en fluorescence. Les longueurs d'onde d'émission de ces fluorophores couvrent la gamme 300 à 800 nm.

La méthode la plus utilisée pour obtenir les facteurs de correction en fluorescence consiste à utiliser une lampe de calibrage [Chang *et al.*, 2002a][Chang *et al.*, 2005][Marín *et al.*, 2006][Lakowicz, 2006]. La réponse du système de détection est corrigée de la façon suivant :

1. Mesure de l'intensité spectrale de la lampe de calibrage I (λ), avec le système de détection à calibrer,
2. Calcul de la sensibilité du système de détection S (λ),

$$S(\lambda) = I(\lambda)/L(\lambda) \tag{2.1}$$

   où $L(\lambda)$ est le rendement connu de la lampe.
3. Correction des spectres mesurés en les divisant par ces facteurs de sensibilité.

2.2 Instrumentation existante et nouveaux développements

Au sein du CRAN, la première instrumentation développée en spectroscopie optique bimodale (AF et RD) résolue spatialement et appliquée à la caractérisation de tissus biologiques *in vivo* a été réalisée dans le cadre de la thèse de [Péry, 2007].

Cette instrumentation en mono-excitation d'AF et RD est constituée (figure 2.2) :
- d'un spectrographe imageant (iHR 320, Jobin Yvon) muni de 3 réseaux de diffraction permettant de couvrir plusieurs bandes de longueurs d'onde et d'une caméra CCD back-illuminated sensible dans l'UV (Symphony 2048x512),
- de deux sources d'excitation distinctes :
  - un diode LASER de longueur d'onde centrale 410 ($\pm$ 5) nm avec une puissance maximale de 60 mW (Laser 2000, France),
  - une lampe deutérium-halogène 380-940 nm (ocean optics),
- d'une sonde à 37 fibres optiques (silice/silice, diamètre de 200 μm, ON=0,22),
- d'une carte électronique d'activation et de contrôle de puissance de la diode LASER,
- d'un logiciel de configuration et d'acquisition des mesures spectroscopiques.

Une des stratégies de notre travail de thèse afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité de la méthode diagnostique consiste à exploiter les informations complémentaires des émissions de fluorescence de différents fluorophores intrinsèques obtenues à l'aide d'une source d'excitation multiple.

La mise en oeuvre d'un nouveau prototype nous a conduit à rechercher une solution adaptée à nos besoins, prenant en compte les changements et les améliorations nécessaires en termes de :
- développement d'une source de multi-excitation pour l'autofluorescence,
- automatisation de la commutation entre les deux types d'excitation (pour l'AF et la réflectance diffuse) afin d'injecter le faisceau d'excitation dans une seule et même fibre,
- synchronisation automatique entre la partie excitation et les déclenchements des mesures spectroscopiques,
- développement d'un système de positionnement de l'extrémité de la fibre pour éviter les variations des mesures dues aux glissages et aux différentes pressions d'appui de la fibre.

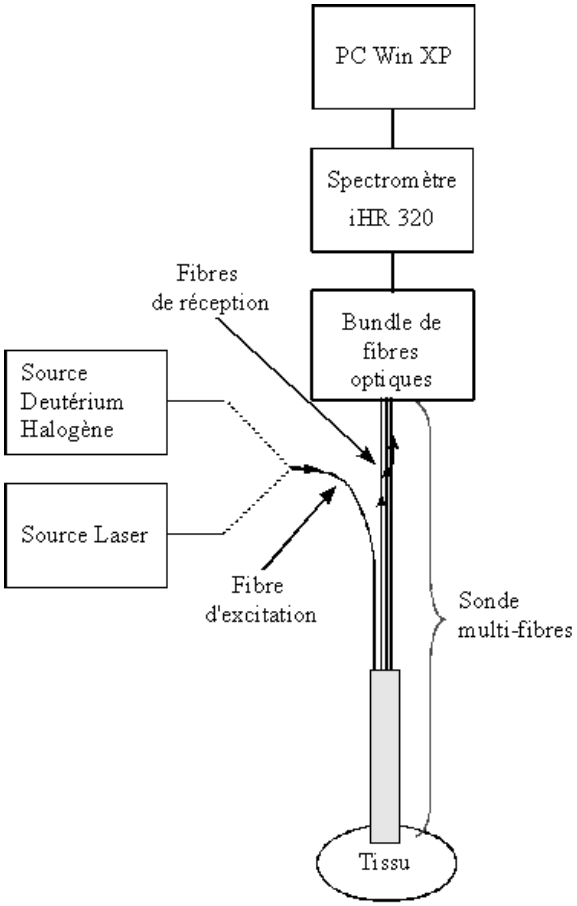

FIGURE 2.2 – Schéma de principe du système mis en œuvre pour l'expérimentation [Péry, 2007], système constitué de : deux sources de lumière (lampe Deutérium-Halogène et diode laser), une sonde multi-fibres optiques et un spectrographe.

2.3 Considérations préliminaires, solutions testées et retenues de l'instrumentation

Dans cette partie nous présentons le principe adopté pour les sources d'excitations, les considérations des caractéristiques nécessaires pour la partie réception, et finalement les solutions technologiques testées et retenues.

2.3.1 Considérations et principe des sources d'excitations

Plusieurs travaux en spectroscopie de RD [Zhu *et al.*, 2006][Murphy *et al.*, 2005][Chang *et al.*, 2005] ont exploité une excitation large bande 350-1000 nm. Les résultats ainsi obtenus démontrent la capacité de la technique pour discriminer les tissus sains des tissus tumoraux. Pour la spectroscopie RD, nous travaillerons avec une excitation comprise entre 350 et 800 *nm*.
Les travaux menés en spectroscopie d'AF par [Georgakoudi *et al.*, 2001][Georgakoudi *et al.*, 2002][Breslin *et al.*, 2004][Chang *et al.*, 2005][Diagaradjane *et al.*, 2005] utilisant la multiple excitation-émission, ont exploité plusieurs faisceaux bande étroit dans la gamme 280-460 nm afin d'adresser différents fluorophores (figure 1.8, chapitre 1). Pour la spectroscopie d'AF nous utiliserons différentes bandes étroites d'excitations entre 350 et 450 nm.

Avec comme objectif de réaliser une source d'excitation lumineuse programmable et configurable à plusieurs longueurs d'onde, nous avons opté pour le principe de la source d'excitation UV-Visible bande variable illustrée en figure 2.3 :

- En AF, réglage/programmation d'un faisceau lumineux bande étroite (quelques nm) et de longueur d'onde centrale entre 350-450 nm.
- En RD, besoin d'un faisceau large bande (quelques centaines de nm) avec la possibilité de régler et programmer le largueur de bande et la longueur d'onde centrale entre $350-800\ nm$.

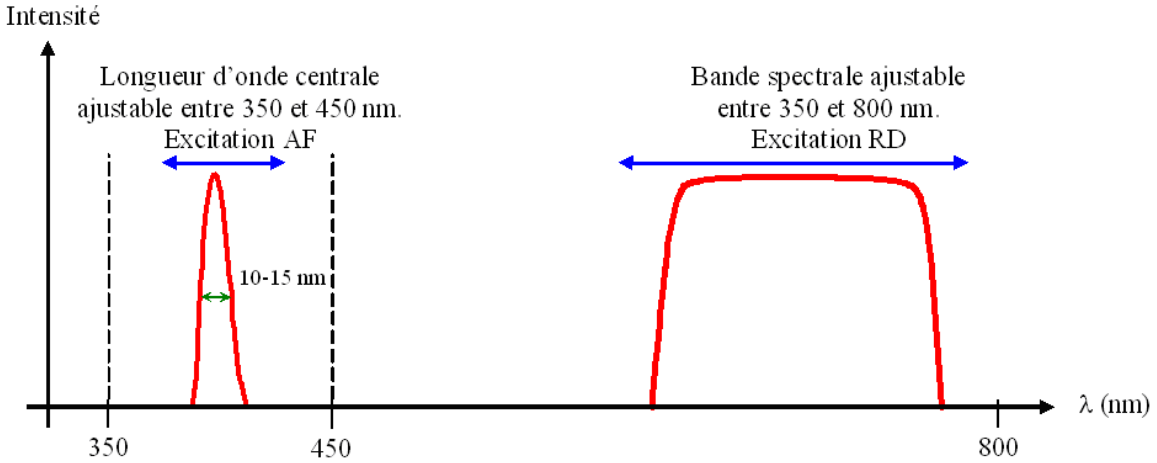

FIGURE 2.3 – Principe de la source d'excitation UV-Visible à bande variable. Réglage/programmation des largeurs de bande et longueurs d'onde centrale en AF et RD.

2.3.2 Considérations pour la partie réception

La partie réception comprend un spectromètre multivoies et une sonde multi-fibres, tous deux testés et sélectionnés au cours de la thèse de [Péry, 2007]. Nous utiliserons ces dispositifs sachant qu'ils présentent les caractéristiques nécessaires pour réaliser la spectroscopie résolue spatialement : grande sensibilité, précision, rapport bruit/signal, répétabilité, etc. La description de ces dispositifs sera faite dans les sections suivantes.

2.3.3 Solutions technologiques envisagées, testées et retenues pour le système d'excitation

Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, un des objectifs de cette thèse est de construire un système de multi-excitation pour l'AF et pour l'excitation en RD utilisant la même fibre de diamètre 200 μm. La commutation entre le deux différents types d'excitation sois réalisable de façon automatique. Nous avons testé deux types de solutions. La première a consisté à utiliser plusieurs DELs émettant dans différentes bandes spectrales couvrant la bande spectrale d'intérêt pour notre travail. La seconde option a concerné l'utilisation d'une lampe large bande associée à une paire de Filtres Optiques Linéairement Variables (FOLVs) passe-bas et passe-haut, dont la position relative permet de former dynamiquement un filtre optique passe-bande ajustable. La description détaillée des deux solutions est présentée dans les sections suivantes.

2.3.3.1 Excitation multiple à DELs et LASERs

Dans le cadre de la thèse de [Péry, 2007], nous avons participé aux tests et à la construction d'une première solution envisage pour réaliser un système de multi-excitation en AF et RD basée sur l'utilisation de LEDs.

Afin de couvrir une bande entre le proche UV (380 nm) et le proche infrarouge (940 nm) pour l'excitation en RD, il a été utilisé 16 LEDs classiques. En tenant compte de l'angle d'ouverture de la lumière sortant de chacune d'elles et de la puissance lumineuse émise, nous avons choisi : 2 DELs blanches et 14 DELs ayant un pic d'émission à 380, 405, 450, 470, 525, 591, 625, 660, 700, 740, 780, 810, 880 et 940 nm ; le spectre composite théorique des 16 LEDs est montré sur la figure 2.4c. Pour la multi-excitation en AF l'idée a été consacrée sur l'utilisation de LEDs à fort puissance et filtres passe-bandes spécifiques.
Nous avons développé une maquette électronique pour contrôler l'activation et la synchronisation des deux types d'excitation. En utilisant une carte USB I/O24 avec un programme informatique développé sur Visual C++, nous pouvons commander les sources lumineuses, choisir les longueurs d'onde souhaitées et composer dynamiquement notre propre spectre d'excitation lumineuse (figure 2.4).

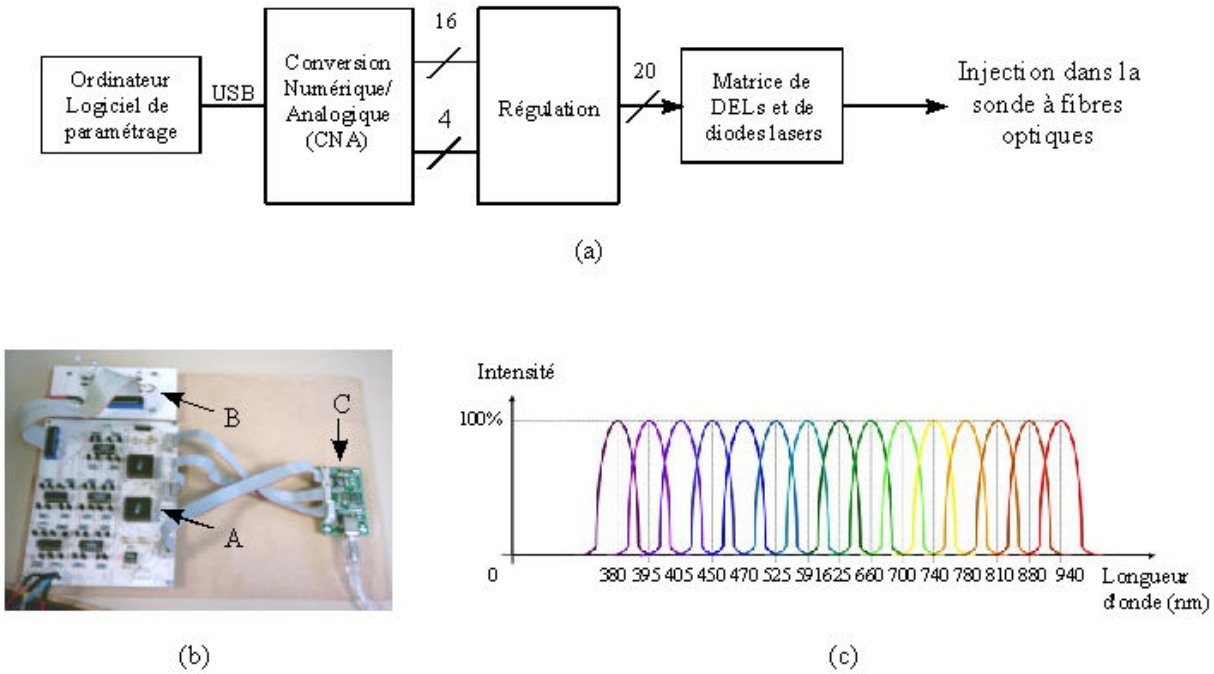

FIGURE 2.4 – Schéma fonctionnel de la solution à LEDs, (b) Maquette : A carte électronique de régulation, B carte de positionnement des DELs et des diodes lasers, C carte USB I/O24, (c) Exemple de spectre composite théorique.

Injection de la lumière :
Deux solutions technologiques ont été envisagées afin d'injecter la lumière d'excitation dans une seule fibre de 200 μm de diamètre de cœur.
La première solution déjà testée consiste à concentrer des faisceaux grâce à un couple de **lentilles plan-convexes** réalisant la collimation du faisceau lumineux issu d'une LED puis, la focalisation vers le coeur d'une fibre optique. La deuxième solution utilise un **miroir ellipsoïde de focalisation** pour chacun des 16 faisceaux de LEDs (originalité technologique).

Après plusieurs tests utilisant différentes combinaisons de lentilles plan-convexes et respectant les distances focales (lentilles de diamètres et de distances focales identiques ou différentes), nous avons constaté que nous n'arrivions pas à obtenir un point de focalisation suffisamment précis et petit par rapport à la contrainte dimensionnelle de 200 μm de diamètre. La deuxième option avec le miroir ellipsoïde est en cours d'évaluation.

Confrontés aux difficultés rencontrées pour réaliser l'injection de la lumière dans le cœur d'une fibre optique de 200 μm de diamètre, nous avons décidé d'envisager une autre solution avec une lampe large bande et des filtres linéairement variables. La description est montrée dans la section suivante.

2.3.3.2 Excitation multiple à filtres optiques linéairement variables

En continuant sur l'idée de multi-excitation nous avons envisagé une autre solution à partir d'une lampe large bande de type Xénon couplée avec des Filtres Optiques Linéairement Variables (FOLV). Le principe consiste à associer une paire de FOLV, passe-bas et passe-haut, formant un filtre passe-bande de sorte qu'en réglant leurs positions, nous obtenions un spectre d'excitation avec une largueur de bande et une longueur d'onde centrale spécifiques. Deux alternatives avec différentes configurations optiques ont été testées.

Première alternative

La première alternative testée (figure 2.5) est constituée d'une lampe Xénon (large bande) avec un miroir parabolique qui envoie la lumière de sortie en faisceau quasi parallèle. Puis nous utilisons un filtre anticalorique (F_1) afin d'éliminer la bande infrarouge (IR) et protéger les composants suivants de la dégradation due à l'échauffement IR. Ensuite une lentille plan-convexe (L_1) sert à focaliser la lumière vers la lentille L_2 qui remet en forme un faisceau parallèle de lumière avec une diamètret (inferieur à 8mm) adapté à la dimension des filtres FOLV (figure 2.5b). En réglant leur position nous obtenons les caractéristiques spectrales de faisceau d'excitation souhaitées, et finalement avec la lentille L3 nous focalisons ce faisceau vers la fibre d'excitation (FO).

Calcul des composants (lentilles)

Le miroir parabolique de la lampe fournit un faisceau parallèle dont une petite partie diverge avec un angle d'environ 11,3° (angle de divergence " réel " mesuré à la sortie de la lampe) ; L'objectif est d'obtenir un faisceau collimaté (après la lentille L_2) de diamètre 5 mm environ et puis de focaliser (avec la lentille L_3) ce faisceau avec un angle (θ_3) d'incidence inférieur à 12.71° (ouverture numérique de $FO = 0,22$) pour l'injection dans la fibre optique.

Après analyse des caractéristiques techniques de plusieurs filtres anticaloriques, nous avons decidé d'utiliser le filtre KG1 (http ://www.optical-filters.com/kg1.html), car il possède une bonne transmision dans la bande 350-750 nm, une réjection acceptable au dessus de 800 nm, et un traitement pour les hautes températures (jusqu'à 300°C).

Concernant les caracteristiques des lentilles utilisées, pour le schéma de la figure 2.5c, nous avons exprimé les angles (θ_i) de divergence et d'incidence tels que :

$$tag(\theta_i) = \frac{C_{oi}}{f_i} \tag{2.2}$$

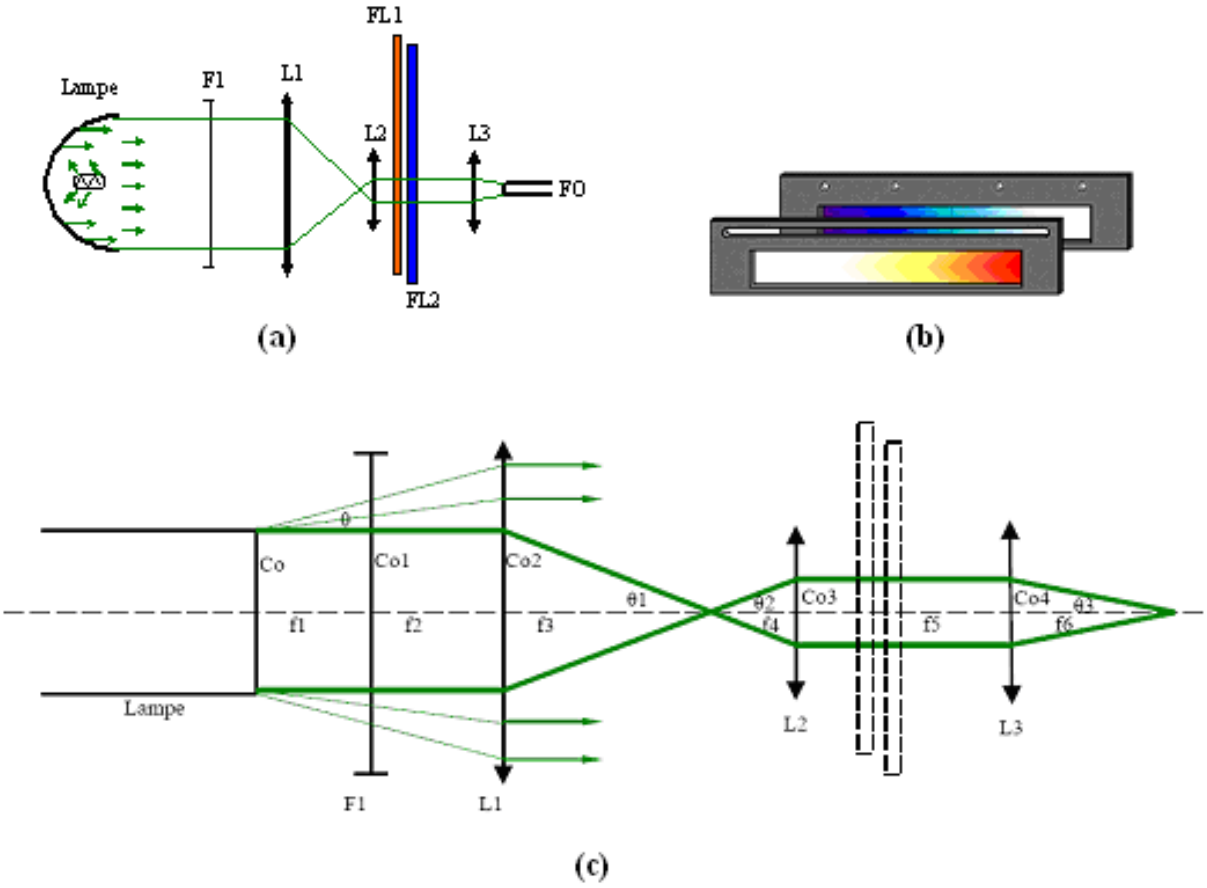

FIGURE 2.5 – (a) Schéma de la première configuration pour la solution à lampe et filtres optiques linéairement variables, (b) Images de filtres optiques linéairement variables, (c) Schéma fonctionnel optique utilisé pour le calcul des caractéristiques des lentilles optiques.

Avec
C_{oi} = le rayon du faisceau et f_i = la longueur focale, calculés comme :

$$f_i = \frac{C_{oi}}{tag(\theta_i)} \qquad \text{et} \qquad C_{oi} = f_i * tag(\theta_i) \tag{2.3}$$

Nous avons utilisé une lampe Xénon 300 W continus à arc court munie d'un miroir parabolique avec un diamètre de sortie du faisceau du 25,4 mm. Ce diamètre doit être le même sur F1 et L1, alors $C_o = C_{o1} = C_{o2} = 12,7$ mm. Nous avons fixé $f1 = f2 = 50$ mm.

Pour L_1, nous avons utilisé une lentille avec un diamètre de 25,4 mm et une longueur focale de = 75 mm, qui donnent $C_{o2} = 12,7$ mm et $f_3 = 75$ mm, donc $\theta_1 = arctag(12,7/75) = 9,61°$. Pour L_2, nous avons utilisé une lentille avec un diamètre de 9 mm et une longueur focale de 13,5 mm, sortent $f_4 = 13,5$ mm et $\theta_2 = \theta_1 = 9,61°$, donc $C_{o3} = 13,5 * tag9,61 = 2,286$ mm. Le diamètre du faisceau sur $L_2 = 2,28 * 2 = 4,57$ mm, ce faisceau avec ce diamètre traverse les FOLV et arrive sur L_3. Nous avons fixe $f_5 = 30$ mm (espace pour les FOLV). Pour L_3 nous avons utilisé une lentille avec un diamètre = 9 mm et une longueur focal = 27 mm, alors, $f_6 = 27$ et $C_{o4} = Co3 = 2.286$ mm, donc $\theta_3 = arctag(2.286/27) = 4.84°$ = angle d'incidence du faisceau sur la fibre optique.

Après plusieurs tests avec les composants optiques sélectionnés, nous n'avons pas obtenu une collimation satisfaisante du faisceau en sortie de la lentille L_2, conduisant à une mauvaise focalisation de la lumière dans la fibre d'excitation et par conséquent à des puissances trop faibles pour réaliser l'excitation en autofluorescence.

Deuxième alternative

Nous avons testé une seconde alternative pour la solution à lampe et FOLV dans le but d'augmenter la puissance des excitations pour l'AF. Sur la figure 2.6, nous observons le schéma optique conçu et retenu pour optimiser l'injection de la lumière dans le cœur la fibre d'excitation.

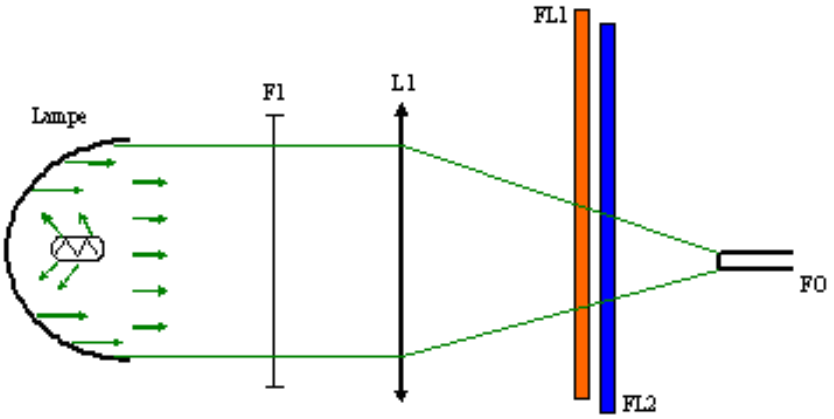

FIGURE 2.6 – Schéma de la seconde configuration pour la solution à lampe et filtres linéairement variables.

Nous utilisons les mêmes composants que pour la première configuration, c'est-à-dire, la lampe Xénon avec un miroir parabolique, le filtre anticalorique KG1, la lentille plan-convexe de diamètre 25.4 mm et de distance focale 75 mm, et les FOLV. Nous avons fixé une séparation de 50 mm entre la lampe et F1, ainsi qu'entre F1 et L1. En utilisant les equations (2.2) et (2.3) nous avons calculé une distance de 55 *mm* entre L1 et FL1 afin d'obtenir un diamètre de 7 mm du faisceau arrivant sur la surface de FL1. Avec cette lentille, nous avons un angle d'incidence de 9.61°, inférieur à l'angle d'incidence maximal (12,71°) de la fibre d'excitation.

Après tests, nous avons obtenu un spot de focalisation d'un diamètre de 4 mm. Les puissances obtenues étaient quelques μW, mais pas encore suffisantes pour réaliser la spectroscopie d'autofluorescence sur la peau de façon correcte ; quelques dizaines de μW étant nécessaires. La taille du spot de focalisation étant liée à la longueur focale de la lentille utilisée, nous avons réduit la distance focale de la lentille et ainsi augmenté la densité de puissance sur la fibre d'excitation. Par contre, le fait de réduire la longueur focale (et aussi la taille du spot) a pour effet d'augmenter l'angle d'incidence du faisceau dans la fibre.

Finalement, nous avons sélectionné une lentille plan-convexe avec une diamètre de 50 mm et une longueur focale de 42 mm. En utilisant (2.2) et (2.3), nous avons placé FL1 à 30,4 mm de L1 pour obtenir une diamètre de faisceau de 7 mm sur FL1. Nous avons retenu cette configuration pour la version finale de notre système de multi-excitation ; les puissances obtenues pour l'excitation en AF avec cette configuration s'étendent de 10 à 70 μW.

2.3.4 Solutions technologiques pour l'acquisition spectromètrique

Cette section décrit les composants utilisés pour la partie réception de notre instrumentation.

2.3.4.1 Spectromètre

Nous avons mis en œuvre le spectromètre iHR 320 (HORIBA Jobin Yvon,Courcouronnes, France) retenu au cours de la thèse de [Péry, 2007] après étude des produits commercialisés. Il s'agit d'un spectrographe imageant de configuration Czerny-Turner avec une adaptation spécifique permettant une entrée multi-fibrée en ligne pour acquérir simultanément 13 spectres en un seul " tir ". Le système est composé :

- d'une caméra CCD back-illuminated sensible dans l'UV (Symphony 2048x512 Cryogenic Back Illuminated UV Sensitive CCD Detector),
- de 3 réseaux de diffraction holographique présentant différentes résolutions spectrales (200 traits/mm blazé à 500 nm, 150 traits/mm blazé à 500 nm et 600 traits/mm blazé à 750 nm),
- d'un bundle de 15 fibres optiques avec embout d'insertion des fibres alignées,
- d'une roue à filtres pour les mesures de spectres d'émission de fluorescence,
- d'entrée/sortie de déclenchements externes et internes,
- d'un logiciel dédié pilotant l'ensemble (Synergy).

2.3.4.2 Sonde multifibres

Nous avons utilisé une sonde composée de 37 fibres optiques (fibres silice/silice, ON = 0,22) réalisée par la société SEDI au cours de la thèse [Péry, 2007], les fibres sont montées dans une seule gaine de 2 mm de diamètre et distribuées de façon circulaire (figure 2.7).

Cette configuration géométrique permet de choisir n'importe quelle fibre comme fibre d'excitation et plusieurs combinaisons de distances entre celle-ci et les fibres de réception choisies, (distances entre coeurs de 0,2708 mm à 1,6248 mm).

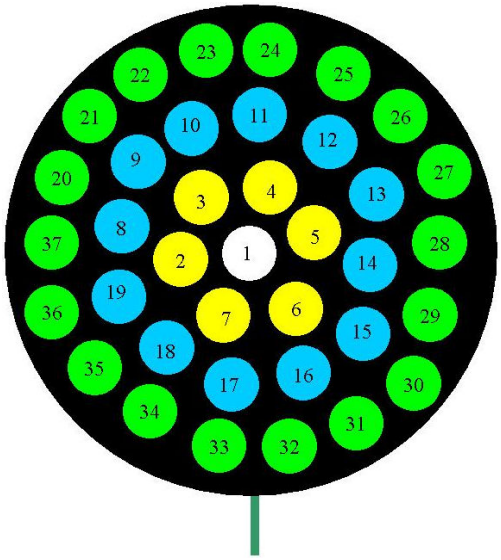

FIGURE 2.7 – Image de la disposition réelle des fibres de la sonde utilisée.

2.4 Schéma global de l'instrumentation

Le schéma de synthèse général du système de multi-excitation-réception développé est représenté en figure 2.8. La lumière d'excitation (Fexc) injectée dans la sonde fibrée est issue de la lampe Xénon 300 W, montée sur le miroir parabolique, et dont le spectre d'émission est étendu dans l'UV pour couvrir la bande 300-800 nm. Un filtre anticalorique (F1) protège les composants optiques suivants de la dégradation due à l'échauffement IR. La lumière de la lampe est ensuite focalisée vers la fibre d'excitation grâce à la lentille convexe L1. Des filtres passe-bande représentés par F2 sont utilisés lors de l'excitation en AF afin de réduire au maximum la transmission de lumière parasite dans la bande d'émission spectrale des fluorophores (450-600 nm). Un système de positionnement motorisé permet de déplacer automatiquement le couple de filtres passe-haut FL1 et passe-bas FL2 offrant un réglage dynamique du pic central de la longueur d'onde d'excitation de fluorescence (entre 350 et 460 nm) et de la largeur de bande (de 15 à 25 nm de largeur à mi-hauteur). Pour la diffusion élastique, les bandes spectrales s'étendent de 350 à 800 nm.

Le faisceau d'excitation est envoyé vers le tissu à travers la fibre optique (Fexc) de la sonde à 37 fibres optiques. La lumière émise par le tissu après multiples interactions (absorption, diffusion, dispersion, AF, etc.), est recueillie de façon simultanée par plusieurs fibres optiques sur les 1 à 13 voies du spectrographe iHR320. Une roue à filtres passe-haut dans le spectromètre est utilisée pour couper la rétrodiffusion des différentes excitations lors des mesures en AF. Finalement, les courbes spectrales 2D en AF ou en RD sont visualisées et enregistrées dans l'ordinateur.

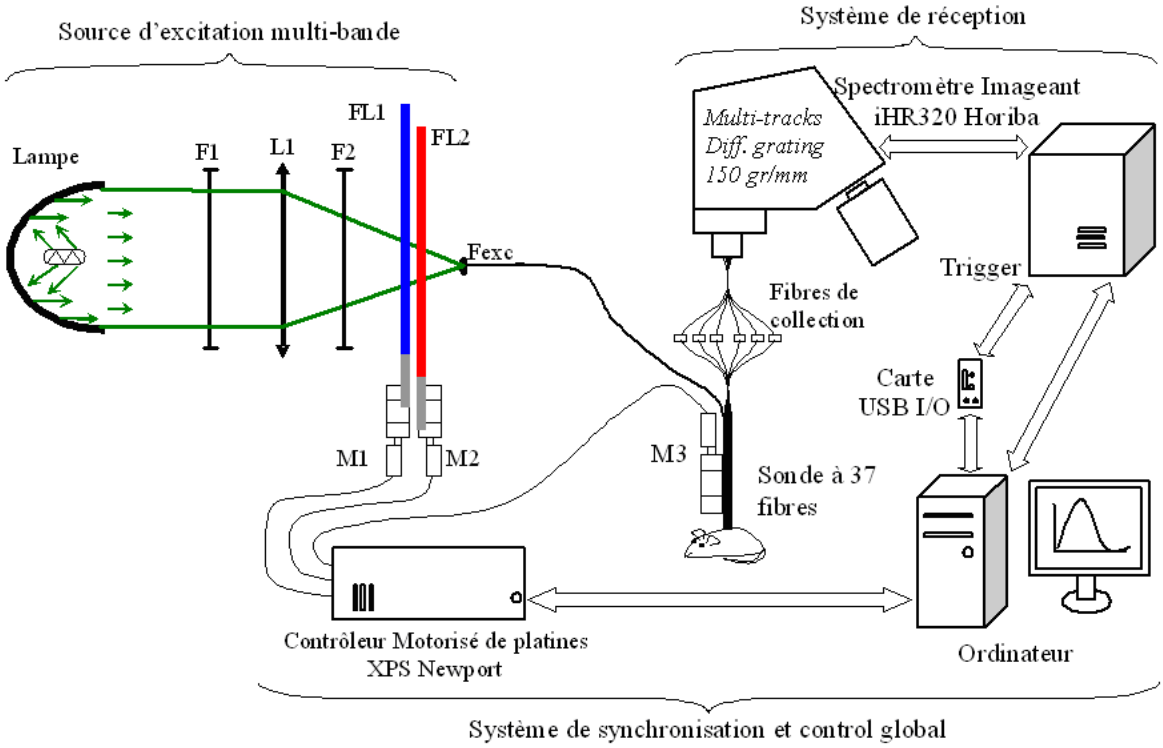

FIGURE 2.8 – Schéma de synthèse de l'instrumentation développée pour la spectroscopie bimodale. Lampe à arc court (Xénon 300W) ; F1= Filtre anticalorique ; L1= Lentille plan-convexe ; F2 = Filtre passe-bande ; FL1 et FL2 = Filtres optiques variables linéairement passe-bas et passe-haut ; Fexc = Fibre optique d'excitation ; M1, M2 et M3= platines de déplacement linaire motorisé.

2.4.1 Synchronisation et contrôle global de l'instrumentation

Nous avons développé, en Visual C++, une interface (figure 2.9) dédiée à notre application servant au paramétrage complet des spectres d'excitation ainsi qu'au contrôle et à la synchronisation des déclenchements des acquisitions du spectromètre.

L'interface initialise les dispositifs de contrôle, en connectant les ports de la carte USB qui servent à lire l'état du spectromètre et à déclencher l'acquisition de nouveaux spectres, puis connecte les ports du contrôleur XPS du système de positionnement des 3 platines de translation motorisées (2 pour le positionnement des filtres optiques linéairement variables, et un pour la sonde sur le tissu).

La partie contrôle des manipulations paramètre la position des filtres FL1 et FL2 pour fixer les pics d'excitation programmés : 360 et 368 nm avec le bouton "Fluorescence 1", 390 et 400 *nm* ("Fluorescence 2"), 410, 420 et 430 nm ("Fluorescence 3"), et finalement trois bandes 370-540, 450-640 et 560-740 nm avec le bouton "Diffusion élastique". Après génération du faisceau d'excitation, un signal TTL externe (carte USB I/O) active le déclenchement des mesures sur le spectromètre iHR320. Après la dernière acquisition (possibilité de réaliser des mesures accumulées pour une même excitation), le système place les filtres aux nouvelles positions pour l'excitation suivante, et réalise les mêmes actions de déclenchement et de mesures spectroscopiques. Ces actions peuvent être répétées et dépendent du nombre d'excitations programmées.

La partie "position de la fibre " est dédiée au réglage (grossier et fin) de la position de la sonde sur le tissu afin d'éviter des glissements de la sonde sur le tissu et d'obtenir les mêmes pressions d'appui au cours des mesures. Finalement la fenêtre "État actuel" indique l'état du traitement ou de l'action en cours ou réalisée par l'interface (USB connecté, XPS connecté, AF à 400 nm en cours, etc).

2.5 Caractérisation métrologique et calibrage de l'instrumentation

La figure 2.10 montre les spectres obtenus en sortie de chaque élément du système d'excitation construit (figure 2.6). La figure 2.10a montre le spectre mesuré en sortie de la lampe Xénon, ce spectre s'étend sur une gamme spectrale proche UV- proche infrarouge (340-1100 nm). Sur la figure 2.10b, nous observons le spectre d'intensité obtenu où les pics infrarouge sont presque supprimés après le filtre anticalorique. La figure 2.10c montre le spectre obtenu après la lentille de focalisation et sur lequel on peut constater une diminution dans la partie proche UV. Afin de supprimer efficacement l'excitation résiduelle transmise dans la bande de coupure des FOLVs correspondant à la zone d'émission de l'AF, nous avons utilisé deux filtres passe-bande après la lentille de focalisation. La figure 2.10d montre le spectre obtenu après le filtre passe-bande (FWHM 352-402 nm) utilisé pour les excitations à 360 et 368 nm. La figure 2.10e montre le spectre obtenu après le filtre passe-bande (FWHM 390-455 nm) utilisé pour les excitations à 390, 400, 410, 420 et 430 nm.

Résultats

Le système de multi-excitation développé permet de régler et de programmer différentes bandes d'excitations avec une largueur minimale entre 10 et 20 nm pour l'AF et de quelques centaines de nm pour la RD, et des valeurs de longueur d'onde centrale avec une précision inférieure à 0.3 nm.

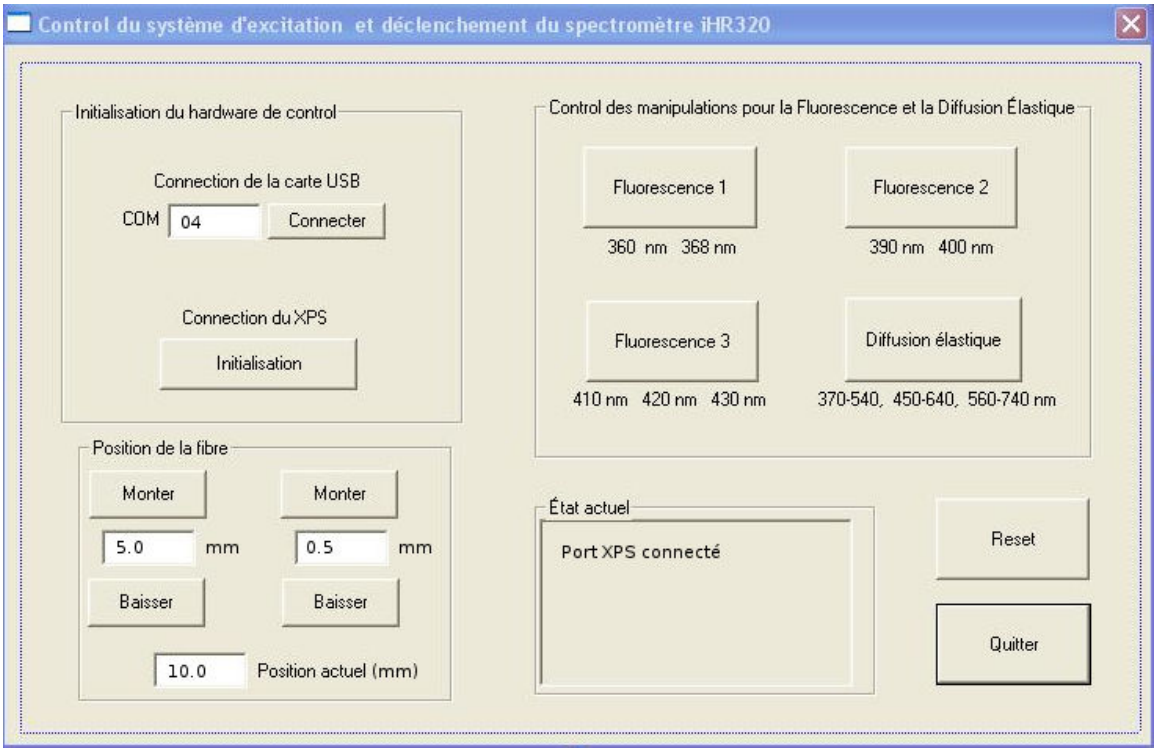

FIGURE 2.9 – Fenêtre de l'interface développée sous Visual C++ pour le contrôle du système d'excitation et la synchronisation avec le déclenchement des mesures du spectromètre iHR320.

Des exemples de spectres d'intensité générés avec l'instrumentation développée sont montrés sur la figure 2.11 : (a) des pics d'excitation avec largueur à mi-hauteur de 10 nm, tous les 5 nm entre 360-440 nm, (b) 7 pics d'excitation pour l'AF centrés à 360, 368 nm avec une largueur à mi-hauteur de 18 nm, et centrés à 390, 400, 410, 420 et 430 nm avec une largueur à mi-hauteur de 15 nm, (c) des bandes d'excitation pour la diffusion élastique entre 365-545, 450-640 et 550-740 nm.

Nous avons réalisé des tests pour mesurer la répétabilité [13] des excitations générées et des mesures en émission d'AF et diffusion élastique recueillis.

Le tableau 2.1 montre les résultats obtenues en terme de variation (écart-type en nm) de la longueur d'onde centrale à mi-hauteur à partir de la mesure de 50 spectres pour chaque excitation.

Le tableau 2.2 rassemble les résultats obtenus en terme de variation (écart-type en %) par rapport à la moyenne calculée de 50 mesures en émission réalisées sur un standard en téflon, pour 7 excitations en AF et une bande d'excitation en diffusion élastique, et pour 6 distances entre la fibre d'excitation et les fibres de réception. Nous observons des variations inférieure à 3%, cette information sera utilisée dans la partie prétraitement spectral au chapitre 4.

Calibrage de l'instrumentation

Nous avons réalisé le calibrage de la partie réception de l'instrumentation en caractérisant sa réponse spectrale. Pour le calibrage en AF nous avons utilisé une lampe de calibrage DH-2000-CAL (Ocean Optics, Duiven Netherlands) étalonnée par le constructeur. Pour le calibrage en RD nous avons utilisé un standard diffusant (surface lambertienne, WS1, Ocean Optics, Ostfildern, Germany).

13. Variabilité mesurée par un écart type dans les conditions où tous les facteurs sont maintenus constants (même échantillon, même position de filtre, même configuration du spectromètre, etc.)

Table 2.1 – Test de répétabilité des excitations générées en AF et diffusion élastique. Représentation de la variation (± écart-type en nm) de la longueur d'onde centrale d'excitation mesurée à mi-hauteur.

	Variation (± écart-type en nm)					
	Distance 1	**Distance 2**	**Distance 3**	**Distance 4**	**Distance 5**	**Distance 6**
AF-360	0.9939	0.9234	1.0277	1.0597	1.1036	1.1486
AF-368	1.0576	1.0324	1.0305	1.1356	1.2084	1.0631
AF-390	0.6874	0.6752	0.7490	0.7847	0.8821	0.7889
AF-400	0.9416	0.9138	0.9121	0.9211	0.9476	0.8689
AF-410	0.7413	0.8325	0.8189	0.8782	0.8749	0.8167
AF-420	0.9592	0.9831	0.9502	1.0299	1.0766	1.0445
AF-430	0.6734	0.6937	0.7300	0.7281	0.7588	0.7678
DE	3.8179	2.1451	2.2609	2.6900	3.4402	15.2672

Table 2.2 – Test de répétabilité des mesures en émission d'AF et diffusion élastique : % de variation de l'écart type par rapport à la moyenne de 50 mesures réalisées pour 6 distances et excitation.

	Variation (± %)					
	Distance 1	**Distance 2**	**Distance 3**	**Distance 4**	**Distance 5**	**Distance 6**
AF-360	0.7042	0.6861	0.5926	0.9035	0.8198	0.5984
AF-368	1.0447	1.0042	0.8992	2.3076	1.4949	1.0524
AF-390	1.0106	0.8746	0.7150	1.8879	1.8991	0.9910
AF-400	0.6548	0.6987	0.6885	1.4561	1.0460	0.6767
AF-410	0.9108	0.8796	0.6571	1.9121	1.5646	0.8901
AF-420	0.7208	0.7206	0.6619	1.7684	1.3261	0.6989
AF-430	0.6419	0.6394	0.5367	1.4846	1.1690	0.6559
DE	2.9368	2.2407	2.3885	2.9286	1.9705	2.6230

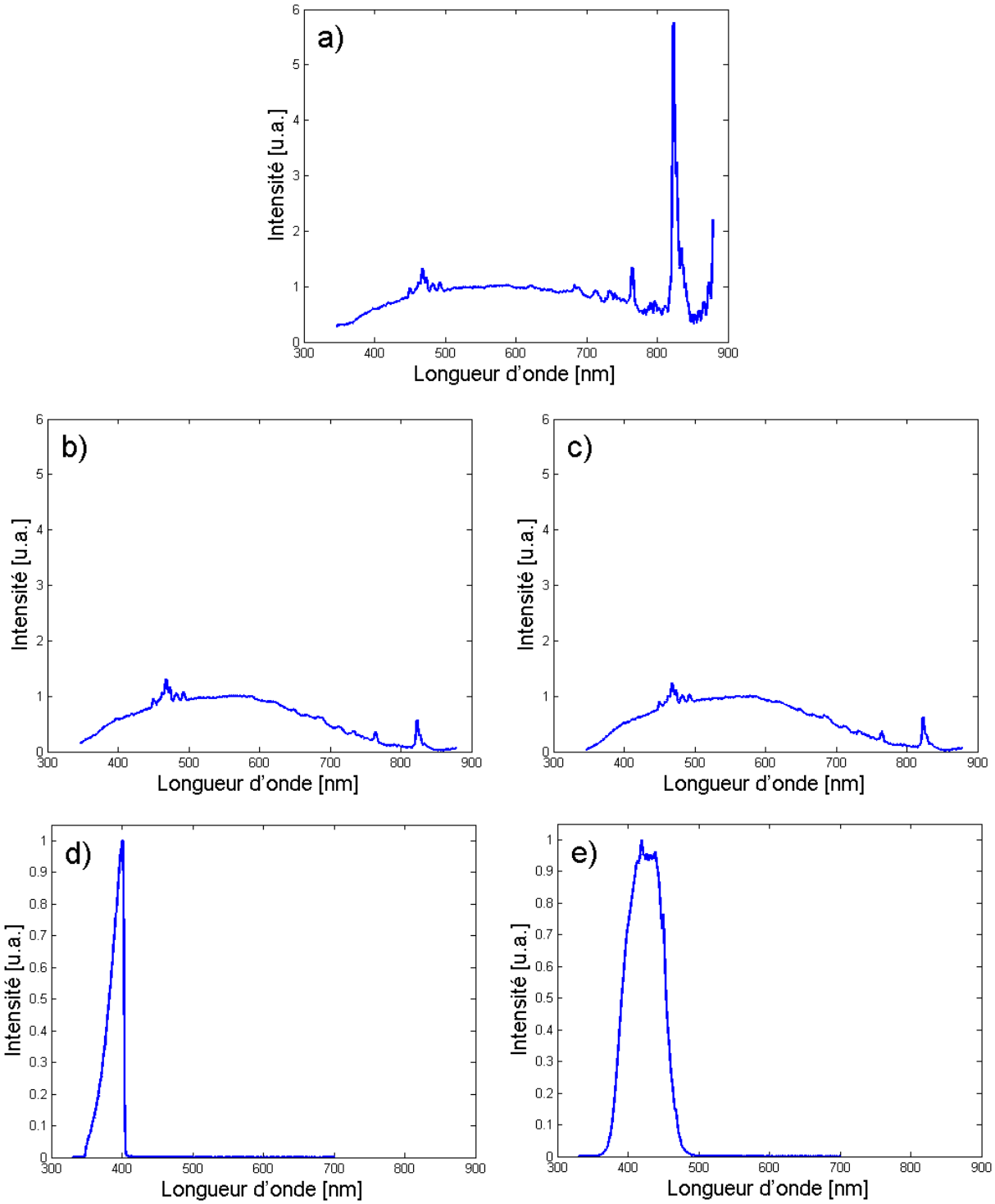

FIGURE 2.10 – Spectres mesurés à la sortie de chaque élement du système d'excitation ; a) en sortie de la lampe ; b) derrière le filtre anticalorique KG1 ; c) derrière la lentille de focalisation ; d) derrière le filtre passe-bande utilisé pour les excitations en AF à 360 et 368 nm ; e) derrière le filtre passe-bande utilisé pour les excitations en AF à 390, 400, 410, 420 et 430 nm.

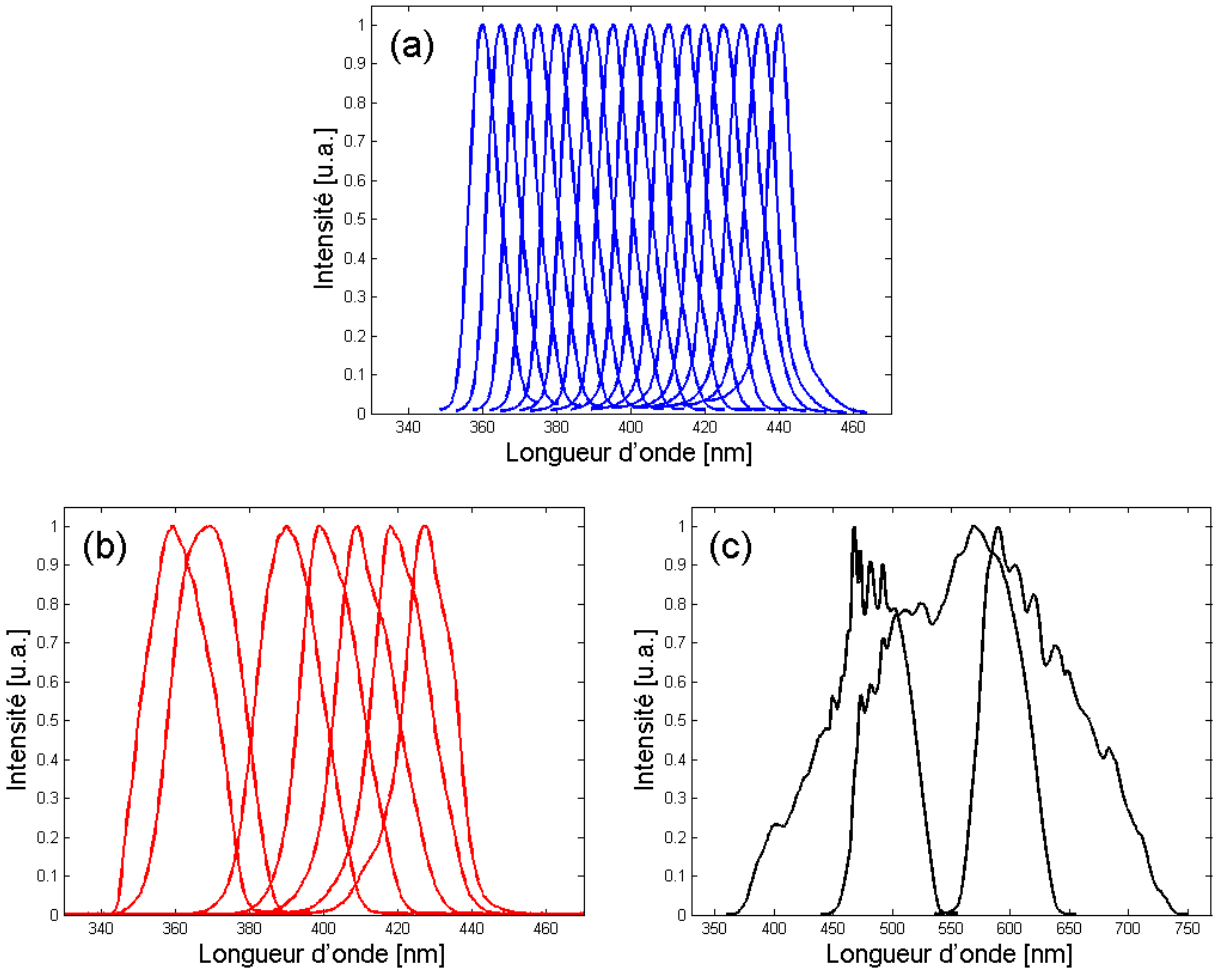

FIGURE 2.11 – Exemples de spectres générés pour l'excitation d'autofluoresnce et la diffusion élastique ; a) pics d'excitations avec FWHM = 10 nm tous les 5 nm entre 360 et 440 nm ; b) pics d'excitations pour l'AF : 360 et 368 avec FWHM = 18 nm, 390, 400, 410, 420 et 430 nm avec FHWM = 15 nm ; c) bandes d'excitations pour la diffusion élastique : 365-545, 450-640 et 550-740 nm.

Le principe suivi pour réaliser le calibrage de la réponse spectrale pour l'AF [Lakowicz, 2006] est illustré en figure 2.12. Tout d'abord nous réalisons les mesures du spectre d'intensité en sortie de la lampe DH-2000-CAL dans toutes les configurations utilisées (différentes fibres optiques de réception, différents filtres de réception, 3 réseaux de diffraction du spectromètre, etc.). Ensuite pour obtenir les coefficients de correction spectrale, nous calculons les rapports entre la courbe spectrale étalonnée de la lampe DH-2000-CAL (données fournies pour le constructeur) et les courbes mesurées expérimentalement.

La figure 2.13 représente le schéma de la configuration expérimentale mise en œuvre pour ces mesures de calibrage de réponse spectrale. Le faisceau de sortie de la lampe est envoyé dans une sphère d'intégration à travers une fibre optique de 600 μm de diamètre de coeur, afin d'obtenir une distribution de lumière homogène à l'entrée de la sonde multi-fibres optique insérée dans la sphère.

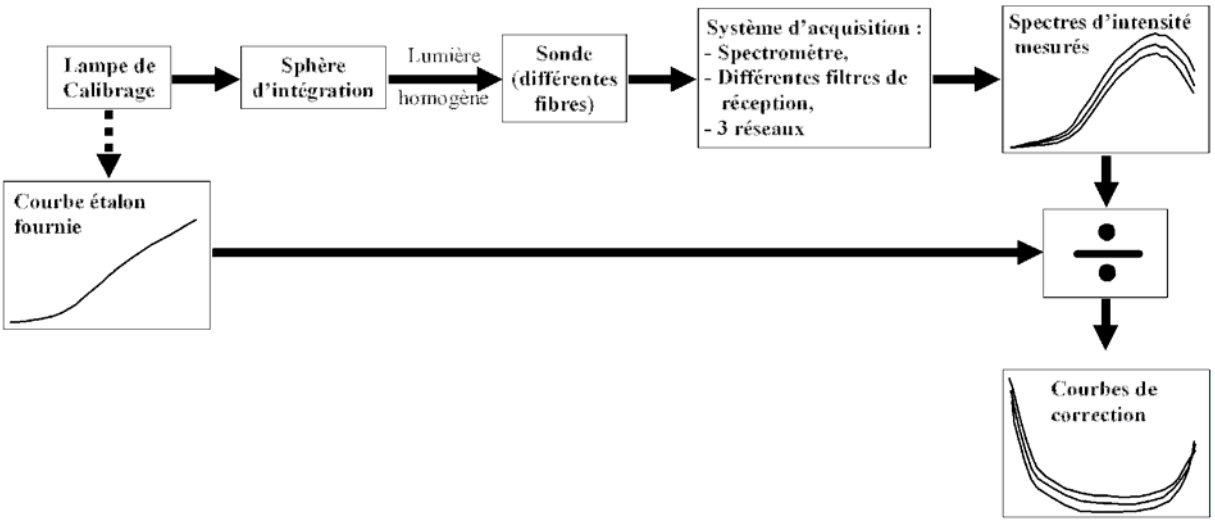

FIGURE 2.12 – Schéma bloc du calibrage de la réponse spectrale de l'instrumentation développée montrant le principe utilisé pour mesurer la courbe spectrale de la lampe de calibrage en bout de la chaîne d'excitation et effectuer le calcul du ratio entre la courbe étalon (fournie par le constructeur) et la courbe mesurée, afin d'obtenir les courbes des coefficients de correction.

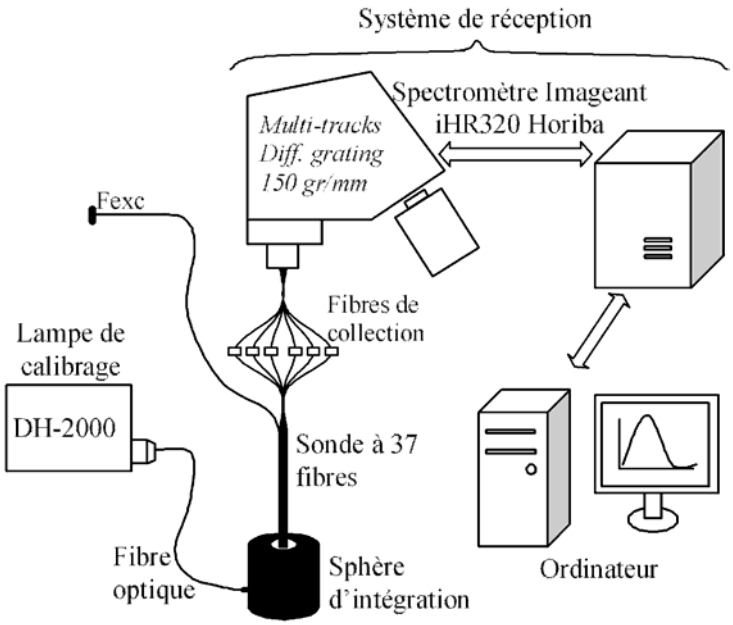

FIGURE 2.13 – Schéma de la configuration expérimentale mise en œuvre pour réaliser les mesures de calibrage de la réponse spectrale du système d'acquisition.

Les figures 2.14 et 2.15 rassemblent les résultats des courbes des coefficients de correction calculés pour les différentes configurations instrumentales mentionnées et utilisées dans le cadre du protocole d'étude *in vivo* détaillé dans le chapitre 3.

La figure 2.14a représente la courbe spectrale étalon de la lampe de calibrage ; les figures 2.14b, 2.15d et 2.15f montrent les courbes des spectres d'intensité de la lampe acquises pour 3 configurations instrumentales (6 fibres de réception, 1 réseau de diffraction à 150 *traits/mm* et 6 voies configurées du CCD) correspondant à l'emploi de 3 filtres d'émissions différents, de longueur d'onde de coupures 400, 435 et 455 *nm* respectivement. Les figures 2.14c, 2.15e et 2.15g montrent les courbes des coefficients spectraux calculés pour corriger la réponse spectrale du système aux excitations 360 et 368 *nm* (figure 2.14c) , 390 et 400 *nm* (figure 2.15e), et 410, 420 et 430 *nm* (figure 2.15g) respectivement.

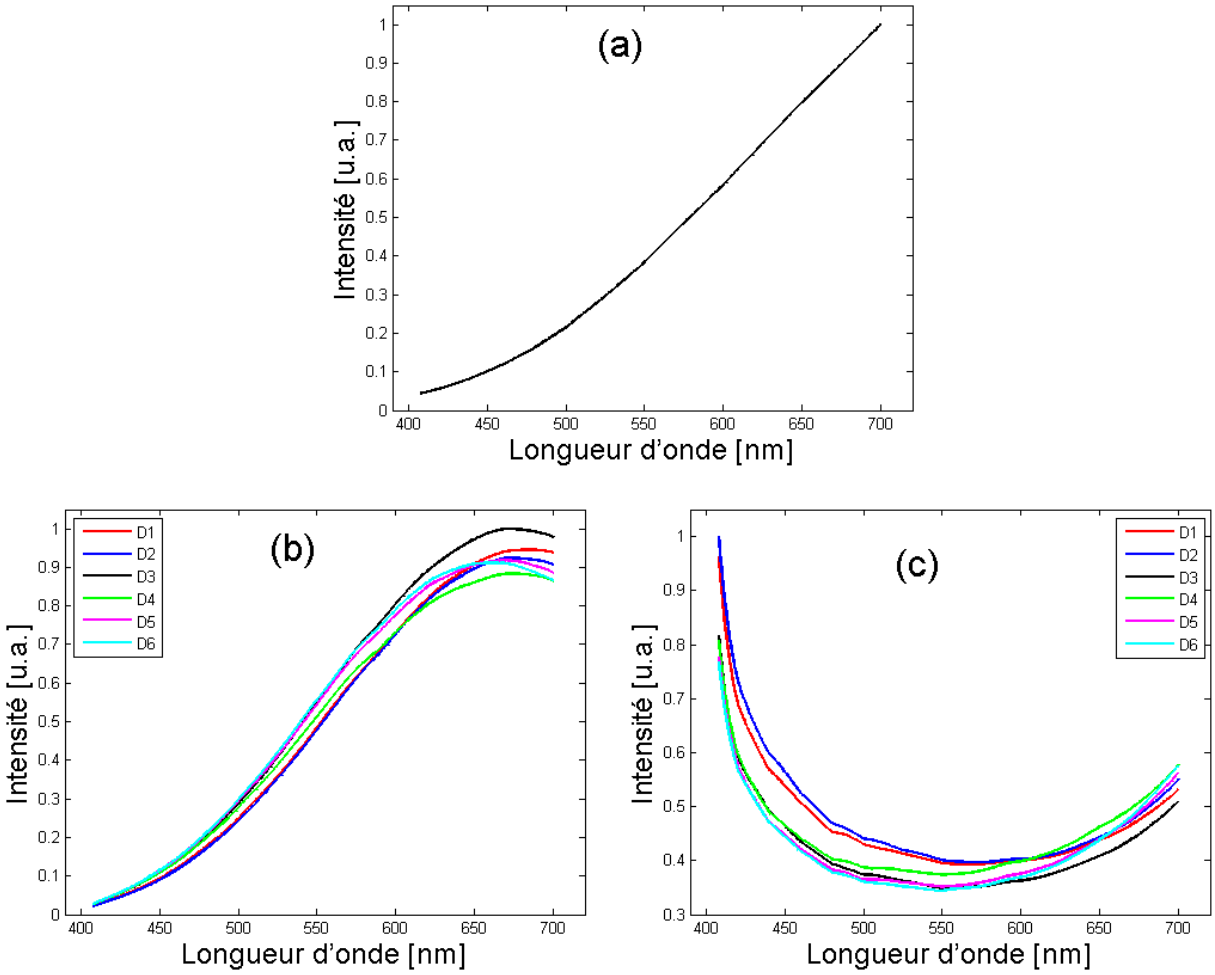

FIGURE 2.14 – Courbes des coefficients spectraux calculés pour corriger la réponse spectrale du système d'acquisition dans le cas des mesures en AF pour trois configurations instrumentales avec 6 distances entre fibres d'excitation et de réception, un réseau de diffraction 150 traits/mm et un découpage du CCD en 6 voies. a) Courbe spectrale étalon de la lampe de calibrage. A gauche : spectres d'intensité acquis avec la configuration instrumentale utilisant un filtre d'émission de longueur d'onde de coupure à b) 400 nm. A droite : c) coefficients de corrections spectrales calculés pour les mesures réalisées avec la configuration instrumentale correspondante b).

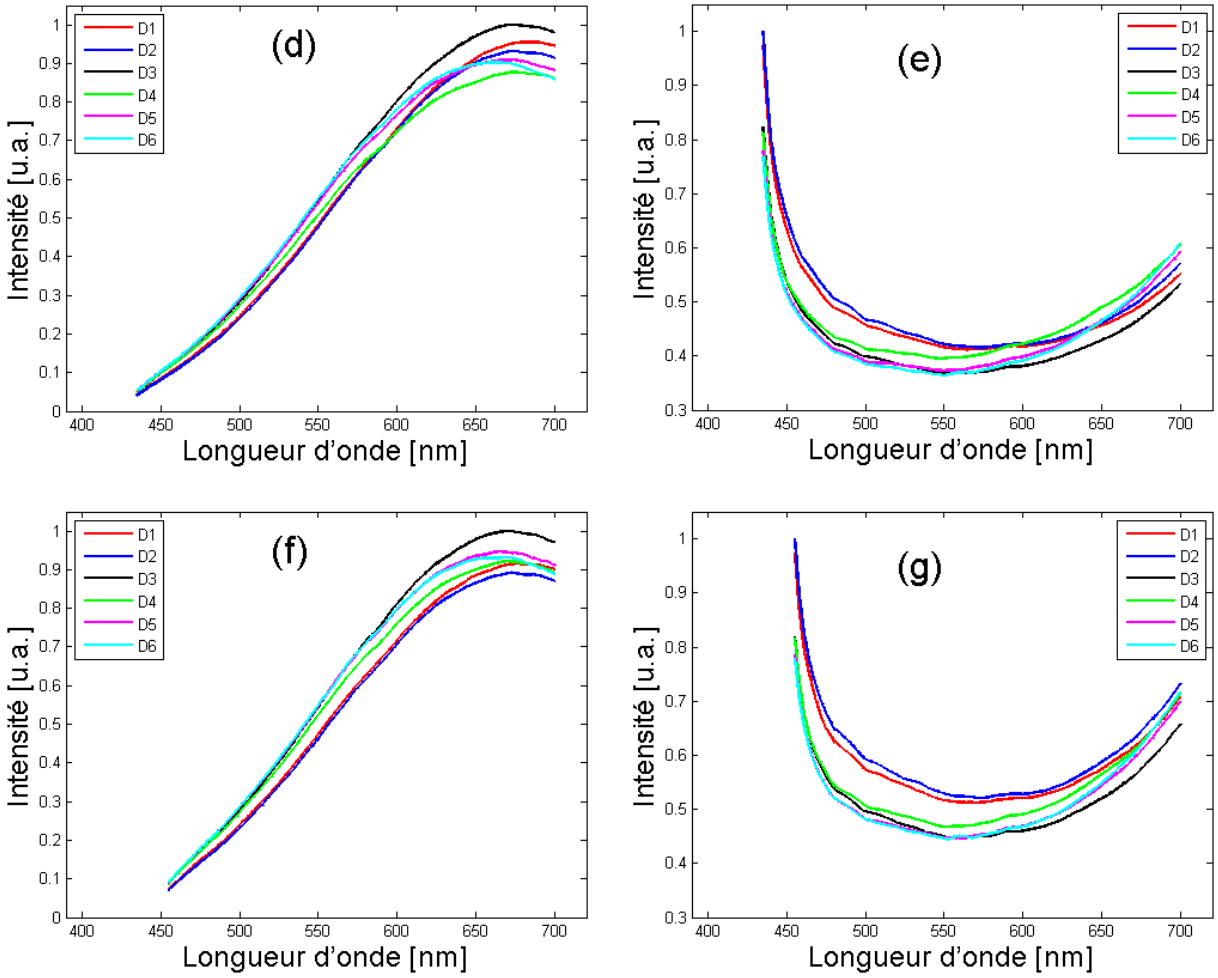

FIGURE 2.15 – Courbes des coefficients spectraux calculés pour corriger la réponse spectrale du système d'acquisition dans le cas des mesures en AF pour trois configurations instrumentales avec 6 distances entre fibres d'excitation et de réception, un réseau de diffraction 150 traits/mm et un découpage du CCD en 6 voies. A gauche : spectres d'intensité acquis avec la configuration instrumentale utilisant un filtre d'émission de longueur d'onde de coupure à d) 435 nm et f) 455 nm. A droite : e) et g) coefficients de corrections spectrales calculés pour les mesures réalisées avec les configurations instrumentales correspondantes d) et f).

Pour corriger la réponse spectrale du système pour les mesures en diffusion élastique, nous avons utilisé le principe de calcul de la RD [Zeng *et al.*, 1993][de Veld *et al.*, 2005] qui consiste à diviser les spectres de DE mesurés sur le tissu par celui mesuré sur un standard de réflexion diffuse possédant une surface de réflexion lambertienne et une réponse spectrale "plate" de 200 à 1200 nm (WS-1, Ocean Optics). La figure 2.16 montre le schéma représentatif de la mesure de calibrage en diffusion élastique. La sonde fibrée est positionnée en contact sur la surface du standard à l'aide d'une platine de déplacement micrométrique.

Correction de la variation de puissance de la source de lumière

La source d'excitation (Lampe Xénon 300W) utilisée pour notre système présente une variation relative de puissance en fonction au temps d'utilisation. Sur la figure 2.17, on peut observer

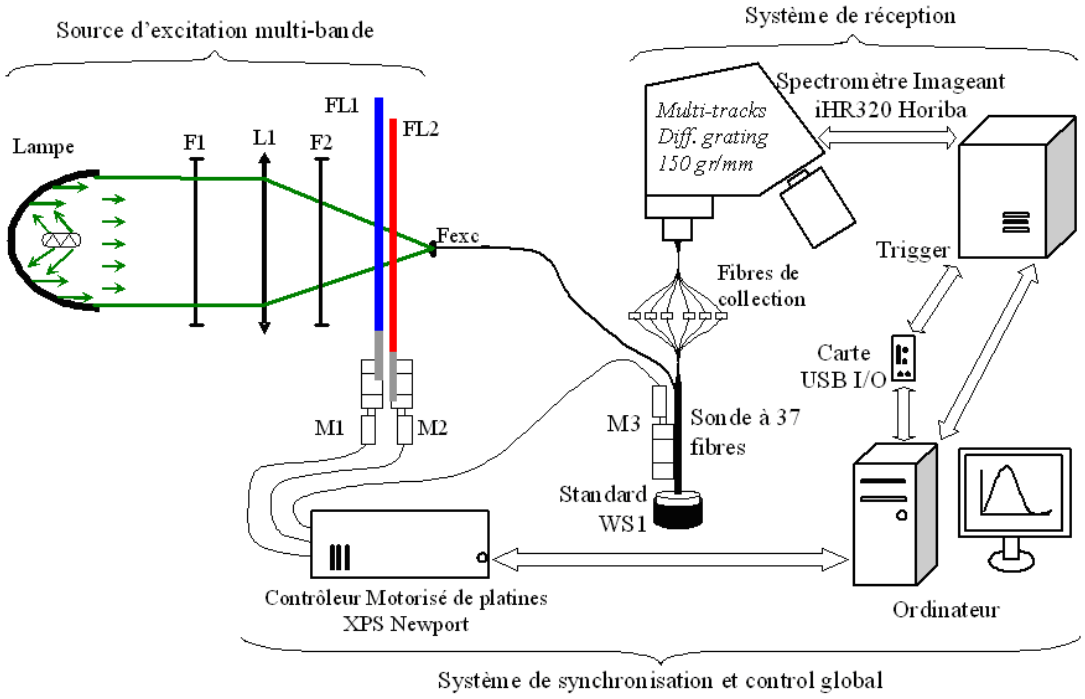

FIGURE 2.16 – Schéma de la configuration du système expérimental pour la mesure en diffusion élastique sur un standard en réflexion diffuse.

cette diminution de puissance relative en fonction du temps, forte (prés de 25%) au cours des premières 50 heures, faible et à tendance linéaire ensuite (-2,5% entre 50-100 heures ; -4.5% entre 100-500 heures).

La correction par rapport à la diminution au cours du temps de la puissance de sortie de notre source d'excitation a été réalisée pendant les 7 mois de durée du protocole expérimentale *in vivo* mené et décrit en chapitre 3.

Nous avons effectué des mesures quotidiennes de puissance lumineuse [Chang *et al.*, 2002b] [Chang *et al.*, 2005][Marín *et al.*, 2006] pour chaque faisceau d'excitation d'AF en utilisant un puissancemètre Newport 841-PE muni d'un capteur optique Newport 818-UV. Pour tenir compte de ces variations de puissance de la source, nous avons divisé les spectres d'émission en AF par la puissance mesurée de l'excitation correspondante.

La figure 2.18 représente l'évolution des mesures de puissance réalisées pour chaque excitation d'AF au cours du protocole. Nous observons des augmentations significatives de puissance au 9e jour de mesures, dues à un ajustement de la focalisation lumineuse dans la fibre d'excitation, au 23e jour où nous avons remplacé le filtre passe-bande d'excitation utilisé pour les excitations 360 et 368 nm par un filtre possédant une meilleure transmission et au 33e où la lampe Xénon a été remplacée (après 450 heures de fonctionnement) pour une lampe neuve.

Pour les mesures en DE, les variations de la source sont compensées par le calcul de la RD.

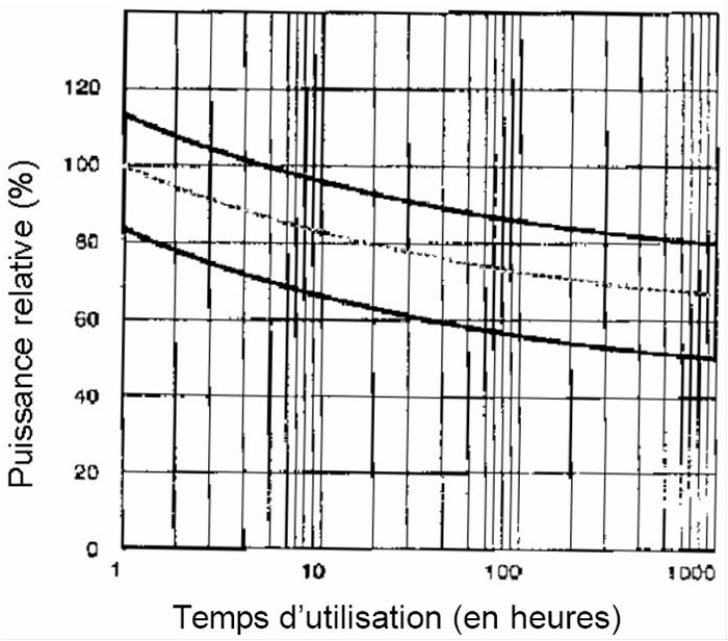

FIGURE 2.17 – Courbes typiques moyenne (trait pointillé), minimale et maximale (traits pleins) de variation de la puissance relative au cours du temps d'utilisation de la lampe Xénon 300 W (http ://www.eurosep.com).

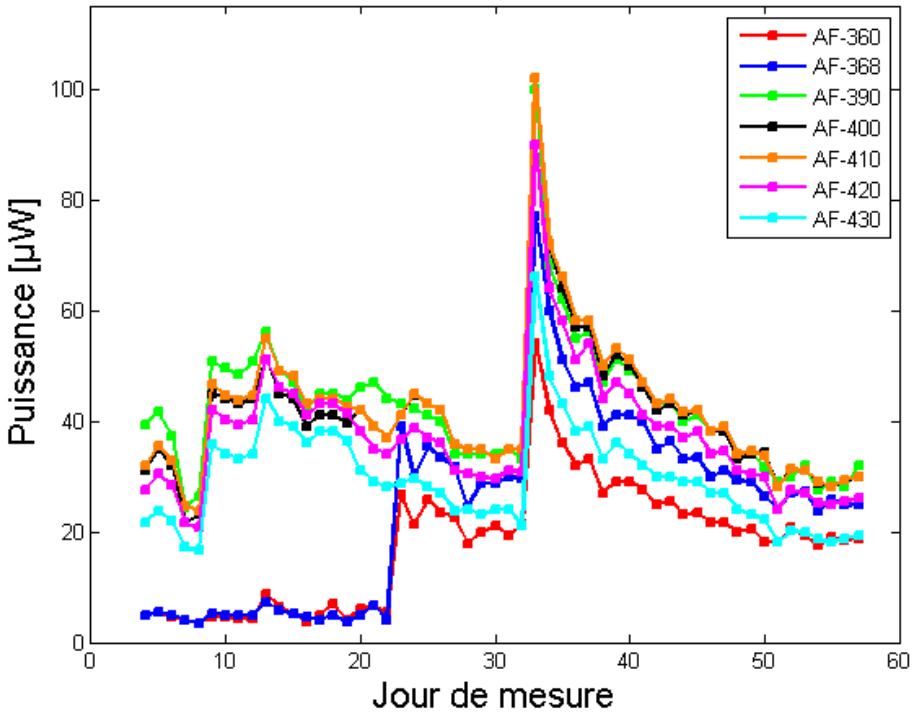

FIGURE 2.18 – Courbes des mesures quotidiennes de puissance d'excitations d'AF au cours du protocole expérimentale *in vivo* mené au laboratoire de avril 2007 à octobre 2007.

2.6 Protocole expérimental *in vivo* pré-clinique

Présentation synthétique des principaux éléments du protocole (préparation, moyens, réalisation) rédigé de façon détaillé dans la thèse de Marine Amouroux [Amouroux, 2008].

2.6.1 Modèle animal

L'évaluation des performances de la spectroscopie bimodale pour le diagnostic et la caractérisation *in vivo* des états précancéreux de peau implique de suivre les étapes de la cancérogenèse sur un modèle animal, donnant accès à un nombre suffisant de prélèvements de tissus au cours du temps. Deux façons d'induire la carcinogenèse ont été largement décrits dans la littérature sur la peau de souris : chimiquement par application de DMBA-TPA [Diagaradjane *et al.*, 2005] et optiquement par exposition aux rayonnements ultra - Violet (UV) [Reeve *et al.*, 2005]. Toutefois Pentland et al. [Pentland *et al.*, 2004] ont montré que les modèles pré-cliniques servant à tester les stratégies de chimio-prévention doivent tenir compte spécifiquement de l'étiologie du cancer dans leur conception. Comme mentionné au chapitre 1, le principal facteur étiologique de formation de CE chez les humains est l'exposition au rayonnements UV solaire [de Gruijl and van der Leun, 2002].

C'est la raison principale pour laquelle nous avons choisi de privilégier une méthode d'induction de tumeurs cutanées "spontanées" proche de l'étiologie humaine par photocarcinogenèse UV-induite sur la peau de souris SKH-1 (albinos et sans poils).

Ainsi 72 souris femelles de race SKH-1 (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France), âgées de 4 semaines à la livraison, ont été utilisées. Il s'agit d'une race de souris albinos et glabres. Une semaine après livraison, elles pèsent en moyenne 20g (16,1 g et 24,1 g pour les poids minimum et maximum respectivement).

Les souris ont été hébergées au sein de l'animalerie centrale de la Faculté de médecine de l'Université Henri Poincaré (Nancy Université) agréée par la Direction Départementale des Services Vétérinaires de Meurthe et Moselle.

Notre protocole d'étude a été approuvé par le Comité Régional d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale.

2.6.2 Induction de tumeurs cancéreuses précoces cutanées

Les rayonnements UV sont un cancérogène complet, c'est-à-dire, responsable de l'induction de cancers, de leur promotion et de leur progression. Il provoquent des dommages dans l'ADN qui surgissent spontanément à partir des substances endogènes chimiques produites au cours du métabolisme, le stress oxydatif et l'inflammation chronique [Franco and Rohan, 2002].

Dans le cadre d'études pré-cliniques, l'exposition de la peau des souris aux rayons UV pendant 30 semaines vise à induire en premier lieu une inflammation aiguë puis une inflammation "chronique" liées à l'activation des cellules immunitaires provoquée par l'exposition continue. Ces cellules sécrètent des substances qui donnent lieu à un remodelage de tissu excessif (perte de l'architecture) et augmentent le risque de développement d'états néoplasiques [de Visser and Coussens, 2006].

Par ailleurs, la reconnaissance du fait que les tissus anormaux sont associés au développement du cancer ne signifie pas nécessairement que tous les cancers de ce site se développeront à partir de ces lésions. Ainsi, la validation des précurseurs de cancer comme paramètres intermédiaires de développement du cancer est un défi, car le prélèvement de tissu interrompt ou modifie nécessairement le cours de l'histoire naturelle du processus néoplasique.

Photo-Induction tumorale

L'exposition chronique aux UV de la peau des souris SKH-1 a été réalisée à l'aide d'un banc d'irradiation (Daavlin, Belgique), comprenant huit tubes fluorescents (TL/12, Philips, Pays-Bas) émettant principalement dans la gamme UVB (50% de l'émission dans la gamme spectrale 290-320 nm) comme représenté en figure 2.19.

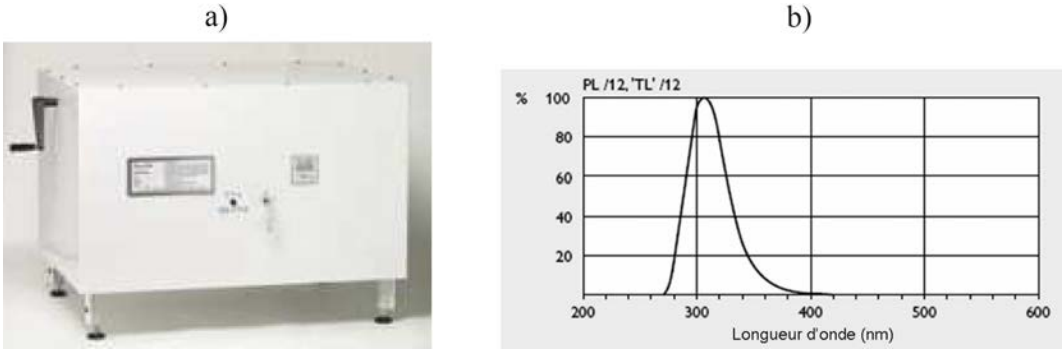

FIGURE 2.19 – Photographie de l'appareil d'irradiation ultraviolette (Research Irradiation Unit, Daavlin, Belgique), b) Spectre d'émission des tubes TL/12 Philips en place.

Les souris ont été irradiées à une fluence de 3 mW/cm^2, à une distance de 23 cm sous les tubes, pendant 20 secondes à chaque séance. Les souris sont disposées dans une petite cage placée à chaque fois au même endroit (au centre) sous le banc afin de fournir une dose aussi homogène que possible spatialement.

Les irradiations ont été effectuées une fois par semaine pendant les 15 premières semaines, puis deux fois par semaine au cours des dernières 15 semaines. Les irradiations ont été systématiquement réalisées au moins 2 jours avant les mesures spectroscopiques hebdomadaires afin d'éviter une réaction aiguë risquant d'affecter les mesures.

2.6.3 Mesures spectroscopiques bimodales

Jusqu'à présent, une seule étude [Diagaradjane *et al.*, 2005] a été publiée sur la spectroscopie optique associée à l'évaluation histologique de la cancérogenèse chimiquement induite sur la peau de souris. L'un des principaux résultats de cette étude est que l'utilisation de plusieurs longueurs d'onde d'excitation d'AF améliore la précision de la classification des états précoces de CE comparé à l'utilisation d'une seule longueur d'onde d'excitation.

Dans les sections suivantes nous détaillons la mise en place des mesures en spectroscopie bimodale, en décrivant la configuration instrumentale retenue, la préparation des animaux et l'acquisition des spectres.

2.6.3.1 Configuration instrumentale

Pour le protocole mis en place, les caractéristiques retenues pour l'instrumentation (figure 2.8) décrite dans la section 2.4 de ce travail de thèse sont les suivantes :

- Pour la spectroscopie d'autofluorescence : 7 pics d'excitation centrés à 360, 368, 390, 400, 410, 420, et 430 nm (figure 2.20a).
- Pour la spectroscopie de diffusion élastique : 3 bandes d'excitation chevauchantes 365-545, 450-640 et 550-740 nm (figure 2.20b).
- Pour la résolution spatiale, nous avons choisi de façon arbitraire 6 fibres de réception (figure 2.21, fibres : 33, 16, 30, 19, 8 et 26) situées à 5 distances différentes de la fibre d'excitation (2 x 271, 536, 834, 1076 et 1341 μm).
- Le spectromètre iHR320 et le détecteur ont été configurés pour l'acquisition de 6 spectres sur les voies 2, 4, 6, 8, 10 et 12 de la matrice CCD, avec une largueur de fente d'entrée de 1 mm pour les acquisitions en AF et de 0.01 mm pour les acquisitions en RD avec des temps d'intégration de 500 ms et de 50 ms respectivement.

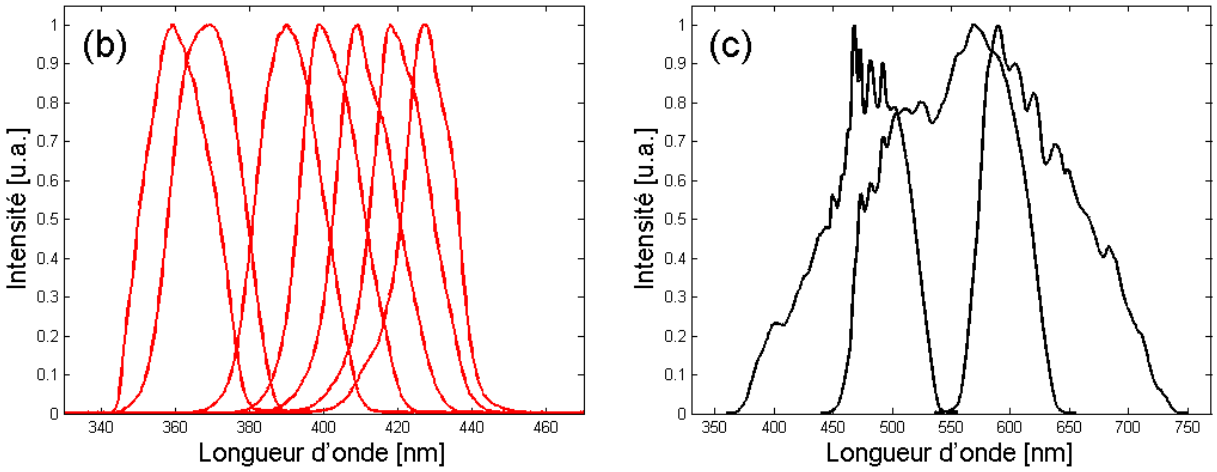

FIGURE 2.20 – Spectres d'intensité d'excitation choisis pour la spectroscopie d'autofluorescence et de réflectance diffuse respectivement : a) 7 longeurs d'onde d'excitation pour l'AutoFluorescence : 360, 368, 380, 390, 400, 410, 420 et 430 nm ; b) 3 bandes d'illumination pour la Réflectance Diffuse : 365-545, 450-640 et 550-740 nm

2.6.3.2 Préparation des animaux

Avant toute mesure spectroscopique, chaque souris a suivi une préparation afin d'assurer l'efficacité et la fiabilité du protocole (pesée, calcul de dose d'anesthesique). Durant l'anesthésie (environ 75 minutes), les souris sont allongées sur une couverture chauffante (Température Control Unit HB 101/2, Vitrolles, Bioseb) fixée à 35° C.

La méthode d'induction de tumeurs cutanées "spontanées" choisie implique une difficulté technique à savoir l'ignorance *a priori* des localisations tumorales. L'enjeu dans ce cas est donc de pouvoir sonder une portion significative du corps de l'animal soumis à irradiation afin d'obtenir une densité de points de mesure suffisante et en un temps compatible avec une durée d'anesthésie non létale pour l'animal. D'après la littérature, les tumeurs se développent préférentiellement

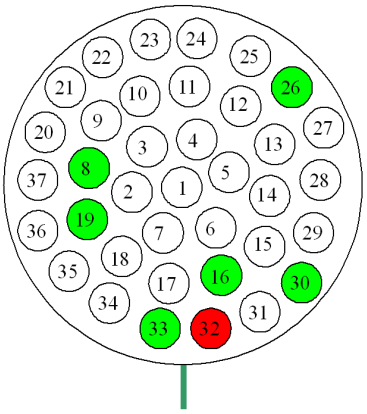

FIGURE 2.21 – Configuration géométrique de l'extrémité distale de la sonde multi-fibres. Pour notre étude *in vivo* la fibre 32 a servi pour l'excitation et les fibres 8, 16, 19, 26, 30 et 33 pour la réception.

dans la zone médiane à proximité de la colonne vertébrale. Nous avons donc choisi de concentrer notre exploration sur la moitié de la surface soient 12 sites anatomiques de mesure (6 de chaque côté le long de la colonne vertébrale) représentés schématiquement en figure 2.22. Un contrôle intra-individuel de peau saine est nécessaire et pour cela la peau du ventre est également sondée (6 points de mesure).

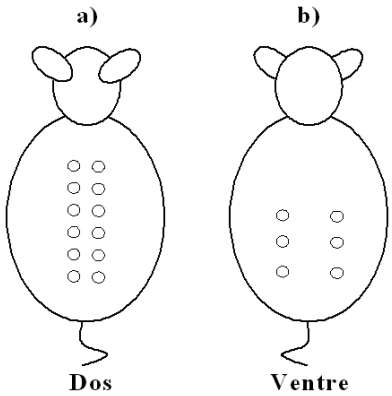

FIGURE 2.22 – Localisation schématique des sites anatomiques de mesure en spectroscopie bimodale sur la peau de souris : a) 12 sites sur le dos (6 le long de la colonne vertébrale) ; b) 6 sites sur le ventre.

Pour repérer de manière fiable les sites anatomiques de mesure, un cache translucide est fixé sur le dos des souris a l'aide de sparadrap micro-poreux afin de ne pas les blesser (figure 2.24). Il s'agit d'un rectangle en plastique de 2x3 cm^2, comprenant quatre rangées de 6 trous de 3 mm de diamètre. Les centres de ces trous sont espacés de 5 mm laissant ainsi un espace de 2 mm entre les trous (figure 2.23).

2.6.3.3 Acquisition des spectres

Un certain nombre de précautions doivent être prises afin de réaliser l'acquisition des spectres dans des conditions de mesures correctes et fiables.

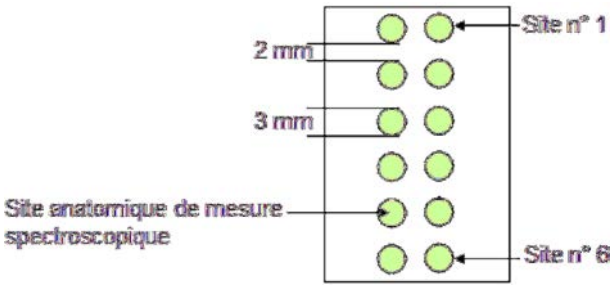

FIGURE 2.23 – Schéma du cache en plastique translucide utilisé pour repérer les sites anatomiques de mesures spectroscopiques.

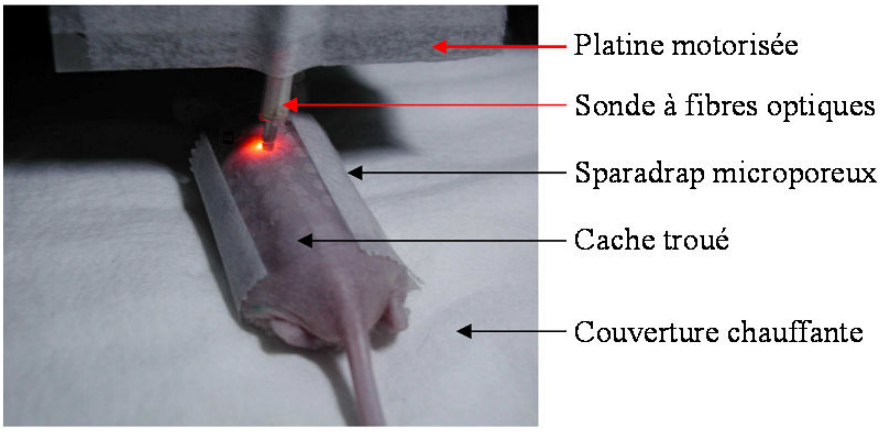

FIGURE 2.24 – Photographie d'une souris anesthésiée installée sur la couverture chauffante et portant sur le dos le cache troué fixé à l'aide de sparadrap.

Un première contrainte concerne le placement de la sonde à fibres optiques sur la peau de la souris et en particulier la difficulté de réaliser des mesures dans des conditions de répétabilité acceptables c'est à dire avec le même angle et la même pression de la sonde sur le tissu. Pour contrôler l'angle et éviter des mouvements incontrôlés pouvant donner des acquisitions erronées ou déviées, la sonde à fibres optiques est fixée sur une platine de translation motorisée (figure 2.24). L'angle par rapport à la surface dorsale de la souris est fixe et égal à 90°. La pression est estimée visuellement, la sonde placée au contact de la peau des souris induit une dépression du tissu de quelques millimètres (2 à 3 mm environ). Le réglage de la position de descente de la sonde est effectué logiciellement avec des déplacements de 5 mm et 0.5 mm.

Une seconde contrainte est liée aux perturbations de la lumière ambiante sur les spectres acquis. Pour éviter ces perturbations, nous avons réalisé les mesures spectroscopiques en totale obscurité, c'est-à-dire, avec les lumières de la salle d'expérimentation éteintes et une toile noire recouvrant l'espace de mesure évitant ainsi les perturbations dues à la présence des LEDs sur les différents instruments utilisés dans l'expérimentation.

Protocole de mesures spectroscopiques

Les mesures ont été réalisées sur la peau irradiée et non irradiée des souris tous les 2 jours, chaque semaine d'avril à octobre 2007.

Chaque souris est anesthésiée, placé sur une couverture chauffante puis le cache troué est fixé sur son dos à l'aide du sparadrap.

La sonde à fibres optiques est alors placée en contact sur le tissu et la pression est ajustée visuellement en contrôlant le déplacement de la platine motorisée sur laquelle est fixée la fibre et en bougeant la couverture chauffante pour placer correctement le site de mesure. La pression de la sonde sur la peau de la souris est réglée en montant ou en baissant la sonde par pas de 0.5 mm de façon automatique.

Suite au placement de la sonde sur le site de mesure, les dix différentes mesures en spectroscopie bimodale sont lancées. Les 7 excitations en AF et les 3 bandes d'excitation pour la diffusion élastique, multipliées par trois accumulations pour chaque, prennent au total près de 3 minutes. Les spectres acquis sont enregistrés de façon automatique dans des fichiers Excel sous la forme de matrices 2D : valeurs d'intensités en lignes et excitation et nombre d'accumulation correspondante en colones.

2.6.4 Etude histopathologique

Deux souris sont sacrifiées chaque semaine tout au long des sept mois de la photocarcinogenèse. Le sacrifice a lieu dans les six heures suivant la fin des mesures spectroscopiques.

Prélèvement cutané

Une fois anesthésiées par injection intra-péritonéale, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale.

Plusieurs marquages sont réalisés sur la peau à prélever à l'aide d'encre de Chine (figure 2.25b), afin de repérer les sens (tête et queue) et les bonnes dimensions de l'échantillon tissulaire decoupé.

Le lambeau de peau prélevé est étalé sur une plaque en polystyrène et maintenu à l'aide d'aiguilles, afin qu'il ne soit ni recroquevillé ni écartelé et en respectant les repères centimétriques marqués à l'encre de Chine (figure 2.25c).

L'ensemble du support polystyrène + peau + aiguilles est plongé dans un liquide fixateur (Alcool Formolé Acétique, AFA). Après avoir trempé 48 à 72 heures dans le liquide fixateur, les lambeaux de peau sont considérés comme "fixés".

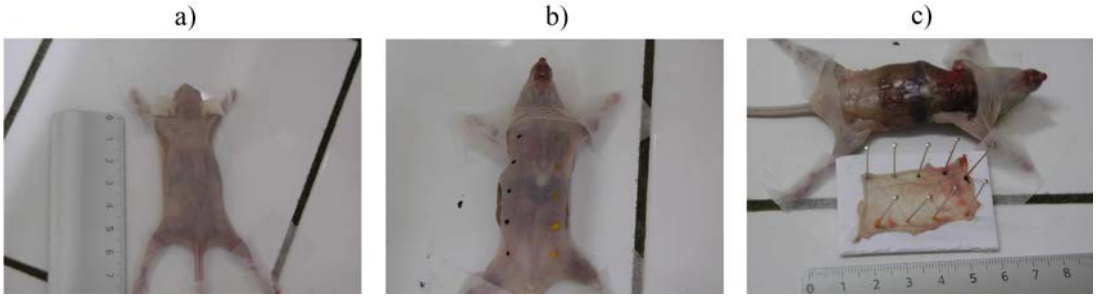

FIGURE 2.25 – Mise en place de l'animal après sacrifice, pour prélèvement cutané. a) Les pattes sont maintenues collées à la paillasse grâce à du sparadrap ; b) Repères centimétriques marqués sur la peau de la souris (peau du ventre en l'occurrence) ; c) Lambeau de peau prélevé posé sur un support en polystyrène et maintenu en place grâce à des aiguilles.

TABLE 2.3 – Seuils d'épaisseurs de l'épiderme des souris SKH1 du groupe contrôle (non irradiées) pour distinguer un épiderme "normal" d'un épiderme hyperplasique. Ces valeurs seuil sont définies par : moyenne + 2 x écart-type. Les moyennes ont été calculées sur 8 souris saines, pour 2 échantillons par souris et pour 10 mesures par échantillons soit n= 160.

Site anatomique de mesures spectroscopiques	1	2	3	4	5	6
Valeurs de seuil d'épaisseur d'épiderme normal (moyenne en μm)	21	29	30	27	27	40

Classification histopathologique

Nous présentons ici les principaux résultats d'intérêt, les éléments détaillés de cette étude sont consultables dans [Amouroux, 2008].
Nous avons décidé d'effectuer une classification histopathologique en deux étapes. La première étape vise à discriminer l'épiderme hyperplasique de l'épiderme non hyperplasique de la peau. L'hyperplasie est définie comme une augmentation de la taille d'un tissu ou d'un organe due à une augmentation du nombre de cellules. Elle peut-être physiologique, compensatoire ou pathologique [Franco and Rohan, 2002].

Pour ce faire, il a été nécessaire de déterminer un intervalle d'épaisseur de l'épiderme normal (sain).

Les mesures d'épaisseur ont été réalisées sur images acquises au microscope (grossissement x10 à x100, Axioskop, Zeiss, Allemagne) équipé d'une caméra CCD (DXC-390p, Sony, Japon). Un logiciel d'acquisition d'images (Tribvn ICS, Tribvn, France) et un logiciel de traitement de données (Osiris, Unité d'Imagerie Numérique de l'Hôpital de Genève, Suisse) ont été utilisés. La distribution gaussienne de l'ensemble des données a été vérifiée. Ensuite, la plage normale a été définie en fonction de ce qui est généralement recommandé pour les données ayant une distribution gaussienne : moyenne ± 2 x écart type (ET) [Marshall and Bangert, 1995]. L'épiderme est classé comme "hyperplasique" si son épaisseur est supérieure à cette valeur de seuil (tableau 2.3).

En raison de la réponse interindividuelle variable aux rayons UV, nous avons décidé de classer les échantillons de peau exclusivement en fonction de l'évaluation histologique et non en fonction de la dose d'irradiation ou de la durée d'exposition. Il est important de faire la comparaison histologique de la peau normale et de la peau irradiée pour les sites anatomiques correspondants, surtout dans notre cas où l'épaisseur de l'épiderme est un des critères utilisés pour définir l'hyperplasie.

Au début de l'exposition aux rayonnements UV (3 à 6 semaines d'exposition), la peau affiche une prolifération des cellules qui vise à régénérer les tissus et conduit à une hyperplasie de type compensatoire (HC). Un épaississement de l'épiderme, ainsi qu'un épaississement de la kératine (couche hyperkératose) sont obsservées, mais pas de caractéristiques cancéreuses cytologiques (les noyaux des cellules et l'organisation des couches semblent toujours normales) ni structurales (fibres élastiques cutanées normales).

Après 6 mois d'exposition aux rayonnements UV, la peau est non seulement devenue hyperplasique, mais montre également des caractéristiques cancéreuses. Nous avons distingué deux types de cancer liés aux caractéristiques des noyaux et à la maturation de la kératine respectivement.

Table 2.4 – Résumé des résultats de classification histopathologique des 252 prélèvements étudiés.

Classes	Saine (S)	Hyperplasie Compensatoire (HC)	Hyperplasie Atypique (HA)	Dysplasie (D)
# prélèvements	84	47	64	57

Sur la base des modifications histologiques et cytologiques observées dans certains CEs développés, nous avons défini les trois classes histologiques suivantes : Hyperplasie Compensatoire (HC) considérée comme non-précurseur de cancer, et Hyperplasie Atypique (HA) et Dysplasie (D) véritables états précurseurs de cancer [Franco and Rohan, 2002]. Il est à noter que discriminer la classe HC des deux autres types d'hyperplasies (AH et D) représente un véritable intérêt médical.

Les résultats finaux de classification histopathologique obtenus sur un total de 252 prélèvements de peau de souris sont résumés dans le tableau 2.4 : 84 ont été classés dans la catégorié saine (S), 47 en hyperplasie compensatoire (HC), 64 en hyperplasie atypique (HA) et 57 en dysplasie (D).

2.7 Conclusion et perspectives

Nous avons construit et caractérisé métrologiquement une instrumentation simple et automatisée pour la spectroscopie optique fibrée bimodale résolue spatialement, permettant de programmer des excitations multiples pour l'AF entre 360 et 450 nm, pour la RD entre 390 et 720 nm, et d'effectuer l'acquisition de spectres jusqu'à 13 distances inter fibres en même temps.

L'instrumentation développée a permis de mener à bien un protocole de mesures des états sains et précancéreux de peau *in vivo* sur animal d'avril à novembre 2007. Au cours de cette étude, nous avons acquis au total plus de 170.000 spectres (AF et RD).

Les travaux prévus à moyen terme pour améliorer l'instrumentation développée, sont notamment :

- Réaliser une routine de calibrage automatique des positions des FOLVs afin de vérifier la répétabilité des faisceaux d'excitation.
- Modifier la chaîne mécanique de positionnement des FOLVs afin de pouvoir réaliser la mesure de RD entre 350 et 750 nm en une seule fois.
- Augmenter les puissances d'excitation pour l'AF afin d'améliorer la résolution optique de mesures spectroscopiques et le rapport signal sur bruit des mesures, soit en utilisant une nouvelle configuration géométrique de la sonde à fibres optique, soit en optimisant la focalisation lumineuse dans la fibre d'excitation de la sonde actuelle.

3

Études spectroscopiques sur tumeurs cancéreuses précoces cutanées *in vivo*

3.1 Etat de l'art sur le traitement des données en spectroscopie optique UV-Visible

Le développement de méthodes adaptées pour le traitement des données issues de mesures de spectroscopie optique *in vivo* (appliquée au diagnostic du cancer) est indispensable pour établir la présence de caractéristiques spectrales permettant de différencier les tissus normaux et les tissus tumoraux et parvenir à classer différents niveaux d'états précancéreux en particulier lorsque les classes histopathologiques ne présentent pas de différence assez visible au niveau spectral.

La majorité des travaux publiés utilisent des techniques empiriques exploitant l'information d'intensité à des longueurs d'onde ou dans des gammes spectrales spécifiques. Ces approches sont faciles à mettre en œuvre, mais elles n'exploitent pas les caractéristiques du spectre complet. D'autres travaux utilisent des approches statistiques en considérant habituellement un modèle linéaire entre les données (caractéristiques) spectrales, telles que l'analyse en composants principales (ACP), les régressions linéaires, etc. Des méthodes non linéaires plus récentes (Réseaux de Neurones Artificiels RNAs, Support Vector Machine SVM, etc.) sont également testées afin d'améliorer l'efficacité de la méthode diagnostique.
Le prétraitement des données en spectroscopie optique tissulaire est indispensable pour corriger et rendre comparables les données acquises. Des procédures de calibrage (méthodologies pour la caractérisation de l'instrumentation, la validation, etc.) sont couramment employées pour le prétraitement des données acquises [Marín *et al.*, 2006].

Ainsi, les algorithmes de traitement des données spectroscopiques multi-dimensionnelles, sont en général composés de trois étapes :

i) Le prétraitement : corrections, calibrages, normalisations, filtrages, etc,

ii) La réduction de la dimension de jeu de données : extraction/sélection de caractéristiques significatives,

iii) La classification : le plus souvent supervisée sur la base des classes histopathologiques définies et permettant le calcul de la Sensibilité (Se) et la Spécificité (Sp) de la méthode.

Pour chacune de ces trois parties, une étude bibliographique spécifique est présentée dans les sections suivantes.

3.1.1 Méthodes développées pour le prétraitement des données spectroscopiques

Prétraitements réalisés en spectroscopie AF

Un facteur important limitant l'extension rapide de la spectroscopie de fluorescence est la grande difficulté de faire des mesures d'intensité de fluorescence, comparables en valeur absolue entre les différentes équipes ou laboratoires. En 2001 le "National Institute of Standards and Technology" (NIST) a identifié la nécessité de développer et de fournir des références standardisées pour le calibrage en spectroscopie de fluorescence aux communautés scientifiques et techniques impliquées dans ces analyses [Gaigalas *et al.*, 2001].

La plupart des travaux publiés en spectroscopie de fluorescence *in vivo* ne présentent pas en détail la procédure spécifique utilisée pour le prétraitement des spectres d'AF. Marín et al. [Marín *et al.*, 2006] sont les seuls à décrire une méthodologie complète associée à des méthodes d'analyse statistique dans le but de simplifier et d'assurer la validité des données acquises avec différents instruments utilisés en essais cliniques (cf. figure 3.1). L'organigramme proposé par Marín et al. en 2006 comprend les principales étapes liées aux calibrages métrologiques pour l'instrumentation (voir section 2.1.5) suivantes :

- La soustraction de la lumière ambiante (ils ne mentionnent pas de quelle manière),
- La correction des variations d'intensité de la source d'excitation en utilisant un puissancemètre optique,
- L'étalonnage en longueur d'onde en utilisant la mesure de 5 pics du spectre connu d'une lampe à mercure,
- Le lissage des signaux acquis en utilisant un filtre polynomial de type Savitzky-Golay pour supprimer le bruit de haute fréquence,
- La correction de la réponse spectrale du système en utilisant une lampe au tungstène,
- La correction basée sur des facteurs de corrections issus de mesures sur standards est réalisée lorsque des données acquises à l'aide d'instruments différents sont combinées dans une même étude. Deux étapes de correction sont à adapter pour compenser les différences entre les instruments (il faudra utiliser le même type de standards) : la correction des variations d'intensité et la correction de la réponse spectrale du système.

De Veld et al. [de Veld *et al.*, 2003][de Veld *et al.*, 2004][de Veld *et al.*, 2005] décrivent partiellement une partie de leurs prétraitements de données sans fournir beaucoup de détails. Leur méthode comprend : la suppression des spectres erronés suivi du moyennage de 3 mesures sur chaque site tissulaire ; l'étalonnage en longueur d'onde en utilisant une lampe mercure-argon ; la suppression des bandes spectrales ne contenant pas de signal de fluorescence ; la soustraction de la lumière ambiante ; le moyennage tous les 4 points du spectre original pour obtenir 199 points entre 455-867 nm.

Heintzelman et al. [Heintzelman *et al.*, 2000] décrivent uniquement le calibrage réalisé pour l'instrumentation et la normalisation des spectres suivant 5 étapes de correction : la correction de la lumière ambiante à partir de mesures réalisées avec la sonde immergée dans l'eau distillée ; la correction de la réponse spectrale du système en utilisant deux lampes de calibrage, deutérium pour la bande UV et tungstène pour la bande visible ; la correction des variations d'intensité de

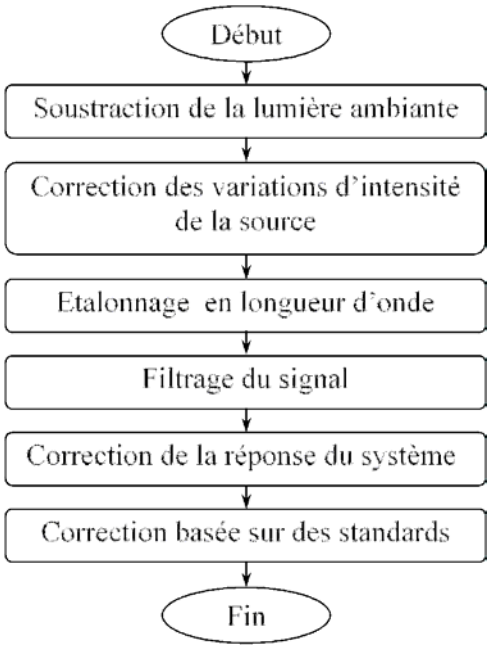

FIGURE 3.1 – Organigramme du prétraitement des données en spectroscopie de fluorescence proposé par [Marín *et al.*, 2006].

la source d'excitation en utilisant une photodiode calibrée ; la correction des intensités du spectre de fluorescence à l'aide du spectre mesuré sur une référence fluorescente à base de Rhodamine B ; finalement, la normalisation des spectres par rapport au pic maximum.

De façon similaire, Chang et al. [Chang *et al.*, 2005] la suppression des spectres erronés et ne décrivent que le calibrage réalisé pour l'instrumentation : la correction des variations d'intensité de la source d'excitation en utilisant une photodiode calibrée et la correction de la réponse du système en utilisant le spectre de deux lampes de calibrage, deutérium pour la bande UV et tungstène pour la bande visible.

D'autres travaux publiés n'utilisent pas ou ne décrivent pas complètement une méthode de prétraitement. Par exemple, Hage et al. [Hage *et al.*, 2003] mentionnent seulement l'étalonnage en longueur d'onde en utilisant une lampe à Mercure et la normalisation des données acquises. Palmer et al. [Palmer *et al.*, 2003b] réalisent la correction des variations d'intensité de la source d'excitation en utilisant une photodiode de référence ; la correction de la réponse spectrale du système en utilisant un instrument spécifique ; et la normalisation des spectres avec le pic de fluorescence de la Rhodamine B. Ramanujam et al. [Ramanujam *et al.*, 1996] réalisent la correction de la réponse spectrale du système dans la bande visible en utilisant une lampe de calibrage au tungstène et la normalisation des spectres par rapport au pic du spectre de fluorescence de la Rhodamine B.

Prétraitements réalisés en spectroscopie de réflectance diffuse

Nous n'avons pas trouvé de travaux publiés expliquant une méthodologie particulière à suivre pour le prétraitement des spectres de réflectance diffuse. Généralement, le prétraitement appliqué aux spectres de réflectance diffuse suit les mêmes étapes que le prétraitement appliqués aux spectres d'AF, à l'exclusion de la correction de la réponse spectrale du système.

Dans les travaux de De Veld et al. [de Veld *et al.*, 2005] utilisant la spectroscopie bimodale, un prétraitement des spectres de RD semblable à celui des spectres de fluorescence est appliqué, avec une normalisation des spectres de RD en les divisant par le spectre mesuré sur un standard de diffusion de type spectralon (réponse spectrale plane dans la bande UV-visible et surface Lambertienne). Avec cette normalisation les spectres de réflectance diffuse sont corrigés de la réponse du système [Palmer *et al.*, 2003b].

D'autres travaux utilisant la spectroscopie de RD seule, décrivent uniquement le calibrage de l'instrumentation. Utzinger et al. [Utzinger *et al.*, 2001a] en 2001 ont réalisé comme prétraitements : la soustraction du courant d'obscurité ; la suppression de la lumière ambiante ; l'étalonnage en longueur d'onde et le filtrage du bruit de haute fréquence. La correction de la réponse spectrale du système et le calcul de la réflectance diffuse ont été réalisés grâce à des mesures sur une solution de microsphères de polystyrène (1.072 μm de diamètre) et une sphère intégrante. Marín et al. [Marín *et al.*, 2005] en 2005 ont réalisé les prétraitements suivants : la suppression de la lumière ambiante ; l'étalonnage en longueur d'onde ; la correction des variations d'intensité de la source d'excitation ; le lissage des spectres pour enlever le bruit de haute fréquence ; la suppression des artefacts ou pics parasites. La correction de la réponse spectrale du système et le calcul de la réflectance diffuse ont été réalisés grâce à des mesures sur une solution de microsphères de polystyrène (1.02 μm de diamètre).

D'autres travaux consacrés à la réflectance diffuse, ne décrivent que partiellement la méthode de prétraitement pour les spectres de RD. Par exemple, Murphy et al. [Murphy *et al.*, 2005] en 2005 mentionnent : la suppression du courant d'obscurité et la correction de la réponse spectrale du système et de la réflectance diffuse en utilisant un standard de réflectance diffuse. Zhu et al. [Zhu *et al.*, 2006] mentionnent seulement la correction de la réponse spectrale du système et le calcul de la réflectance diffuse en utilisant une sphère d'intégration.

3.1.2 Extraction/sélection de caractéristiques

a) Définitions et intérêts

Une **caractéristique** (ou attribut) est la description d'une mesure concernant un échantillon. Chaque caractéristique possède un domaine de variation défini par rapport à son type.

Les caractéristiques peuvent être classées en deux grands groupes : les caractéristiques nominales et les caractéristiques continues. Les caractéristiques nominales peuvent prendre un nombre fini de valeurs discrètes, dont il n'est pas possible d'établir une relation d'ordre. Les caractéristiques continues sont un sous-ensemble de nombres réels, dont il est possible d'établir un ordre.

Un **échantillon** est une liste de valeurs de caractéristiques qui correspond aux entités examinées dans le problème de l'apprentissage automatique étudié, par exemple il peut correspondre à : des patients ou des souris (comme dans le cas de notre étude expérimentale). Dans certains cas la représentation des échantillons est plus complexe, y compris des relations entre les échantillons, ou entre parties qui composent l'échantillon.
Pour chaque échantillon, il existe une propriété (nominal ou continu) appelée étiquette qui indique la classe à laquelle appartient l'échantillon.

Les deux grands axes de l'apprentissage supervisé sont : la sélection des caractéristiques significatives et l'obtention de règles de classification (mécanismes de classification en général).

Une des raisons pour lesquelles une sélection de caractéristiques significatives est souvent envisagée, réside dans la nécessité de rechercher le traitement de modèles simples plutôt que de modèles complexes.
[Domingos, 1999] mentionne que si deux modèles (ensembles de caractéristiques) ont la même erreur de généralisation, il est préférable de choisir le modèle simple (qui possède le plus petit nombre de caractéristiques). En général le modèle simple est plus facile à comprendre, à se rappeler et à utiliser, et aussi à manipuler sur ordinateurs (stockage).

Une autre raison justifiant la sélection de caractéristiques significatives, est que l'ajout de nouvelles caractéristiques pour un classifieur n'implique pas une augmentation du taux de réussite [Hamamoto *et al.*, 1996] pris de [Lorenzo-Navarro, 2001].
Dans des situations réelles, les caractéristiques significatives sont souvent inconnues *a priori*. Par conséquent, de nombreuses caractéristiques candidates sont introduites afin de mieux représenter le modèle. Malheureusement, beaucoup d'entre elles sont partiellement ou totalement " non significatives ou redondantes " [Dash and Liu, 1997].

L'extraction des caractéristiques (figure 3.2) est effectuée à partir d'une transformation de l'espace d'origine des caractéristiques. Il s'agit de disposer d'un espace transformé, plus approprié à l'analyse des données.

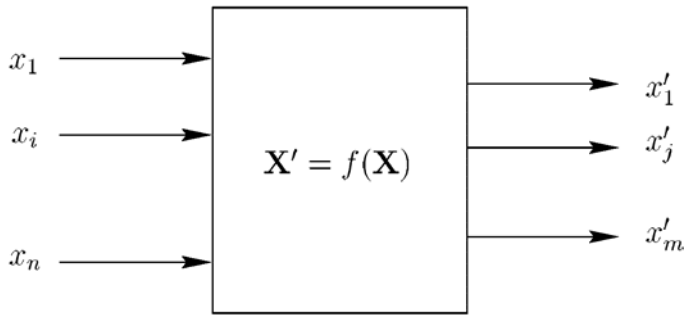

FIGURE 3.2 – Principe de l'extraction de caractéristiques (m $\ll$ n).

Sur la figure 3.3 nous observons l'organigramme de principe d'un processus de sélection de caractéristiques. On peut voir la tâche de sélection comme un problème de recherche [Langley, 1994] dans un certain espace d'états, chaque état étant lié à un sous-ensemble de caractéristiques. Cet espace englobe tous les sous-ensembles possibles qui peuvent être générés. Ce processus de sélection peut être vu comme le parcours dans cet espace pour trouver un état (une combinaison de caractéristiques) qui optimise une fonction définie sur un ensemble de caractéristiques.

La stratégie de recherche vise donc à trouver le sous-ensemble qui optimise une fonction d'évaluation. Celle-ci est définie pour un ensemble de caractéristiques en mesurant leur capacité discriminante pour distinguer les différentes classes du problème.

b) Applications aux données/caractéristiques spectroscopiques
Différentes approches d'extraction/sélection de caractéristiques ont été employées pour réduire la taille des jeux de données spectroscopiques sans ou avec peu de perte d'information utile pour la classification, et afin de mieux comprendre les relations existantes entre les spectres recueillis et les différents états tumoraux étudiés.

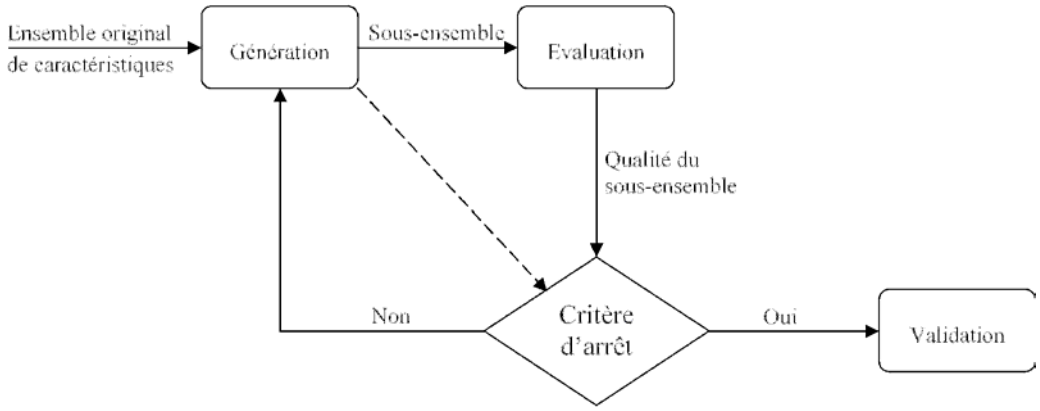

FIGURE 3.3 – Organigramme d'un processus de sélection de caractéristiques selon [Dash and Liu, 1997].

L'ACP est une technique de transformation linéaire qui permet la réduction de dimensionnalité de l'espace des paramètres en représentant la majeure partie de l'information de l'ensemble des données originales, dans les premières composantes principales (CPs) non-corrélées [Kamath and Mahato, 2007]. Elle est mise en œuvre dans de nombreux travaux pour réduire la dimension des données spectroscopiques prétraitées.

Dans leur étude en spectroscopie de fluorescence multiple pour discriminer les tissus oraux normaux, précancéreux et cancéreux, Heintzelman et al. [Heintzelman *et al.*, 2000] réalisent des combinaisons concaténées de 1, 2, 3 ou 4 spectres complets d'émission de fluorescence. Ensuite ils appliquent l'ACP en sélectionnant les sous-ensembles de caractéristiques contenues dans les premières CPs qui expliquent 65, 75, 85 et 95 % de l'information contenue dans le jeu de données initial. Pour discriminer tissus normaux et précancéreux du col de l'utérus par spectroscopie bimodale (EEMs et RD), Chang et al. [Chang *et al.*, 2005] appliquent une méthode semblable à celle de [Heintzelman *et al.*, 2000] en concaténant 1, 2 ou 3 spectres complets d'émission de fluorescence avec le spectre complet de RD.

Afin de discriminer les tissus cancéreux du sein, Breslin et al. [Breslin *et al.*, 2004] et Palmer et al. [Palmer *et al.*, 2003b][Palmer *et al.*, 2003a] utilisent l'ACP pour réduire la taille du jeu de données initial. Tout d'abord, ils appliquent une ACP de façon individuelle à chaque spectre complet de fluorescence et de RD, puis ils déterminent les CP les plus discriminantes par un test de Wilcoxon (avec un p=0.0005).

Dans la majorité des études spectroscopiques d'AF et de RD, l'extraction de caractéristiques pour distinguer les états tumoraux de tissus biologiques s'effectue sur la base de connaissances a priori ou d'observations empiriques telles que des variations d'amplitude et de forme spectrale des émissions dues à :

1) des fluorophores spécifiques dont on sait que la concentration varie avec la transformation néoplasique,
2) l'absorption par certains chromophores dont la concentration varie également,
3) la diffusion et la dispersion dans certaines bandes spectrales dues aux changements morphométriques affectant la taille nucléaire des cellules dysplasiques,

TABLE 3.1 – Caractéristiques extraites par [Wallace *et al.*, 2000b] dans le cadre d'une étude portant sur la discrimination des mélanomes de la peau humaine.

Pentes ($P_{\lambda a-\lambda b}$)	Aires ($A_{\lambda a-\lambda b}$)	Moyenne ($M_{\lambda a-\lambda b}$)	Variabilité ($V_{\lambda a-\lambda b}$)
$P_{321-578}$	$A_{321-1100}$	$M_{1039-1098}$	$V_{320-1100}$
$P_{321-418}$	$A_{927-1041}$		
$P_{449-519}$	$A_{515-616}$		
$P_{515-616}$	$A_{578-1039}$		
$P_{616-748}$	$A_{609-772}$		
$P_{826-958}$	$A_{384-473}$		
$P_{997-1098}$	$A_{426-543}$		
$P_{321-387}$	$A_{543-576}$		
$P_{581-601}$			

Cette approche a l'avantage de fournir rapidement et simplement un nombre restreint de données à partir des spectres entiers recueillis. Parmi les travaux utilisant cette approche, nous pouvons mentionner les suivants :
Karthikeyan et al. [Karthikeyan *et al.*, 1999], dans une étude pour distinguer les états cancéreux dans le plasma du sang, ont remarqué des différences d'intensité spectrale correspondant aux émissions de fluorescence des flavines et porphyrines. Ils ont donc réalisé l'extraction d'une caractéristique liée à ces observations, en l'occurance le rapport entre les pics d'intensité (I_λ) spécifiques aux émissions des flavines et porphyrines : I_{530} / I_{630}.
Brancaleon et al. [Brancaleon *et al.*, 2001], dans leurs travaux pour distinguer les états cancéreux de la peau, ont exploité des différences d'intensité et de forme spectrale des émissions de fluorescence du tryptophane et du collagène : aires sous la courbe dans les bandes spectrales 310-450 nm (liée au tryptophane) et 380-600 nm (liée au collagène), rapport des pics d'intensité spécifiques aux émissions des tryptophanes et collagène : I_{350} / I_{295}.

Dans des travaux consacrés à la RD pour discriminer des états cancéreux de tissus biologiques, Marín et al. [Marín *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 575 nm) ; l'intensité et la longueur d'onde du pic situé entre 490 et 525 nm ; l'intensité et la longueur d'onde du pic situé entre 575 et 630 nm. Suite à l'extraction de ces caractéristiques, ils ont effectué une réduction de leur nombre en utilisant l'ACP. Wallace et al. [Wallace *et al.*, 2000b] en utilisant la RD dans le diagnostic du mélanome, réalisent aussi l'extraction de plusieurs caractéristiques visant à quantifier la forme des spectres recueillis. Ils ont notamment extrait des pentes calculées dans différentes bandes spectrales, des aires sous la courbe dans différentes bandes spectrales, la moyenne d'une bande spectrale et la variabilité du spectre complet. Le tableau 3.1 reprend la liste de caractéristiques extraites par [Wallace *et al.*, 2000b]. Dans une étude similaire sur le mélanome précoce, Murphy et al. [Murphy *et al.*, 2005] ont extrait un ensemble de 29 caractéristiques.

Au sein de notre équipe de recherche, dans le cadre du travail de thèse de [Péry, 2007] ayant permis de discriminer des états inflammatoires, cancéreux et sains de vessie de rats par spectroscopie bimodale avec simple excitation AF, les caractéristiques sélectionnées et employées étaient notamment :

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

Parmi les développements récents, Gupta et al. [Gupta *et al.*, 2007] ont, par exemple, conçu et validé une nouvelle méthode d'extraction de caractéristiques significatives basée sur un prétraitement initial des données par transformée en ondelettes (concaténation des coefficients d'approximation et de détail de niveau 4 d'ondelettes de Daubechies). Ensuite, ils mettent en œuvre un algorithme de classification de type Support Vector Machine (SVM) par une élimination récursive des caractéristiques. Utilisant un noyau linéaire, le classifieur SVM est entrainé avec toutes les caractéristiques extraites, pour évaluer leur importance relative selon un critère de rang et ne préserver que les caractéristiques de rangs les plus élevés. Le processus est répété (en utilisant seulement les caractéristiques restantes) jusqu'à ce que toutes les caractéristiques soient classées par ordre d'importance. Finalement plusieurs sous-ensembles sont créés avec différents nombres de caractéristiques les mieux classées. Le sous-ensemble de caractéristiques optimal est obtenu en évaluant la performance du classifieur avec tous les sous-ensembles créés.
Majumdar et al. [Majumder *et al.*, 2005] en 2005 ont également employé cette approche SVM avec élimination récursive de caractéristiques en combinaison avec l'ADL de Fisher.

3.1.3 Etat de l'art sur la classification de données en spectroscopie

La plupart des travaux visant à distinguer des états sains, précancéreux et/ou cancéreux de tissus biologiques par spectroscopie optique *in vivo* utilisent des méthodes (algorithmes) de classification supervisées, c'est-à-dire, entrainés à partir d'éléments (individus) dont on connaît une classification de référence au moyen d'un expert ou "gold standard" (i.e. histologie).

Les premières méthodes efficaces de classification utilisées en spectroscopie optique tissulaire, sont les méthodes de classification statistiques multivariés.

Chang et al. [Chang *et al.*, 2005], après réduction de la dimension du jeu de données par ACP sur spectres bimodaux, réalisent une classification binaire en utilisant la distance de Mahalanobis. Ils mentionnent un problème potentiel avec leur approche, dû à la possible surestimation de la sensibilité et de la spécificité (surentrainement). Pour éviter ce problème, ils adaptent une méthode de validation croisée de type leave-one-out (LOO) qui fournit une évaluation moins biaisée des performances de l'algorithme.

Diagaradjane et al. [Diagaradjane *et al.*, 2005] après extraction de caractéristiques à partir de Matrices d'Excitation-Emission (EEMs) employent l'Analyse Discriminante Linéaire (ADL) pour distinguer les états précancéreux sur peau de souris. Ils employent un test-F partiel et une méthode par étapes pour incorporer séquentiellement l'ensemble de caractéristiques extraites à une fonction discriminante linéaire de Fisher.

Kamath et al. [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-plus proches voisins (k-NN) afin de discriminer les états précancéreux et cancéreux de tissus oraux.

Marín et al. [Marín *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 Analyse Discriminante Linéaire de Fisher et par la méthode k-NN avec un seul voisin (k=1) avec une mesure de distance Euclidienne.

Lin et al. [Lin *et al.*, 2004] ont discriminé des tissus nasopharyngés cancéreux en utilisant la spectroscopie de fluorescence et des méthodes de classification de type SVM linéaire et non linéaire. Les caractéristiques utilisées étaient les spectres entiers (lissés et filtrés avec une résolution de 1 nm) d'émission de fluorescence. Un noyau RBF a été utilisé pour l'algorithme SVM non linéaire. Le critère d'optimisation utilisé minimise le nombre d'erreurs de classification et maximise la précision de la classification dans l'ensemble d'entraînement. La performance de la méthode a été évaluée en termes de Se et Sp, avec des valeurs supérieures à 94%. Ils ont évalué la combinaison de l'ACP (réduction de données) et des SVMs. Ils ont noté une amélioration dans le temps de traitement mais pas d'amélioration dans la performance de la méthode.

Wallace et al. [Wallace *et al.*, 2000a] ont réalisé une comparaison entre deux algorithmes de classification : Réseaux de Neurones RNAs et Analyse Discriminante Multivariée. Le RNA utilisé était du type backpropagation avec 7 neurones en entrée, 10 neurones dans la couche cachée et 2 neurones de sortie. Globalement, l'algorithme RNA a donné de meilleurs résultats, surtout quand la base de données utilisée est grande. Ils ont obtenu une amélioration de 8,1% en Se et 17,9% en Sp.

Wang et al. [Wang *et al.*, 2003] ont réalisé un algorithme de classification combinant RNA de type backpropagation et PLS (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.

3.2 Prétraitement des spectres d'autofluorescence et de diffusion

Avant de mettre en œuvre les étapes d'extraction de caractéristiques et de classification pour notre étude, nous avons développé des algorithmes spécifiques (sous Matlab) de prétraitement des données spectroscopiques recueillies (fluorescence et diffusion élastique). Comme nous avons recueilli près de 200000 spectres, ces algorithmes doivent avoir la capacité de prétraiter tous les spectres de façon automatique.

La méthode de traitement proposée lors de ce travail de thèse est basée surtout sur le travail de [Marín *et al.*, 2006] concernant le calibrage des instruments en spectroscopie optique utilisés dans des protocoles cliniques. Comme mentionné dans la section 2.1.5 du chapitre 2, leur méthode de prétraitement vise à rendre comparables les données acquises en spectroscopie de fluorescence avec des systèmes d'instrumentation et des protocoles différents.

La figure 3.4 montre l'organigramme des fonctions de prétraitement implémenté pour nos spectres de fluorescence, en 2 parties.
Une première étape est consacrée aux prétraitements réalisés avant le protocole de mesures, au cours des acquisitions spectroscopiques ou à la fin d'une journée de mesures (figure 3.4a). La

seconde étape de prétraitements est effectuée de façon itérative pour tous les spectres de fluorescence (figure 3.4b). Chacune de ces fonctions est décrite de façon détaillée dans les paragraphes ci-après.

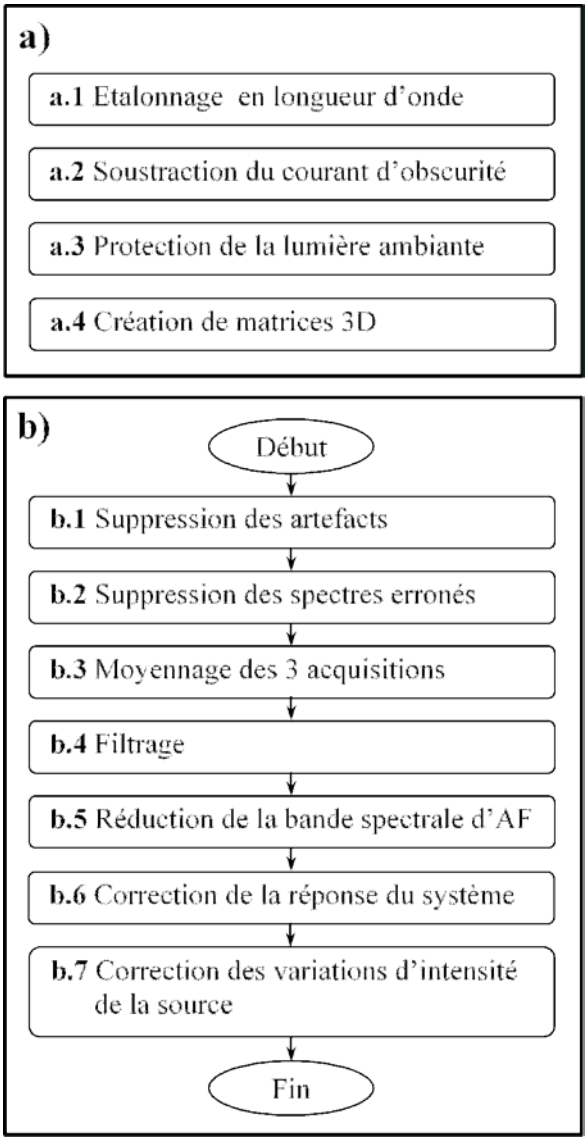

FIGURE 3.4 – Organigramme des fonctions de prétraitement implémenté pour nos spectres de fluorescence.

a.1 Nous avons réalisé l'étalonnage en longueur d'onde (section 2.1.5, chapitre 2) en vérifiant la position spectrale des pics d'amplitude caractéristiques d'une référence, en l'occurrence une lampe de calibrage au mercure [Zângaro *et al.*, 1996][Utzinger *et al.*, 2001a][Marín *et al.*, 2006]. Ce calibrage a été réalisé une fois pour toute au début du protocole de mesures.

a.2 La soustraction du courant d'obscurité (section 2.1.5, chapitre 2) a été réalisée de façon automatique pour chaque acquisition spectroscopique à chaque excitation. Le logiciel SynerJY (HORIBA Jobin Yvon, Courcouronnes, France) qui contrôle le spectromètre iHR320 permet de configurer et de soustraire la mesure du courant d'obscurité de façon automatique (fente d'entrée fermée), de sorte que :

$$S_{SCN} = M_{STB} - M_{FF} \tag{3.1}$$

Où :
S_{SCN} = Spectre avec la courant d'obscurité soustrait
M_{STB} = mesure réalisée sur le tissu biologique
M_{FF} = mesure réalisée avec la fente d'entrée fermée

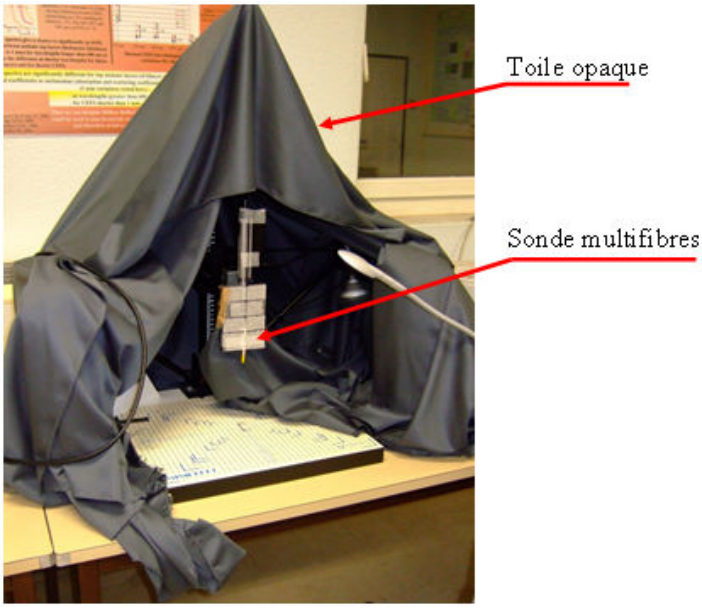

FIGURE 3.5 – Cache mis en place pour couvrir et isoler le site de mesure de toute source ou perturbation lumineuse ambiante.

a.3 Nous nous sommes protégés de la lumière ambiante en réalisant nos mesures *in vivo* en totale obscurité, dans la salle d'expérimentation isolée de toute source lumineuse extérieure (portes et fenêtres fermées) et lampes éteintes. Pour éviter les perturbations lumineuses provenant de LEDs des différents instruments utilisés (spectromètre, ordinateur, etc.), nous avons recouvert notre espace de manipulation à l'aide d'un cache à base de toiles opaques (figure 3.5).

a.4 Nous avons organisé les données recueillies en matrices 3D pour faciliter leur manipulation automatique. Pour rappel, l'ensemble des mesures comprend : 7 excitations en AF et 3 bandes en RD.

Pour chaque pic d'excitation d'autofluorescence ou pour chaque bande de diffusion élastique, trois mesures successives sont automatiquement accumulées (répétées) pour chacune des six distances interfibres. Un exemple de structure de matrice 2D est donné en figure 3.6.

Au total, 4 matrices 2D regroupent l'ensemble de nos mesures en spectroscopie bimodale résolue spatialement pour un site tissulaire. Nous organisons ces informations dans une seule matrice 3D (figure 3.7), où chaque matrice 2D correspondant à chacune des 6 distances interfibres regroupe les spectres d'émission obtenues pour les dix pics/bandes d'excitation, avec les trois accumulations.

$$
\begin{array}{c|cccccccc}
 & \overbrace{\mathbf{S_1}\ \mathbf{S_2}\ \mathbf{S_3}}^{\text{Mesure 1}} & \overbrace{\mathbf{S_4}\ \mathbf{S_5}\ \mathbf{S_6}}^{\text{Mesure 2}} & \overbrace{\text{--}\ \text{--}\ \mathbf{S_k}}^{\text{Mesure j}} \\
\hline
\boldsymbol{\lambda_1} & X_{11} & X_{12} & X_{13} & X_{14} & X_{15} & X_{16} & \text{--} & \text{--} & X_{1k} \\
\boldsymbol{\lambda_2} & X_{21} & X_{22} & X_{23} & X_{24} & X_{25} & X_{26} & \text{--} & \text{--} & X_{2k} \\
\text{--} & \text{--} & \text{--} & \text{--} & \text{--} & \text{--} & \text{--} & \text{--} & & \text{--} \\
\text{--} & \text{--} & \text{--} & & \text{--} & \text{--} & \text{--} & & \text{--} & \text{--} \\
\boldsymbol{\lambda_n} & X_{n1} & X_{n2} & X_{n3} & X_{n4} & X_{n5} & X_{n6} & \text{--} & \text{--} & X_{nk}
\end{array}
$$

FIGURE 3.6 – Matrice 2D des mesures spectroscopiques (7 excitations en AF et 3 bandes en RD). k = (nombre d'excitations) x (3 accumulations) x (6 distances) ; n = nombre de points par spectre = 2048 résolution du CCD (nombre de pixels).

$$
\begin{array}{c|cccccccc}
 & \overbrace{\mathbf{S_1}\ \mathbf{S_2}\ \mathbf{S_3}}^{\text{AF-360}} & \overbrace{\mathbf{S_4}\ \mathbf{S_5}\ \mathbf{S_6}}^{\text{AF-368}} & \overbrace{\text{--}\ \text{--}\ \mathbf{S_k}}^{\text{DE3}} \\
\hline
\boldsymbol{\lambda_1} & X_{11} & X_{12} & X_{13} & X_{14} & X_{15} & X_{16} & \text{--} & \text{--} & X_{1k} \\
\boldsymbol{\lambda_2} & X_{21} & X_{22} & X_{23} & X_{24} & X_{25} & X_{26} & \text{--} & \text{--} & X_{2k} \\
\text{--} & \text{--} & \text{--} & \text{--} & \text{--} & \text{--} & \text{--} & \text{--} & & \text{--} \\
\text{--} & \text{--} & \text{--} & & \text{--} & \text{--} & \text{--} & & \text{--} & \text{--} \\
\boldsymbol{\lambda_n} & X_{n1} & X_{n2} & X_{n3} & X_{n4} & X_{n5} & X_{n6} & \text{--} & \text{--} & X_{nk}
\end{array}
$$

D1 D2 -- -- D6

FIGURE 3.7 – Matrice 3D regroupant l'ensemble des mesures bimodales résolue spatialement (6 distances) réalisées sur un site tissulaire (7 excitations en AF, i.e., AF-360 : fluorescence à 360 nm, et en réflectance diffuse).

b.1 La suppression des artefacts. Sur certains spectres, des artefacts (pics de très grande amplitude) sont présents (un exemple est donné en figure 3.8a). Nous avons supprimé ce type de bruit en utilisant un filtrage par une fenêtre glissante (avec un largueur de bande de 4 nm $\approx$ 15 points, déterminée de façon empirique) point par point sur tout le spectre. Les artefacts sont détectés sur la base d'une variation de plus de 400% de l'écart-type entre fenêtres successives. Suite à cette détection, l'artefact est supprimé en le moyennant 30 fois avec le point précédent (figure 3.8b).

b.2 Suppression des spectres erronés. Nous avons constaté que certaines mesures de spectres d'émission de fluorescence pouvaient être erronées (figure 3.9). La détection des spectres erronés est basée sur le calcul de la variation de l'écart-type entre l'énergie totale des spectres. Un seuil de ± 3 % de variation a été fixé en accord avec nos tests de répétabilité sur les acquisitions en fluorescence et en RD (voir section 2.5 du chapitre 2). Les spectres détectés sont supprimés définitivement et ne sont pas pris en compte pour les traitements suivants.

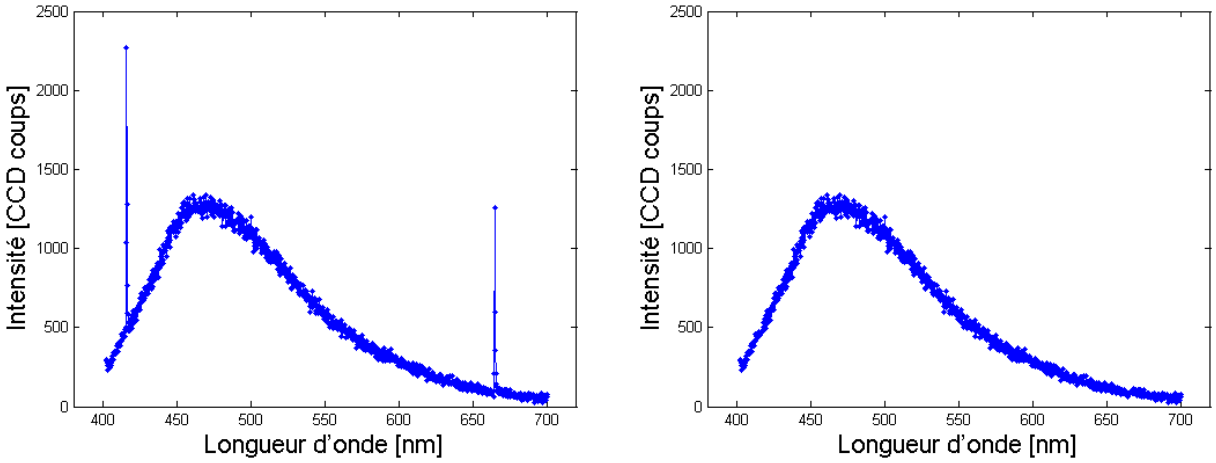

FIGURE 3.8 – Suppression des artefacts. a) artefacts présents dans un spectre d'émission de fluorescence à 360 nm ; b) artefacts supprimés.

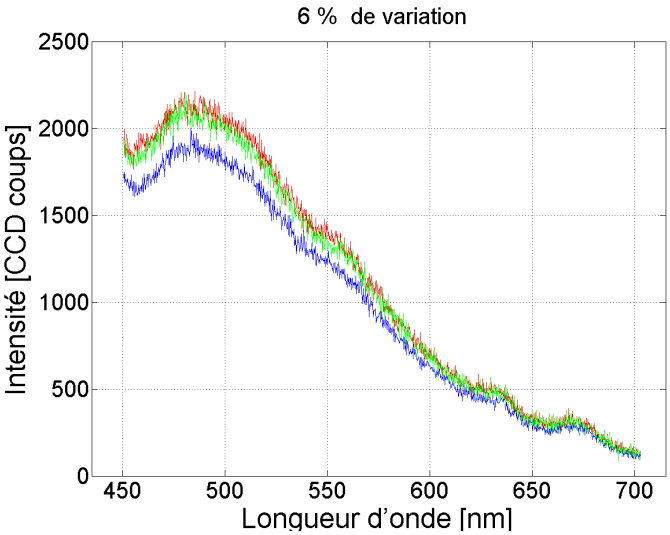

FIGURE 3.9 – Exemple de spectres d'émission de fluorescence avec une mesure erronée (courbe bleue) avec 6 % de variation de l'écart-type.

b.3 Moyennage des acquisitions. Les spectres bruts (sans prétraitement) acquis sont affectés d'un bruit caractérisé par une distribution gaussienne. Suite à la suppression des spectres erronés et afin d'améliorer le rapport signal sur bruit [de Veld *et al.*, 2004][de Veld *et al.*, 2005], les acquisitions accumulées sont moyennées. De cette façon l'amplitude du bruit aléatoire est réduite d'environ 40 %. La figure 3.10 montre la moyenne (courbe noire) des spectres (vert et rouge) après la suppression du spectre erroné (courbe bleue).

b.4 Filtrage du signal. Suite au moyennage, le bruit de haute fréquence restant est supprimé en utilisant un filtre de lissage polynomial Stavizky-Golay. Les caractéristiques du filtre (largeur de fenêtre et degré du polynôme) ont été déterminées pour chaque type de spectre (AF ou RD) sur la base de leur formes spectrales particulières afin de lisser correctement les

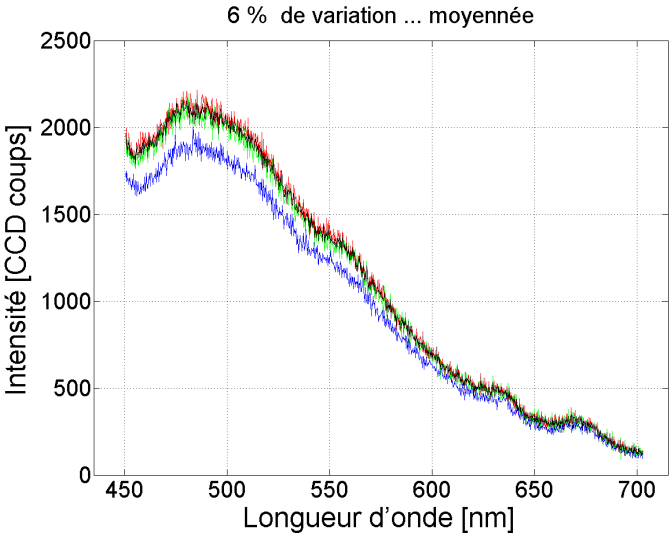

FIGURE 3.10 – Spectres accumulés moyennés (noir).

parties contenant les informations importantes (i.e., pics d'émission des porphyrines de largueur $35-40\ nm$, visibles dans la bande 620-690 nm, figure 3.11). Pour les spectres d'autofluorescence, un filtre de degré 2 avec une fenêtre de largueur 22 nm a été choisi et pour les spectres de RD, un filtre de degré 2 avec une fenêtre de largueur 15 à 30 nm selon la bande prétraitée.

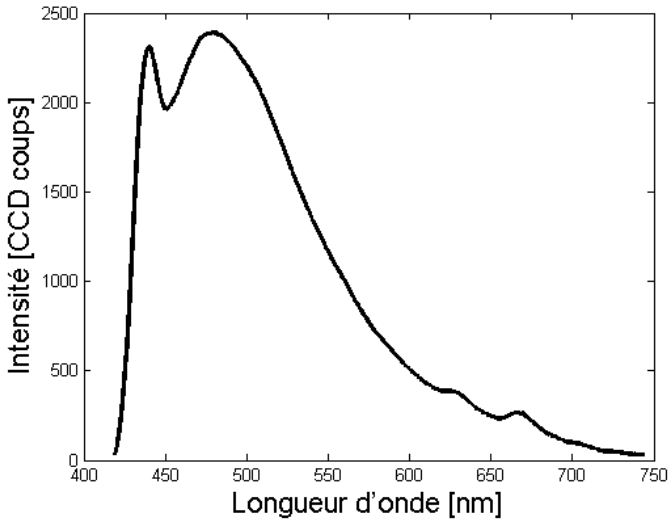

FIGURE 3.11 – Spectre lissé en utilisant le filtre de lissage polynomial Stavizky-Golay.

b.5 Réduction de la bande spectrale d'intérêt. La courbe typique d'émission de fluorescence acquise, peut être subdivisée en trois parties (figure 3.12a) :

a) une bande centrale, contenant la bande d'intérêt ou d'information utile.

b) une bande spectrale basse, contenant l'intensité résiduelle de l'excitation rétrodiffusée.

c) une bande supérieure à 700 nm, sans signal de fluorescence.

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

- 410-700 nm pour les excitations AF-360 et AF-368,
- 460-700 nm pour les excitations AF-390, AF-400 et AF-410,
- 463-700 nm pour les excitations AF-420 et AF-430,
- 390-720 nm pour RD.

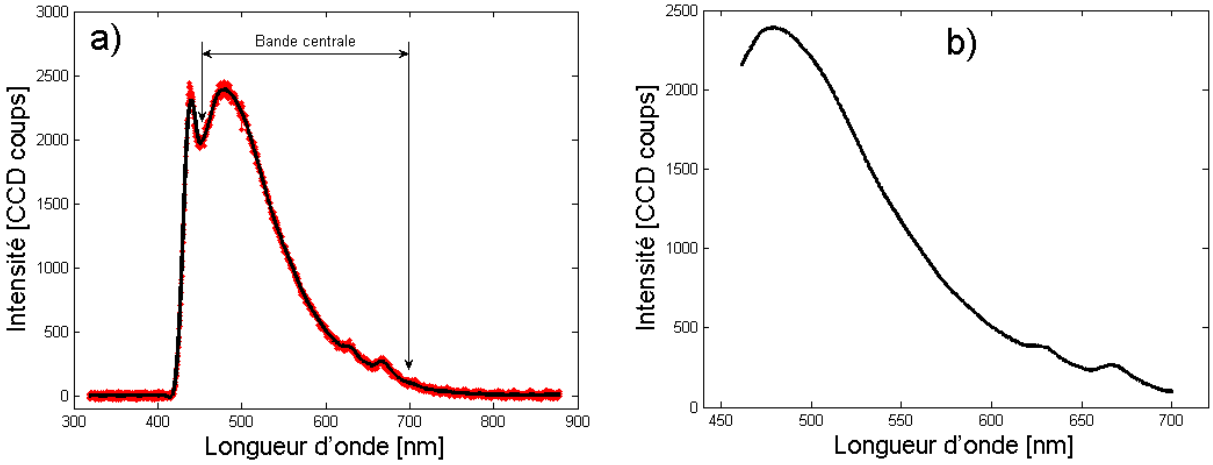

FIGURE 3.12 – Réduction de la bande spectrale d'étude pour un spectre d'émission d'autofluorescence (excitation à 410 nm) moyenné et lissé.

b.6 Correction de la réponse spectrale du système. Les différents éléments du système de réception, c'est-à-dire, la sonde à fibres optiques, les lentilles, les filtres optiques, les réseaux de diffraction, le CCD, etc., ont des réponses spectrales non uniformes qui affectent la forme et l'amplitude des spectres acquis. Par conséquent, une correction de la réponse du système d'acquisition est nécessaire. Cette correction a été appliquée en utilisant une lampe de calibrage (HL 2000-CAL, Ocean Optics). Les coefficients de correction ont été calculés en divisant le spectre acquis de la lampe par le spectre calibré de la lampe dans les mêmes configurations expérimentales que celle du protocole d'étude.

Cette correction et ces résultats sont détaillés dans la section 2.5 du chapitre 2.

b.7 la correction des variations d'intensité. La source d'excitation (lampe à arc court, Xénon 300W) a une puissance de sortie relative qui diminue au cours du temps de fonctionnement. Comme notre protocole de mesures sur animaux s'est déroulé sur plusieurs semaines, une méthode de correction de ces variations a été mise en œuvre. Ainsi, des mesures de puissance (Puissancemètre 841PE, détecteur optique UV 818-UV, Newport Corp.) ont été réalisées pour chaque excitation à l'extrémité de la sonde au début de chaque journée d'expérience. Les corrections ont été effectuées en divisant les spectres bruts acquis par la puissance lumineuse (de l'excitation correspondante) mesurée le même jour.

Cette méthode de correction et les résultats afférents sont détaillés dans la section 2.5 du chapitre 2.

Le **prétraitement appliqué aux spectres de réflectance diffuse** suit la même approche de prétraitement que celle utilisée pour les spectres d'AF jusqu'à l'étape b.5. La réponse spectrale du système et les variations d'intensité de la source sont normalisées en utilisant le spectre mesuré sur un standard de réflectance diffuse (WS-1 Standard de réflexion diffuse, Ocean Optics).

Cette normalisation et les résultats associés sont détaillés dans la section 2.5 du chapitre 2.

A la fin du prétraitement automatique des spectres acquis en fluorescence et en réflectance diffuse, nous formons une matrice 3D (figure 3.13) contenant toutes les mesures pour un site tissulaire.

$$
\begin{array}{c|cccccccc}
 & \mathbf{F_{360}} & \mathbf{F_{368}} & \mathbf{F_{390}} & \mathbf{F_{400}} & \mathbf{F_{410}} & \mathbf{F_{420}} & \mathbf{F_{430}} & \mathbf{RD} \\
\hline
\lambda_1 & X_{11} & X_{12} & X_{13} & X_{14} & X_{15} & X_{16} & X_{17} & X_{18} \\
\lambda_2 & X_{21} & X_{22} & X_{23} & X_{24} & X_{25} & X_{26} & X_{27} & X_{28} \\
-- & -- & -- & -- & -- & -- & -- & -- & -- \\
-- & -- & -- & & -- & -- & -- & -- & -- \\
\lambda_n & X_{n1} & X_{n2} & X_{n3} & X_{n4} & X_{n5} & X_{n6} & X_{n7} & X_{n8}
\end{array}
$$

D1 D2 -- -- D6

FIGURE 3.13 – Organisation des matrices 3D contenant toutes les mesures (7 excitations en AF, i.e., F_{360} : Excitation de fluorescence à 360 nm, 1 en RD, 6 distances) pour un site du tissu biologique.

3.3 Traitement et analyses des données spectroscopiques (deux approches)

Nous avons réalisé et comparé deux approches de classification supervisée appliquée aux données de notre protocole d'expérimentation pré-clinique. Une première méthode a été utilisée avec un nombre limité de caractéristiques extraites et l'algoritme de classification des k-NN pour étudier de façon comparative l'efficacité diagnostique des spectroscopies mono-excitation d'AF, multi-excitation d'AF, RD seule et bimodale (multi-excitation d'AF + RD). Nous avons ensuite mis en œuvre une seconde méthode utilisant un nombre étendu de caractéristiques extraites pour étudier l'efficacité diagnostique de la spectroscopie bimodale résolue spatialement en comparant les performances de trois algorithmes de classification : k-NN, LDA et SVM.

Les détails de ces travaux son présentés dans les sections suivantes.

3.3.1 Extraction/sélection/élimination des variables explicatives pour la classification des données

a) Extraction de caractéristiques spectrales

Sur la figure 3.14 sont montrés les spectres prétraités (avec filtrages, corrections des variations d'intensité, de la réponse du système, etc.) et moyennés acquis à la distance D1 = 271 μm, pour les quatre classes histologiques (S : n=84, HC : n=47, HA : n=64 et D : n=57). La figure 3.14a

correspond aux spectres d'émission de fluorescence acquis pour l'excitation à 410 nm. La figure 3.14b correspond aux spectres acquis pour la réflectance diffuse. Nous observons des différences visibles au niveau des formes et amplitudes entre les courbes spectrales des quatre classes histologiques. Par exemple, pour les spectres d'AF ces différences sont plus particulièrement visibles dans la bande 460-550 nm liée à l'émission des flavines et dans la bande 620-690 nm à l'émission des porphyrines (pics d'absorption ≈ 633 et 672 nm). Pour les spectres de réflectance diffuse, ces différences sont sensibles dans les bandes 390-450 et 500-600 nm liées aux pics d'absorption de l'hémoglobine (420, 545, 575 nm).

Nous avons réalisé le choix de différentes caractéristiques, puis l'extraction de ces caractéristiques (caractéristiques spectrales illustrées en figure 3.15) à partir des spectres d'émission d'AF et de RD correspondants aux quatre classes histologiques de référence définies, sur la base de :

a) Nos observations, en cours d'expérimentations, des variations d'amplitudes et de formes des courbes spectrales (cf. figure 3.14) liées à l'émission de fluorophores spécifiques, l'absorption par certains chromophores, la diffusion et la dispersion de la lumière dans certaines bandes spectrales.
b) Travaux publiés par [Péry, 2007][Kamath and Mahato, 2007][Diagaradjane *et al.*, 2005][Murphy *et al.*, 2005][Marín *et al.*, 2005][Wallace *et al.*, 2000b],
c) Nos observations des spectres normalisés et non-normalisés,
d) Données statistiques calculées sur les spectres entiers (moyenne, médiane, variance, etc.).

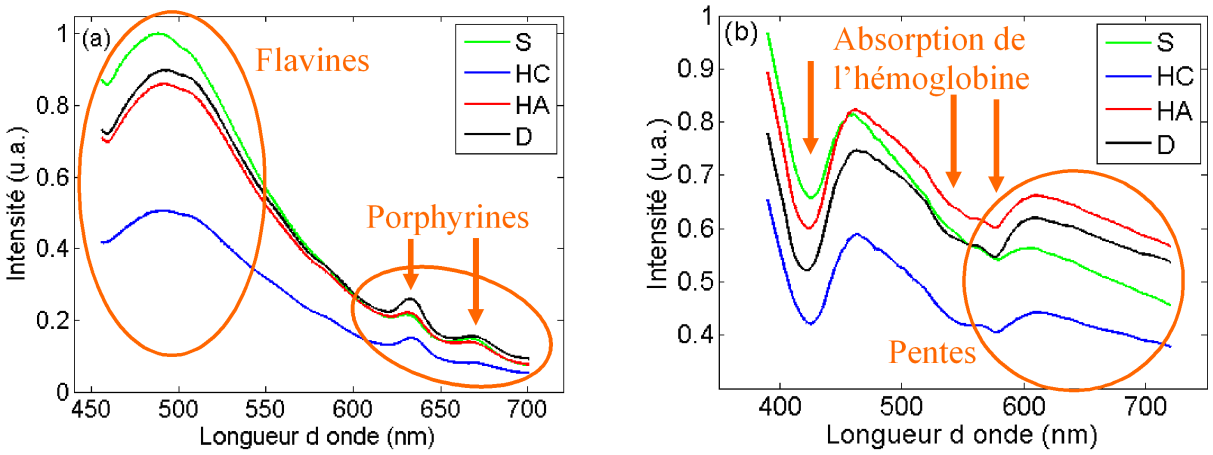

FIGURE 3.14 – Exemple de spectres prétraités moyennés acquis à la distance D1 = 271 μm, pour les quatre classes histologiques (S : n=84, HC : n=47, HA : n=64 et D : n=57). (a) spectres d'AF acquis pour l'excitation à 410 nm. (b) spectres de RD.

Première approche

Pour la première approche, nous avons réalisé l'extraction de 23 caractéristiques regroupées dans le tableau 3.2, à partir des spectres mesurés pour les 7 excitations en AF et 4 pour la RD) :

- Aires sous le spectre entre λi et λj ($A_{\lambda i-\lambda j}$),
- Rapport entre pics à λi et λj ($R_{\lambda i-\lambda j}$) et entre aires ($A_{\lambda i-\lambda j}/A_{\lambda k-\lambda l}$),
- Pente λi et λj ($P_{\lambda i-\lambda j}$).

Seconde approche

Pour la seconde approche, nous avons réalisé l'extraction de 762 caractéristiques (tableau 3.3, 636 pour les 7 excitations en AF et 126 pour la RD) à partir des spectres mesurés :

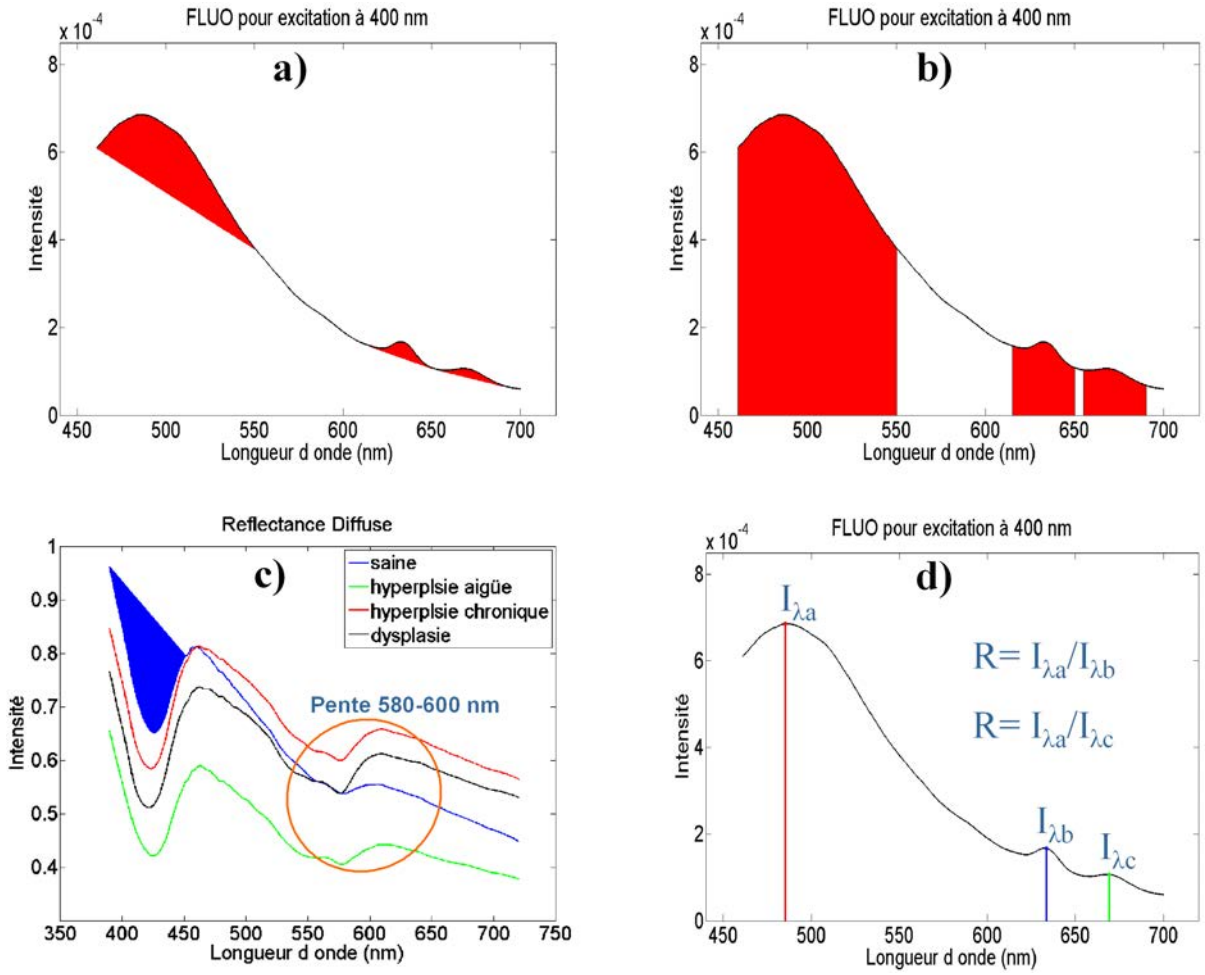

FIGURE 3.15 – Exemples de caractéristiques extraites des spectres AF et RD : a) Aires sous la courbe ; b) Aires sous la courbe avec la contribution de l'intensité spectrale ; c) Aires au dessus de la courbe et pentes dans certaines bandes spectrales et d) Rapport entre pics (intensités) à longueurs d'onde spécifiques.

- Aires sous le spectre entre λi et λj ($A_{\lambda i-\lambda j}$), sous le spectre entre λi et λj avec contribution de l'intensité spectrale ($AT_{\lambda i-\lambda j}$), au dessus du spectre ($AA_{\lambda i-\lambda j}$), et normalisées ($AN_{\lambda i-\lambda j}$),
- Rapport entre pics à λi et λj ($R_{\lambda i-\lambda j}$) et Rapport entre aires ($A_{\lambda i-\lambda j}/A_{\lambda k-\lambda l}$),
- Résidu de l'ajustement (fitting, F) d'une courbe polynomiale de degré 10 sur la courbe spectrale complète,
- Pente entre pics à λi et λj ($P_{\lambda i-\lambda j}$).
- Moyenne (M), Médiane (Me) et l'Ecart Type (ET) de la courbe spectrale complète.

b) Sélection de caractéristiques spectrales discriminantes pour la seconde approche

Le grand nombre de caractéristiques spectrales extraites pour la seconde approche à nécessité une sélection de caractéristiques discriminantes en deux étapes.
Tout d'abord, nous avons réalisé un test de normalité des distributions (test Lilliefors, $p \leq 0.001$) pour chaque caractéristique extraite et nous n'avons retenu que celles présentant effectivement une distribution normale.

Table 3.2 – Caractéristiques spectrales (19 pour l'autofluorescence et 4 pour la réflectance diffuse) utilisées pour le première approche de classification. L'énergie totale correspond à la somme totale des intensités spectrales dans la bande [λi et λj]. Le Rapport entre aires est le rapport entre la somme des intensités spectrales dans la bande [λi et λj] et la somme des intensités spectrales dans la bande [λk et λl]. Le Rapport entre pics est le rapport entre intensités à λi et λj. La pente est la pente de la courbe entre les intensités à λi et λj.

	λ_{exc} **(nm)**	**Energie totale**	**Rapport entre aires**	**Rapport entre pics**
Autofluorescence	360	$A_{410-700}$	$A_{410-459}/A_{459-700}$	
	368	$A_{410-700}$	$A_{410-470}/A_{470-700}$	
	390	$A_{460-700}$	$A_{460-545}/A_{545-700}$	$R_{470/634}$
	400	$A_{461-700}$	$A_{461-550}/A_{550-700}$	$R_{485/633.5}$
	410	$A_{460-700}$	$A_{460-542.5}/A_{542.5-700}$	$R_{492/633}$
	420	$A_{462.5-700}$	$A_{462.5-550}/A_{550-700}$	$R_{505/633}$
	430	$A_{476-700}$	$A_{476-585}/A_{585-700}$	$R_{507/633}$
Réflectance Diffuse		**Energie totale**	**Pente**	**Rapport entre pics**
		$A_{390-720}$	$P_{580-600}$	$R_{423/577}$
			$P_{615-720}$	

Ensuite, à partir des 4 classes histologiques de référence établies, nous avons défini 6 paires histologiques de comparaisons possibles : S vs HC, S vs HA, S vs D, HC vs HA, HC vs D et HA vs D. En utilisant le test-T de Student, nous avons sélectionné les groupes de caractéristiques capables de discriminer (avec $p \leq 0.05$) : 6 paires histologiques sur 6, au moins 5 paires histologiques et au moins 4 paires histologiques, ce pour chacune des trois distances inter-fibres utilisées pour la résolution spatiale (D1, D2, D3 seules et leurs 4 combinaisons possibles). Le tableau 3.4 indique le nombre de caractéristiques spectrales discriminantes retenues au final.

c) Réduction de la dimension des jeux de variables sélectionnées

Afin de réduire la dimension de chacun des groupes de caractéristiques spectrales extraites pour la première approche et extraites puis sélectionnées pour la deuxième approche (tableau 3.4), nous avons employé l'analyse en composantes principales. Pour les deux approches, nous avons sélectionné un nombre de composantes principales (tableaux 3.5 et 3.6) correspondant à 99% de la variance contenue dans le jeu de caractéristiques spectrales initial.

3.3.2 Classification spectroscopique

Dans cette section, nous décrivons les méthodes de classification des données spectroscopiques des stades cancéreux précoces cutanées développées lors de ce travail de thèse. D'abord, nous présentons plusieurs concepts et définitions concernant l'apprentissage automatique et les méthodes de classification supervisées. Ensuite, nous présentons les algorithmes de classification binaire de type k-NN, LDA et SVM mis en œuvre pour nos deux approches de discrimination des six paires établies (chapitre 2, section 2.6.4).

Finalement pour améliorer la robustesse de la méthode de classification, compte-tenu de la dimension limitée de nos échantillons, chaque algorithme développé subit 100 entraînements et

TABLE 3.3 – Caractéristiques extraites des spectres pour chaque excitation en autofluorescence (par exemple AF-360 pour l'excitation à 360 nm) et des spectres en RD, pour le seconde approche. 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

validations au cours desquels 66% de l'échantillon de chaque classe est tiré au hasard comme jeu d'entraînement et 34% comme jeu de validation. La performance globale de classification a été évaluée en calculant la sensibilité (nombre d'échantillons pathologiques bien classés en référence au classement histologique) et la spécificité (nombre d'échantillons sains bien classés en référence à l'histologie) et leur combinaison sous la forme de courbes ROC.

Table 3.4 – Nombre de caractéristiques finalement retenues après les tests statistiques (Lilliefors et T-Student) pour les différentes combinaisons inter-fibres (chaque distance D1, D2, D3 seules et leurs 4 combinaisons possibles) et qui permettent de discriminer 4, 5 ou 6 paires histologiques.

Distance	**D1**	**D2**	**D3**	**D1+D2+D3**	**D1+D2**	**D1+D3**	**D2+D3**
6 paires	6	2	5	13	8	11	7
$\leq$ 5 paires	44	59	83	186	103	127	142
$\leq$ 4 paires	83	98	125	306	181	208	223

Table 3.5 – Nombre de composantes principales (CPs) utilisées pour évaluer l'algorithme k-NN 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				
360, 368 nm	**390, 400, 410, 420, 430 nm**	**Multi-excitation AF**	**DR**	**DR + multi-excitation AF**
PCs = 1,2.	PCs = 1,2, 3.	PCs = 1,2..., 7.	PCs = 1,2, 3, 4.	PCs = 1,2..., 10.

3.3.2.1 Classification supervisée (concepts et intérêts)

Avant de détailler les 3 méthodes de classification supervisée utilisées lors de ce travail de thèse, nous proposons ici de décrire un peu le cadre de l'Apprentissage Automatique. Le schéma de la figure 3.16 représente l'organisation hiérarchique des techniques d'Apprentissage Automatique au sein de laquelle la classification de données participe de l'apprentissage supervisé et de l'apprentissage inductif.

L'apprentissage a pour but d'améliorer la performance du système de façon autonome, c'est-à-dire, sans reprogrammation ou intervention d'un opérateur externe [Lorenzo-Navarro, 2001].

Le but de l'apprentissage inductif est de formuler des hypothèses vraisemblables pour expliquer certains faits connus, et en plus capables de prédire des faits nouveaux. L'objectif de l'induction consiste à trouver un ensemble de règles qui peuvent expliquer les faits. Cet ensemble

Table 3.6 – Nombre de composantes principales (CPs à partir des caractéristiques spectrales retenues qui ont permis de discriminer 4, 5 ou 6 paires des classes histologiques) employées pour évaluer chacun des trois algorithmes de classification (k-NN, LDA et SVM) avec les combinaisons des trois distances inter-fibres (D1, D2, D3 seules et leurs 4 combinaisons possibles).

Distance	**D1**	**D2**	**D3**	**D1+D2+D3**	**D1+D2**	**D1+D3**	**D2+D3**
6 paires	PC=1,2..., 5	PC=1,2	PC=1,2,3,4	PC=1,2..., 9	PC=1,2..., 6	PC=1,2..., 8	PC=1,2..., 5
$\leq$ 5 paires	PC=1,2..., 19	PC=1,2..., 21	PC=1,2..., 30	PC=1,2..., 53	PC=1,2..., 34	PC=1,2..., 42	PC=1,2..., 43
$\leq$ 4 paires	PC=1,2..., 23	PC=1,2..., 33	PC=1,2..., 38	PC=1,2..., 70	PC=1,2..., 47	PC=1,2..., 52	PC=1,2..., 60

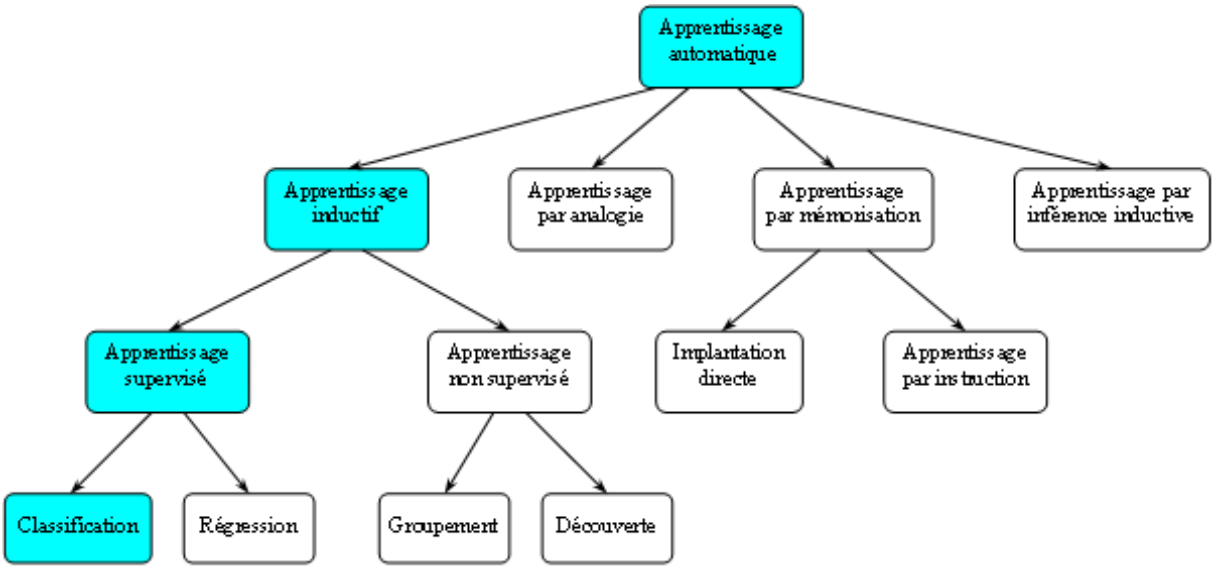

FIGURE 3.16 – Organisation hiérarchique des techniques d'Apprentissage Automatique, [Lorenzo-Navarro, 2001].

de règles peut être en principe infini. Il est donc nécessaire de recourir à des connaissances préalables pour réduire le nombre d'hypothèses possibles et établir des préférences parmi les hypothèses. Soit par rapport à une série de propriétés, soit en limitant les règles [Michaslki and Stepp, 1983] pris de [Lorenzo-Navarro, 2001].

L'apprentissage inductif supervisé (ou simplement apprentissage supervisé) fournit au système un ensemble de faits étiquetés et le système doit obtenir un ensemble de règles pour expliquer ces faits. Dans notre cas, les faits sont des éléments d'échantillons ou des "individus" ou des sites tissulaires, dont on cherche quelles combinaisons de caractéristiques spectroscopiques (règles) expliquent le mieux leur regroupement en référence à leur statut histologique identifié.

Les deux grands axes de l'apprentissage supervisé sont la sélection des caractéristiques d'intérêt (section 3.1.2) et l'obtention de règles de classification (mécanismes de classification en général).

La figure 3.17 montre le modèle proposé par Forsyth [Forsyth, 1989] pris de [Lorenzo-Navarro, 2001] pour l'apprentissage supervisé. La partie supérieure du modèle correspond à la surveillance des éléments par un expert. Normalement, ce processus n'est pas mené simultanément avec le processus d'apprentissage, mais les cas sont présentés à l'expert pour sa classification et les résultats sont ensuite stockés ou bien un échantillonnage aléatoire des éléments classés précédemment par un expert est effectué. La partie inférieure du schéma représente le modèle de l'apprentissage qui prend comme entrée les mêmes éléments donnés à l'expert. Selon les règles de classification, le système donne en sortie un classement, qui est comparée à celui de l'expert. En fonction de la différence entre les deux, le processus d'apprentissage change les règles de classement en utilisant une base existante de règles établies à cet effet.

La Classification consiste à assigner chaque élément à une classe (avec une degré d'appartenance pour chaque classe) en utilisant la fonction obtenue durant le processus d'apprentissage.

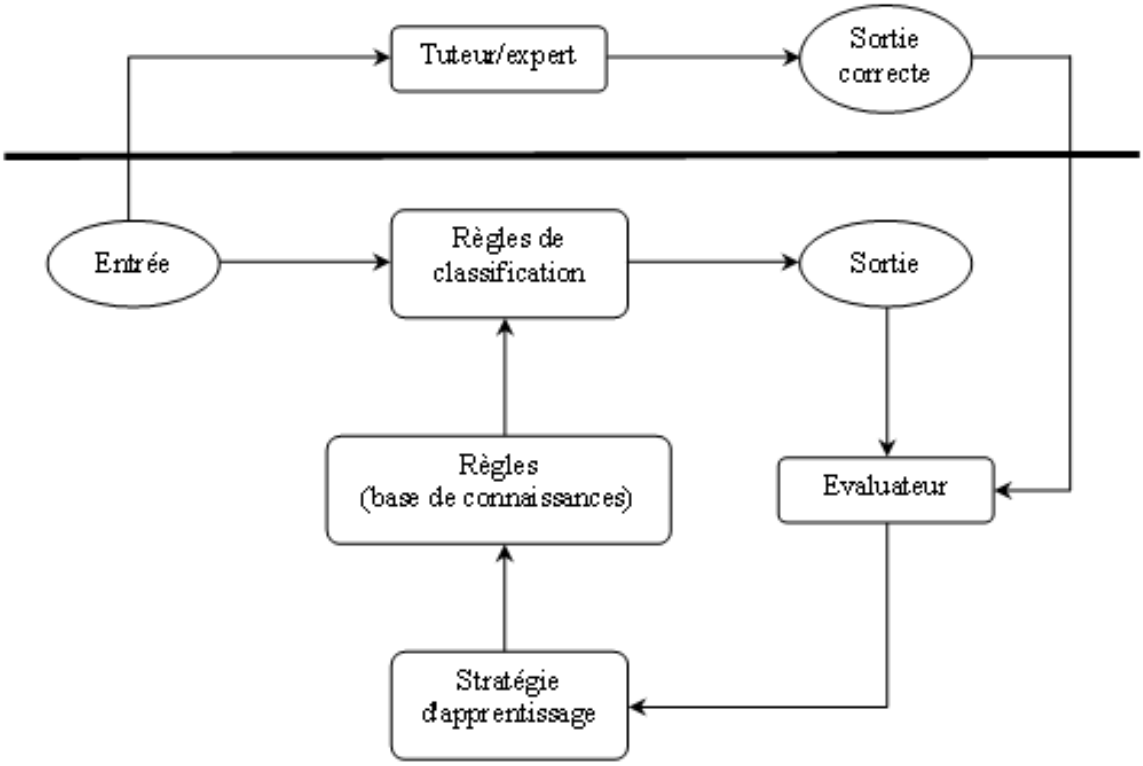

FIGURE 3.17 – Schéma de l'apprentissage supervisé [Forsyth, 1989][Lorenzo-Navarro, 2001].

Principe de classification par la méthode des k plus proches voisins (k-NN) [Duda and Hart, 2001]

Il s'agit d'une méthode simple qui a donné de bons résultats avec des échantillons de populations caractérisées par des distributions normales. Pour ce type de classifieur, on ne construit pas un modèle pour l'ensemble des éléments dans l'espace des caractéristiques, mais on effectue des approches différentes selon certaines zones de l'espace. Ce type de classifieur implique que le classement soit effectué pour chaque nouvel élément en l'attribuant à la classe qui possède une majorité des éléments les plus proches dans le jeu d'entraînement.

Un paramètre important qui influence le résultat de cette méthode est la fonction de distance utilisée pour trouver les plus proches voisins. Classiquement, on utilise la distance euclidienne dans le cas des attributs continus ou la distance de Hamming dans le cas des attributs nominaux. D'autres distances ont été proposées telles que K* par Cleary [Cleary and Trigg, 1995], basée sur la théorie de l'information.

Le choix de la valeur optimale de k est un autre paramètre important de la méthode. On prend couramment, $k = \sqrt{n_g}$ où n_g est la taille moyenne de la population. Il est également possible de tester différentes valeurs de k puis, en fonction de l'erreur de classification obtenue, de faire le choix de la valeur de k qui entraîne la plus petite erreur observée [Peña, 2002].

Le processus d'apprentissage de ce classifieur comprend le concept de stockage des échantillons du jeu de calibrage par couple, échantillon et étiquette : (X_i, Y_j).

La classification d'un nouvel échantillon est effectuée sur la base du calcul des distances entre le nouvel élément et chacun des éléments de l'ensemble stocké ; on attribue alors à ce nouvel

élément la même classe que celle à laquelle appartient l'échantillon le plus proche (plus proche voisin). Si on considère k>1, l'attribution de classe est effectuée en fonction de l'étiquette de la majorité des k plus proches voisins. Un exemple de la différence entre le plus proche voisin et les k plus proches voisins est illustré en figure 3.18. Le premier attribue l'étiquette " positif " à l'élément ★(3.18a), tandis que le second attribue l'étiquette " négatif " puisque parmi les 5 plus proches voisins, quatre d'entre eux ont cette étiquette (3.18b).

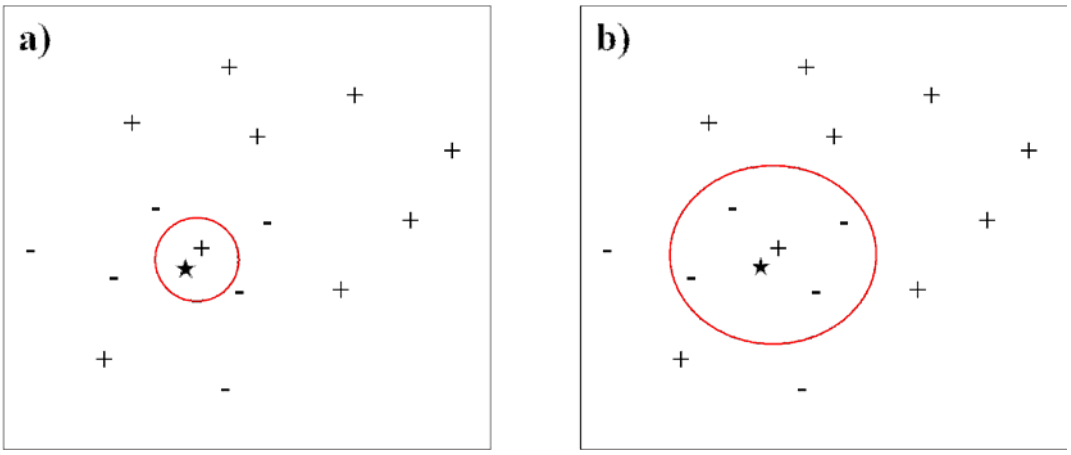

FIGURE 3.18 – Exemples de la classification k-NN. a) k=1 ; b) k=5

Méthode de classification : Analyse Discriminante Linéaire (ADL)

La méthode ADL est la méthode la plus étudiée pour la classification supervisée [Durand, 2007]. Proposée par Fisher en 1936, elle vise deux buts principaux :

i. Décrire, c'est-à-dire trouver parmi les groupes connus les principales différences à l'aide des variables mesurées,

ii. Classer, c'est-à-dire déterminer le groupe d'appartenance d'un nouvel individu uniquement à partir des variables mesurées.

Étant donné deux ou plusieurs groupes d'individus et un ensemble associé de variables, on peut trouver un sous-ensemble de variables et de fonctions associées à ce sous-ensemble qui conduit à la séparation maximale entre les centroïdes des groupes. L'objectif de l'analyse discriminante linéaire est de classer les échantillons en établissant une fonction linéaire qui sépare les classes présentes dans le jeu d'entraînement. L'ADL vise à définir un ensemble d'axes (appelés fonctions linéaires discriminantes) qui représentent le mieux les distances existant entre les différents groupes d'individus par rapport à leurs écarts [Timm, 2002]. Cette méthode permet de maximiser le rapport entre la variance inter-classe et la variance intra-classe des groupes d'individus en garantissant ainsi une séparabilité maximale.

Approche géométrique [Massart *et al.*, 1998]

Une manière commode d'aborder l'analyse discriminante est d'examiner un modèle géométrique simple. En considérant deux groupes (classes) d'individus mesurés sur deux variables **K** et **L** dans un espace à 2 dimensions (x_1, x_2), les réponses des individus, sont représentées dans la figure 3.19a. La figure 3.19b montre les distributions de probabilités normales dont sont issus les individus, représentées par des ellipses ; nous observons que l'individu **A** est classé dans le groupe

K parce que il a une haute probabilité d'appartenir à **K** par rapport à **L**. Dans la figure 3.19c, une nouvelle ellipse est ajoutée pour chaque classe. Ces ellipses représentent le même niveau de probabilité dans leurs classes respectives et se croisent au point **O** à équidistance des deux centroïdes. La droite (**a**) tangente aux deux ellipses et passant sur le point **O**, peut être utilisée (d'un point de vue géométrique) comme la frontière séparant les deux classes. Les individus 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**.

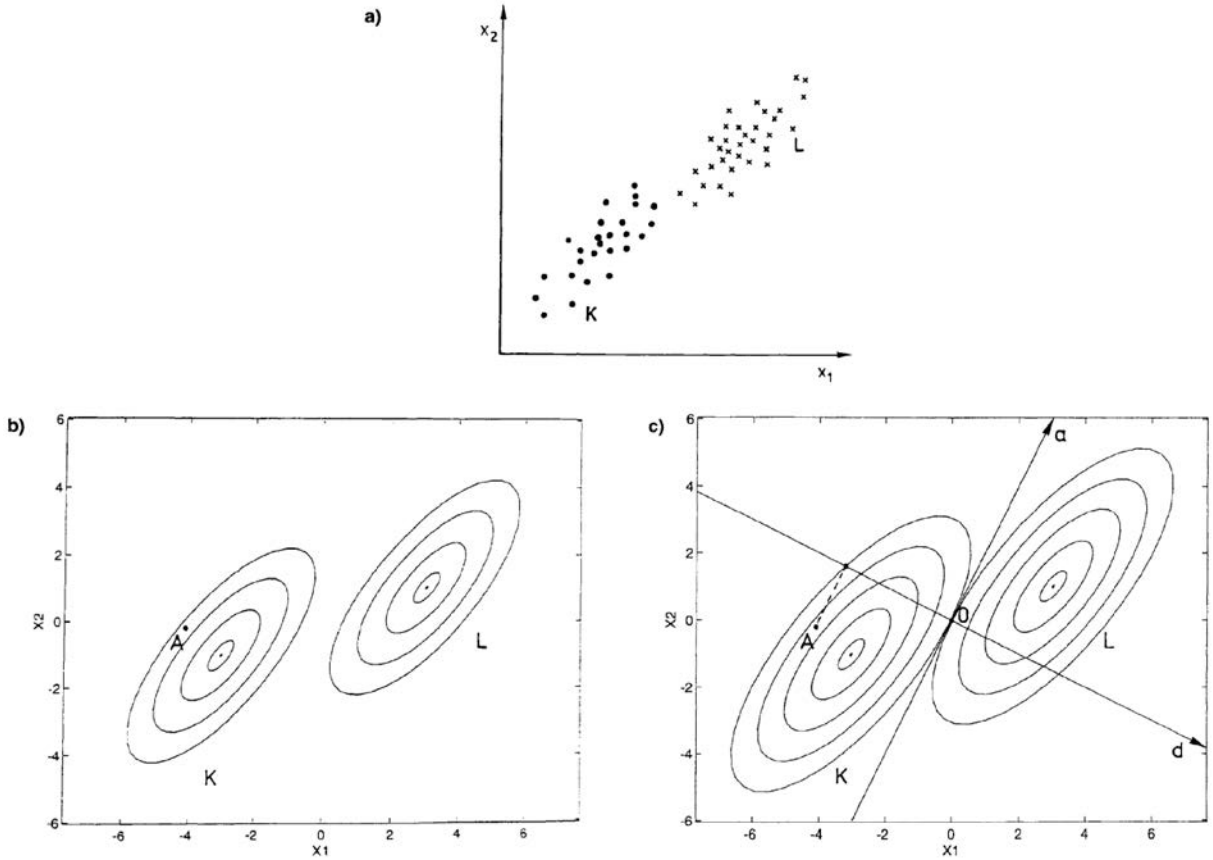

FIGURE 3.19 – Approche géométrique de la méthode ADL. a) Les deux classes K et L à discriminer ; b) limites de confiance autour des centroïdes des classes K et L ; c) représentation des limites de confiance, O est le point d'intersection de ces iso-probabilités, la droite (**a**) est la tangente aux deux ellipses et (**d**) la direction de discrimination optimale, A un individu.

En pratique cette frontière peut être définie algébriquement. Dans ce cas, une droite (**d**) est définie perpendiculaire à la droite (**a**) et chaque échantillon est projeté sur cette droite. La position du point **A** est donnée par ses coordonnées factorielles (scores) sur (**d**). Ce score **D** est défini comme :

$$D = w_0 + w_1 x_1 + w_2 x_2 \tag{3.2}$$

Lorsque les données sont standardisées, $w_0 = 0$. Les coefficients w_1 et w_2 sont décrits ci-après. D = 0 au point **O**, et les individus appartiennent à la classe **L** ou **K** lorsque D > 0 ou D < 0 respectivement.

Approche mathématique [Massart *et al.*, 1998]

Dans la méthode de l'analyse discriminante linéaire, on cherche une fonction linéaire des variables, D, qui maximise le rapport entre les variances des deux classes. Le pouvoir discriminant de la fonction linéaire des variables est acceptable lorsque les centroïdes des deux groupes d'individus sont denses. A partir de l'équation 3.2, on peut écrire :

$$D = \mathbf{w}^T \mathbf{x} + w_0 \tag{3.3}$$

Les poids w sont adaptés aux caractéristiques des données pour permettre la discrimination. Pour une discrimination de deux classes, les poids sont déterminés à partir des équations 3.4 et 3.5 suivantes :

$$w^T = (\bar{x}_L - \bar{x}_K)^T S^{-1} \tag{3.4}$$

$$w_0 = -\frac{1}{2}(\bar{x}_L - \bar{x}_K)^T S^{-1} (\bar{x}_L - \bar{x}_K) \tag{3.5}$$

Où $\bar{x}_L$ et $\bar{x}_K$ sont les vecteurs moyens des individus qui décrivent la localisation des centroïdes dans l'espace de dimension donné et S est la matrice de variance-covariance combinée du jeu d'entraînement des deux classes.

L'utilisation d'une matrice de variance-covariance combinée implique que les matrices de variance-covariance des deux populations soient les mêmes. Par conséquent, les ellipsoïdes définis à partir des distributions de données devraient avoir un volume égal (variance) et une même direction dans l'espace (covariance), comme illustré en figure 3.20.

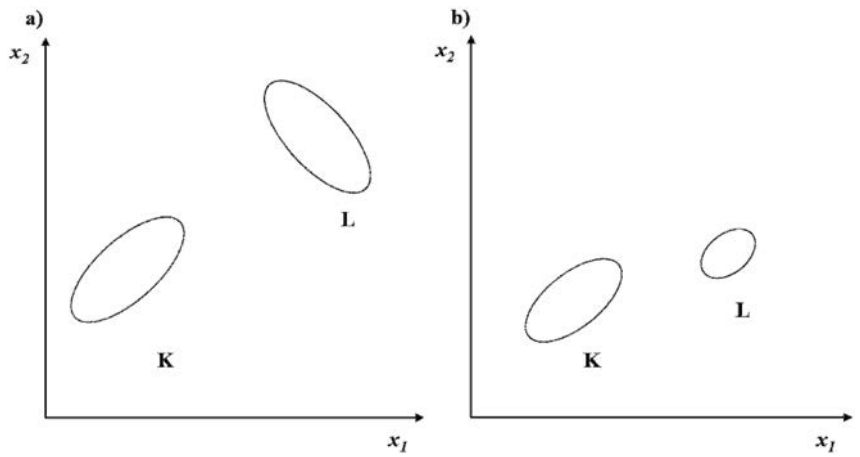

FIGURE 3.20 – Matrices de variance-covariance. a) Deux classes de même variance, b) deux classes de même covariance [Durand, 2007].

Méthode de classification : Support Vector Machine (SVM)

La méthode de Support Vector Machine a été proposée par Vapnik en 1995 [Vapnik, 1995]. Cette nouvelle technique de classification a suscité un intérêt majeur dans les dernières années. La théorie des SVM est basée sur l'idée de la minimisation du risque structurel (SRM) et a été introduite comme un outil puissant pour résoudre des problèmes de classification et garantir une

bonne capacité de généralisation. En effet, les sous-ensembles de fonctions calculées dans le processus d'optimisation minimisent le risque réel du problème, de façon qu'en entraînant un certain nombre de machines pour un objectif donné, il minimise le risque empirique et la confiance de la dimension VC [Vapnik, 1995]. Le principe de la méthode SVM consiste à appliquer une transformation aux données (linéaire ou non linéaire) dans un espace de plus grande dimension, puis appliquer une discrimination linéaire pour séparer les données. L'objectif des SVM est d'obtenir un hyperplan de séparation optimal qui maximise la marge entre les deux classes dans un espace de données multidimensionnelles.

Dans de nombreuses applications, la méthode SVM a démontré de bonnes performances comparé aux machines traditionnelles d'apprentissage (telles que les réseaux de neurones). L'entraînement SVM trouve toujours une solution globale à la différence des réseaux de neurones, où de nombreux minima locaux existent habituellement [Burges, 1998]. La méthode SVM a été conçue pour être particulièrement plus efficace dans l'élaboration d'un classifieur fiable à partir d'un ensemble d'entraînement avec un échantillon de petite taille [Lin *et al.*, 2004].

Principe de classification pour des données linéairement séparables

On considére un problème de classification binaire (avec deux classes) dénoté par $Y = \{-1, 1\}$ et un ensemble fini de vecteurs dans un espace de dimension d, soit :

$$\{(x_1, y_1), \ldots, (x_n, y_n)\}, \quad x_i \in \Re^d, \quad y_i \in \{-1, 1\}, \quad i = 1, \ldots, n \tag{3.6}$$

Un ensemble de vecteurs est séparable s'il existe un hyperplan séparateur en d qui sépare l'espace des vecteurs en deux régions différents : les vecteurs $X = \{x1, \ldots, xn, \}$ avec des valeurs en sortie $y_i = 1$, et ceux avec des valeurs en sortie $y_i = -1$.

A partir de la définition précédente, nous avons la garantie de l'existence d'un hyperplan qui sépare les données (figure 3.21a) si :

$$\pi : x \cdot \omega + b = 0 \tag{3.7}$$

où, $x \cdot \omega$ est le produit scalaire des vecteurs ω et x, avec ω la normale au séparateur linéaire et b représente une translation (décalage) des valeurs du séparateur linéaire.

Donc la fonction séparatrice linéaire f est définie par :

$$f(x) = x \cdot \omega + b \tag{3.8}$$

Les séparateurs linéaires (figure 3.21b) peuvent être définis par les équations :

$$\pi_1 : x \cdot \omega + b \geq +1 \quad pour\, y_i = +1 \tag{3.9}$$

$$\pi_2 : x \cdot \omega + b \leq -1 \quad pour\, y_i = -1 \tag{3.10}$$

Plusieurs hyperplans sont possibles pour séparer les deux classes ; on cherche parmi les différentes possibilités, ceux qui optimisent la séparation des deux classes, permettant une discrimination plus claire de chaque région à partir de leurs étiquettes. Ainsi, le problème consiste à trouver la paire d'hyperplans (π_1 et π_2), i.e. les paramètres ω et b, qui maximisent la marge en minimisant la norme de ω ($\| \omega \|$). Donc, on doit minimiser une fonction de coût (en respectant la contrainte des équations 3.9 et 3.10) définie par :

$$\min_{\omega \in \Re^d} \frac{1}{2} \| \omega \|^2 \tag{3.11}$$

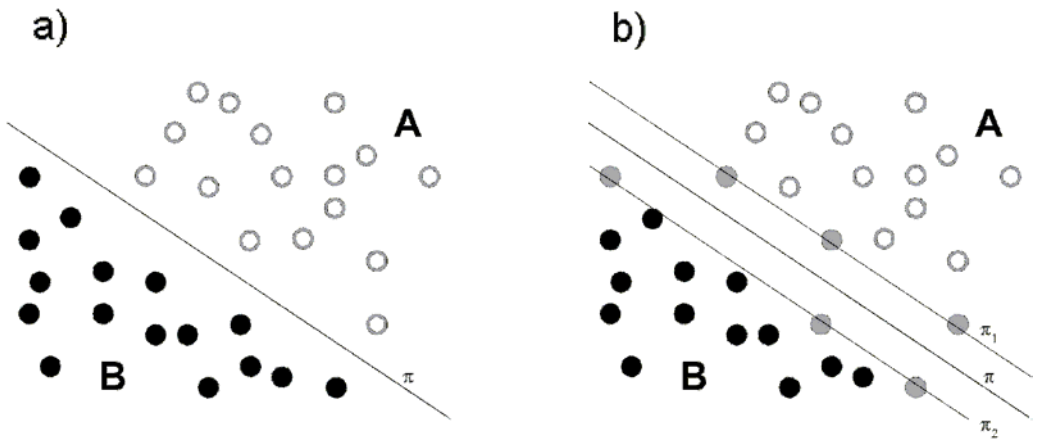

FIGURE 3.21 – a) Ensemble de points séparables et hyperplan dans l'espace dimensionnel $\Re^2$, les points vides représentent les données avec l'étiquette y = 1 et les points noirs les données avec l'étiquette y = -1 ; b) hyperplans parallèles π, π_1 et π_2 et les vecteurs de support possibles sont indiques en gris. La marge est la distance entre les hyperplans π et π_1 (ou π_2).

Pour la résolution du problème d'optimisation de 3.9, 3.10 et 3.11, la technique des multiplicateurs de Lagrange est utilisée. Cette propriété est cruciale et permet de généraliser le problème dans le cas des machines d'apprentissage non linéaires. Une fonction de Lagrange est donnée par l'équation :

$$L_p(\omega, b, \alpha_i) = \frac{1}{2} \| \omega \|^2 - \sum_{i=1}^{n} \alpha_i (y_i (x_i \cdot \omega + b) - 1) \tag{3.12}$$

Le problème à résoudre est la minimisation de la fonction $L_p(\omega, b, \alpha_i)$ en fonction de ω et x, tout en ayant des dérivées partielles nulles de L_p par rapport aux multiplicateurs de Lagrange α_i (forme primale du problème). Le problème initial reste un problème de programmation quadratique où la fonction objectif est convexe. Cela signifie qu'on peut résoudre le problème dual associé au problème primal en maximisant la fonction $L_p(\omega, b, \alpha_i)$ par rapport aux variables duales α_i, avec des contraintes imposées pour que les gradients de L_p par rapport à ω et b soient nulles. Pour cela, on résout la forme duale du Lagrangien définie par :

$$L_D = \sum_{i=1}^{n} \alpha_i - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{n} \alpha_i \alpha_j y_i y_j x_i x_j \tag{3.13}$$

L_D est maximisée pour les α_i tels que

$$\sum_{i=1}^{n} \alpha_i y_i = 0, \quad \alpha_i \geq 0$$

,

La forme duale permet d'exprimer le critère d'optimisation comme un produit scalaire de vecteurs descriptifs des données. Pour résoudre les problèmes d'optimisation sous contraintes d'inégalités, il est nécessaire de tenir compte des corrections de Karush-Kuhn-Tucker, définies par les équations :

$$\frac{\partial L_p}{\partial \omega} = \omega - \sum_{i=1}^{n} \alpha_i y_i x_i = 0 \tag{3.14}$$

$$\frac{\partial L_p}{\partial b} = -\sum_{i=1}^{n} \alpha_i y_i = 0 \tag{3.15}$$

$$y_i(x_i \cdot \omega + b) - 1 \geq 0 \tag{3.16}$$

$$\alpha_i \geq 0 \tag{3.17}$$

$$\alpha_i(y_i(x_i \cdot \omega + b) - 1) = 0 \tag{3.18}$$

Les échantillons dont les valeurs des multiplicateurs de Lagrange sont strictement positives sont appelés vecteurs support et il s'agit des échantillons les plus pertinents du jeu de données d'entraînement. Pour illustrer l'importance de ces échantillons, si tous les autres échantillons sont éliminés du lot de données, la position de l'hyperplan séparateur ne sera pas modifiée.

La classification d'un échantillon est seulement liée à l'optimisation de L_D, la fonction discriminante établie par l'équation 3.8 devient alors :

$$f(x) = \sum_{i \in SV} \alpha_i y_i (x_i \cdot x) + b \tag{3.19}$$

où SV est le jeu de vecteurs supports.

Principe de classification pour des données non linéairement séparables

Dans les problèmes réels, les ensembles de vecteurs ne sont pas toujours linéairement séparables. Par exemple, la figure 3.22 montre le cas de deux points vides dans la région qui correspond aux points noirs qui ne pourront jamais être séparés avec un hyperplan linéaire (données non linéairement séparables).

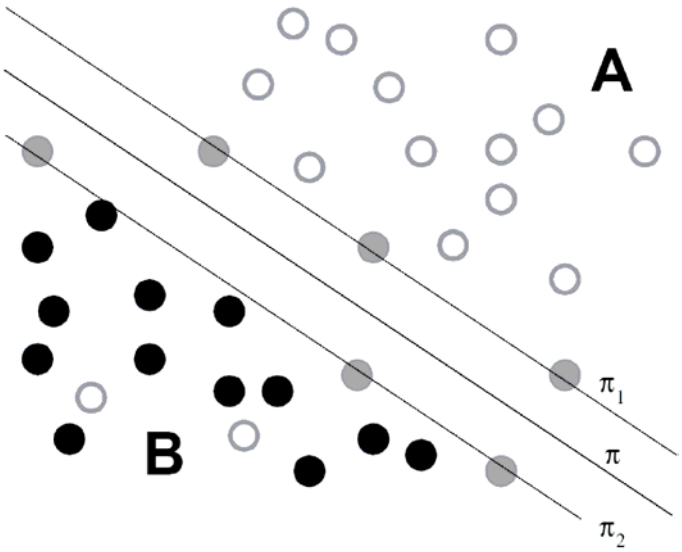

FIGURE 3.22 – Exemple des hyperplans séparateurs pour le cas de données non linéairement séparables.

Pour ces cas, il n'y a pas de solution possible pour le problème d'optimisation ; la fonction du Lagrangien duale (équation 3.13) augmente de façon arbitraire parce que le multiplicateur de

Lagrange correspondant à ce vecteur peut être arbitrairement grande sans affecter les contraintes. L'extension du cas linéairement séparable au cas non linéairement séparable s'effectue en introduisant des variables de relâchement ξ_i pour chaque échantillon i. La contrainte définie par les équations 3.9 et 3.10 devient alors pour tout $i = 1, \ldots, n$:

$$y_i\,(x_i \cdot \omega + b) \;\geq +1 - \xi_i \quad \textit{pour}\, y_i = +1 \tag{3.20}$$

$$y_i\,(x_i \cdot \omega + b) \;\geq +1 - \xi_i \quad \textit{pour}\, y_i = +1 \tag{3.21}$$

Pour qu'une erreur se produise (individu mal classé par l'hyperplan), il est nécessaire que la valeur de ξ_i soit strictement supérieure à 1 et la fonction de coût (3.11) est ainsi modifiée :

$$\frac{1}{2}\| \omega \|^2 + C\sum_{i=1}^{n} \xi_i \tag{3.22}$$

Le terme $C\sum_{i=1}^{n} \xi_i$ correspond à une mesure liée aux nombres d'individus mal classés. Plus la valeur de C est petite, moins échantillons contribuent à l'erreur totale et $\| \omega \|^2$ constitue un facteur de lissage (adoucissement) de la solution cherchée.

Pour résoudre le problème de minimisation de cette fonction coût, on utilise les multiplicateurs de Lagrange, comme dans la section précédente. La fonction primale est :

$$L_p(\omega, b, \alpha_i) = \frac{1}{2}\| \omega \|^2 + C\sum_{i=1}^{n} \xi_i - \sum_{i=1}^{n} \alpha_i \cdot (y_i(x_i \cdot \omega + b) - 1 + \xi_i) - \sum_{i=1}^{n} \mu_i \xi_i \tag{3.23}$$

où $\alpha_i \geq 0$ et $\mu_i \geq 0$. μ_i est introduit afin d'assurer $\xi_i \geq 0$.

A partir de l'équation 3.23, on obtient la fonction duale :

$$L_D(\alpha) = \sum_{i=1}^{n} \alpha_i - \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{n}\sum_{i=1}^{n} \alpha_i \alpha_j y_i y_j x_i x_j \tag{3.24}$$

En maximisant par rapport à α_i et en considérant que $0 \leq \alpha_i \leq C$, on a, $\forall i$:

$$\sum_{i=1}^{n} \alpha_i y_i = 0 \tag{3.25}$$

et la solution est donnée par :

$$\omega = \sum_{i=1}^{N_{SV}} \alpha_i y_i S_i \tag{3.26}$$

où N_{SV} est le nombre de vecteurs support et s_i les vecteurs support de l'ensemble $\{x_1, \ldots, x_n\}$.

Une fois déterminée la valeur optimale de ω, le paramètre b est obtenu à partir des corrections de Karush-Kuhn-Tucker.

Principe de projection des données dans un espace de plus grande dimension

Dans le cas de données non linéairement séparables, l'intérêt de la méthodes SVM réside dans le fait que l'espace des données d'entrée est transformé en un nouvel espace de plus grande

TABLE 3.7 – Fonctions noyaux couramment utilisées en SVM [Burges, 1998].

Non linéarité	**Forme mathématique K(x,y)**
Polynomiale	$(x \cdot y + 1)^d$
RBF gaussienne	$e^{-\|x-y\|^2/2\sigma^2}$
Sigmoïde	$tanh(kx \cdot y - \delta)$

dimension dans lequel des méthodes linéaires peuvent être appliquées. Cette transformation est réalisée par une fonction non linéaire ϕ, les vecteurs $\{x_1, \ldots, x_n\}$ deviennent $\{\phi(x_1), \ldots, \phi(x_n)\}$.

Pour la classification binaire, la fonction discriminante est définie par :

$$f(x) = \phi(x) \cdot \omega + b \tag{3.27}$$

En considérant des fonctions noyau K ("kernel") définies par le produit scalaire entre vecteurs transformés (équation 3.28), le calcul explicite de la fonction ϕ peut être évité.

$$K(x, y) = \phi(x) \cdot \phi(y) \tag{3.28}$$

Alors, la fonction discriminante f établie par l'équation 3.27 devient :

$$f(x) = \sum_{i=1}^{SV} \alpha_i y_i K(x_i, x) + b \tag{3.29}$$

Les fonctions noyaux qui sont couramment mentionnées dans la littérature pour l'algorithme SVM sont regroupées dans le tableau 3.7.

3.3.2.2 Algorithmes développés pour la classification des états précancéreux cutanés

Pour la classification supervisée linéaire des 6 paires histologiques établies, nous avons réalisé 3 algorithmes basés sur les méthodes : k plus proches voisins, Analyse Discriminant Linéaire et Support Vector Machines (figure 3.23).
L'algorithme de classification développé et utilisant la méthode k-NN est montré sur la figure 3.23a. Cet algorithme a été appliqué aux approches étudiées. Nous avons évalué différentes combinaisons entre le nombre de Composantes Principales (CP) et de k-voisins. Le nombre maximum de CP prises en compte, (n), correspond à 99% de la variance du jeu de données original. La valeur maximale de k (15) a été fixée de façon empirique ; suite à plusieurs tests, nous avons observé que pour les valeurs de k supérieures à 10, l'efficacité de l'algorithme avait tendance à diminuer. Pour améliorer la robustesse de la méthode de classification, 100 entraînements et validations sont effectués au cours desquels 66% de l'échantillon de chaque classe est tiré au hasard comme jeu d'entraînement et 34% comme jeu de validation. La performance globale de classification (combinaison entre k et PC) des méthodes a été évaluée en calculant la sensibilité et la spécificité et leur combinaison optimale sous la forme de courbes ROC.

L'algorithme développé en utilisant les méthodes LDA et SVM est représenté sur la figure 3.23b. Cet algorithme a été utilisé pour la deuxième approche étudiée sur le même principe que l'algorithme développé pour la méthode k-NN, c'est-à-dire, en testant différents nombres de CP. Comme précédemment, le couple optimal Se-Sp a été trouvé sur la base du "plan" ROC.

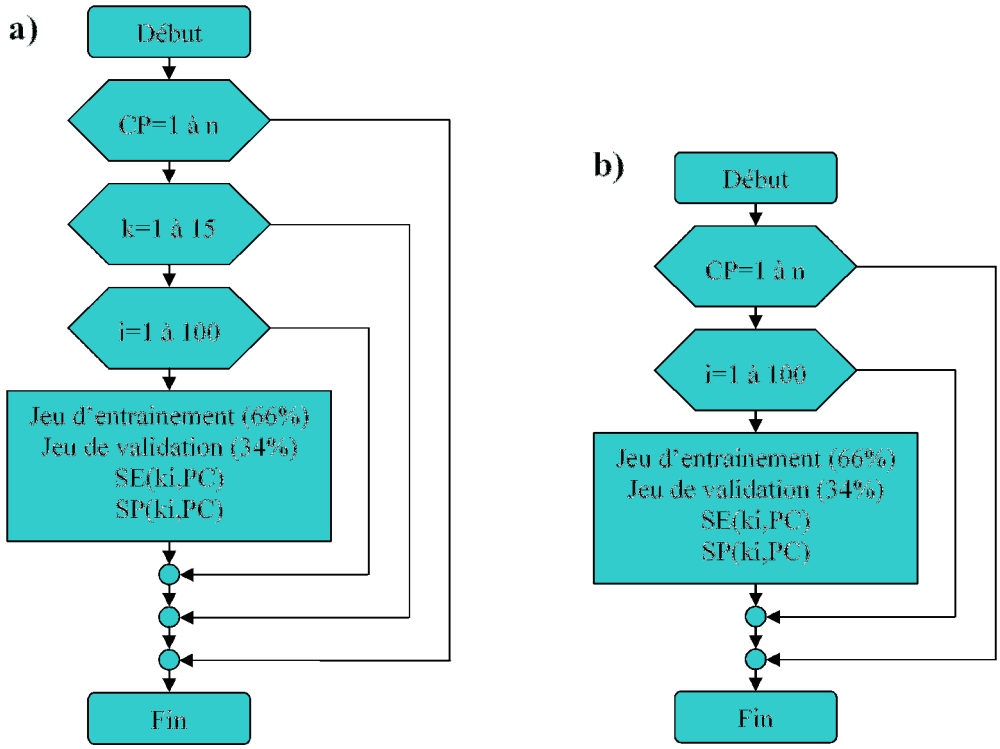

FIGURE 3.23 – Algorithmes de classification développés. a) pour l'algorithme k-NN et b) pour les algorithmes LDA et SVM.

3.4 Résultats et discussion

3.4.1 Mono-et multi-excitation en fluorescence (première approche)

Les résultats pour la mono-et multi-excitation de fluorescence, en termes de moyennes de sensibilité et de spécificité, sont récapitulés sur les figures 3.24 (a) et (b) respectivement.

Nous observons que pour discriminer HC des trois autres classes histologiques (S, HA et D), les plus grandes longueurs d'ondes d'excitation fournissent des valeurs de sensibilité les plus élevées. Les excitations aux longueurs d'onde plus basses (360 et 368 nm) seules conduisent à des valeurs de sensibilités égales ou même meilleures que les longueurs d'onde d'excitation plus élevées : jusqu'à + 12 % pour discriminer la classe S des classes HA et D et pour discriminer la classe S des autres trois classes, et jusqu'à + 8% pour la paire histologique CH vs HA.

En comparant les résultats de sensibilité obtenus en mono-et multi-excitation de fluorescence (figure 3.24a), nous remarquons que la multi-excitation fournit une augmentation de la Sensibilité moyenne de l'ordre de 6%, en discriminant les six paires histologiques. Les résultats obtenus pour la spécificité (figure 3.24b) en multi-excitation ne sont pas meilleurs que ceux obtenus en mono-excitation, sauf pour discriminer HC vs AH avec 2% de mieux. La spécificité est supérieure à 92% en discriminant la peau saine des trois autres types d'hyperplasie (HC, HA et D), mais des valeurs plus faibles sont observées entre les classes hyperplasiques (HC vs HA : 82%, HC vs D : 76% et HA vs D : 41%).

Dans tous les cas, quelque soit la modalité (mono- ou multi excitation de fluorescence), des valeurs nettement plus faibles de spécificité sont observées (figure 3.24b) en discriminant HA de

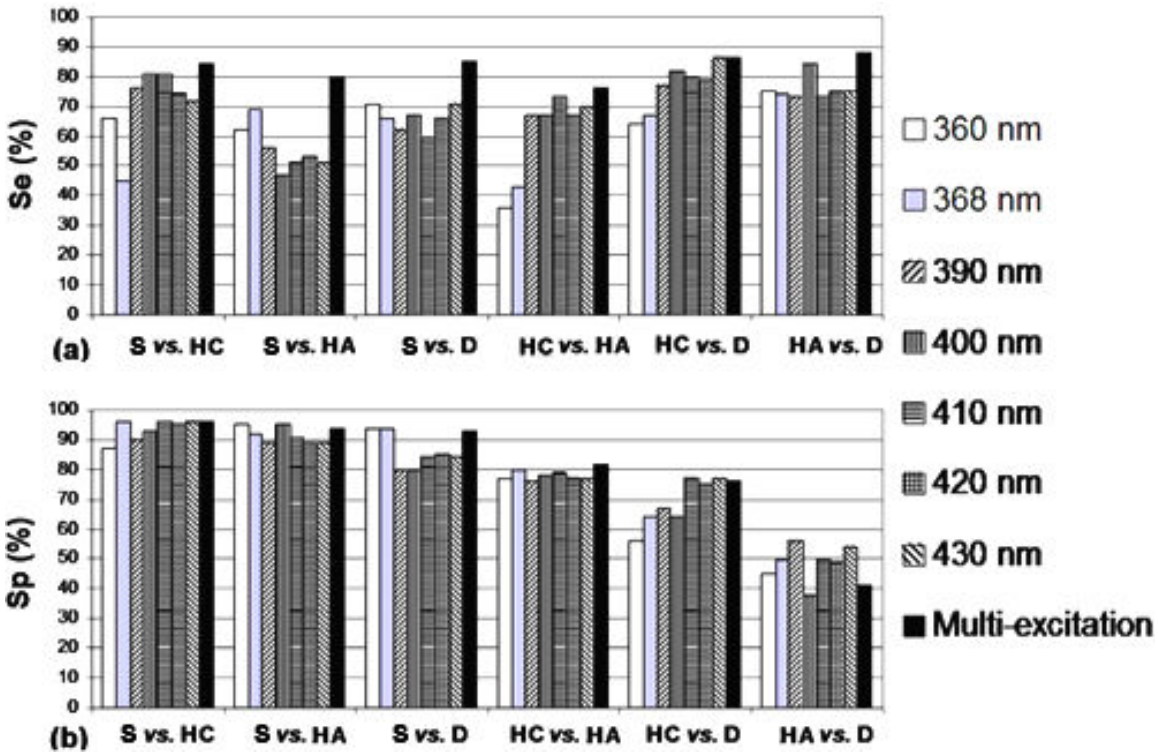

FIGURE 3.24 – Moyenne de Sensibilité (a) et Spécificité (b) obtenues en mono-excitation de fluorescence (chacune des 7 excitations) et en multi-excitation de Fluorescence, pour discriminer les six paires de classes histologiques.

D. Ces résultats pourraient être expliqués par la proximité des caractéristiques histologiques de ces deux catégories (voir tableau 3.2).

Les états HC ont de faibles risques d'évoluer vers un CE, donc l'utilisation de la fluorescence en multi-excitation ou même à des excitations aux longueurs d'onde visibles devrait potentiellement aider à réduire le nombre de procédures cliniques traumatiques inutiles.

Nous observons aussi que les excitations aux longueurs d'onde du visible donnent une sensibilité la plus basse (environ 50%) en discriminant S de HA. Il peut être émis l'hypothèse que la couche de kératine joue un rôle important dans la discrimination spectrale en fluorescence. Les classes S et HA ne présentent pas d'épaisseur anormale de la couche de kératine alors que la classe HC peut présenter une hyperkératose et la classe D souvent une parakératose. Une couche kératinisée absorbe et disperse l'excitation lumineuse, réduisant ainsi la pénétration dans les couches plus profondes. Cet effet peut être remarqué sur la figure 3.14, où la classe HC, caractérisée par une couche épaisse de kératine (hyperkératose), présente une intensité spectrale d'AF moyenne beaucoup plus faible par rapport aux trois autres classes. Sur la base de plusieurs travaux [Wu *et al.*, 2004][Wu *et al.*, 2005][Pena *et al.*, 2005][Skala *et al.*, 2005] étudiant la fluorescence de la kératine et des couches kératinisées de différents tissus, nous pouvons émettre l'hypothèse que la fluorescence de la kératine est impliquée dans nos résultats bien que son influence précise reste difficile à déterminer en raison du fait que le signal d'AF acquis résulte de la contribution de divers fluorophores situés à des profondeurs différentes. Cependant, une explication des meilleurs résultats de sensibilité obtenus en utilisant les excitations aux longueurs d'onde du visible (390-430 nm), pour discriminer HC des trois autres classes histologiques (S, HA et D) peut être la

suivante : la kératine joue un rôle de protection, surtout marquée dans la bande UV et réduit l'excitabilité des fluorophores situés dans l'épiderme (NADH) et le derme (collagène, élastine), qui sont des marqueurs spectraux de la transformation néoplasique. Pour les excitations dans la bande UV, le signal de fluorescence observé est un mélange des émissions du NADH, du collagène et de la kératine et une forte contribution de la kératine peut éventuellement brouiller les différences des signatures spectrales provenant d'autres fluorophores.

3.4.2 Réflectance Diffuse (première approche)

Les valeurs moyennes de sensibilité et de spécificité obtenues en spectroscopie de réflectance diffuse sont données en figure 3.25. La RD est un peu plus efficace (+5.6%) pour discriminer les trois types de tissu hyperplasiques entre eux (HC vs HA, HC vs D et HA vs D) que pour discriminer la classe S des trois autres classes hyperplasiques (moyenne de sensibilité de 69.7 % pour S vs HC, S vs HA et S vs D). Dû principalement à la faible valeur de spécificité obtenue en discriminant HA de D (46%), un plus faible niveau de spécificité est observé (-24%) pour discriminer les trois types d'hyperplasie entre eux (66% en moyenne). Cependant, la spécificité obtenue, en discriminant les tissus sains des tissus hyperplasiques est élevée (90 % en moyenne entre les trois paires histologiques).

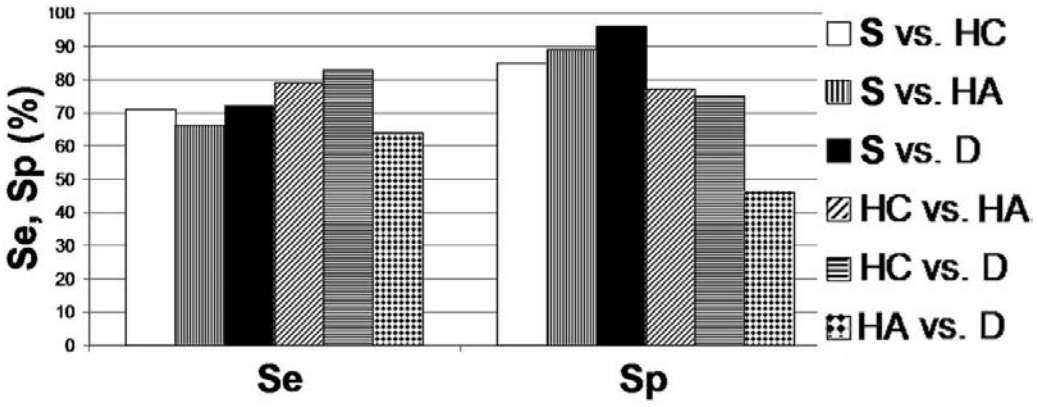

FIGURE 3.25 – Sensibilités (Se) et Spécificités (Sp) moyennes obtenues à partir des caractéristiques en réflectance diffuse, discriminant les six paires histologiques.

3.4.3 Multi-excitation AF, RD et bimodalité (première approche)

Une analyse comparative entre les performances diagnostiques obtenues en multi-excitation d'AF seule, en réfectance diffuse seule et en bimodalité est représentée sur la figure 3.26. Si nous devions choisir une seule modalité sur la base des résultats de sensibilité, nous sélectionnerions la multi-excitation AF. En effet, en moyenne, sur les six paires de classes histologiques discriminées c'est la modalité la plus sensible : avec une sensibilité moyenne de 82%, soit +1 et +10 % par rapport à la bimodalité et la réflectance diffuse seule respectivement. La bimodalité présente un intérêt supplémentaire lorsque l'on considère la spécificité. Même si celle-ci reste faible, la bimodalité améliore légèrement la spécificité (+4%) pour discriminer les trois types d'hyperplasie entre eux, avec une spécificité de 71% contre 66% pour les deux autres modalités (multi-excitation AF et RD seules).

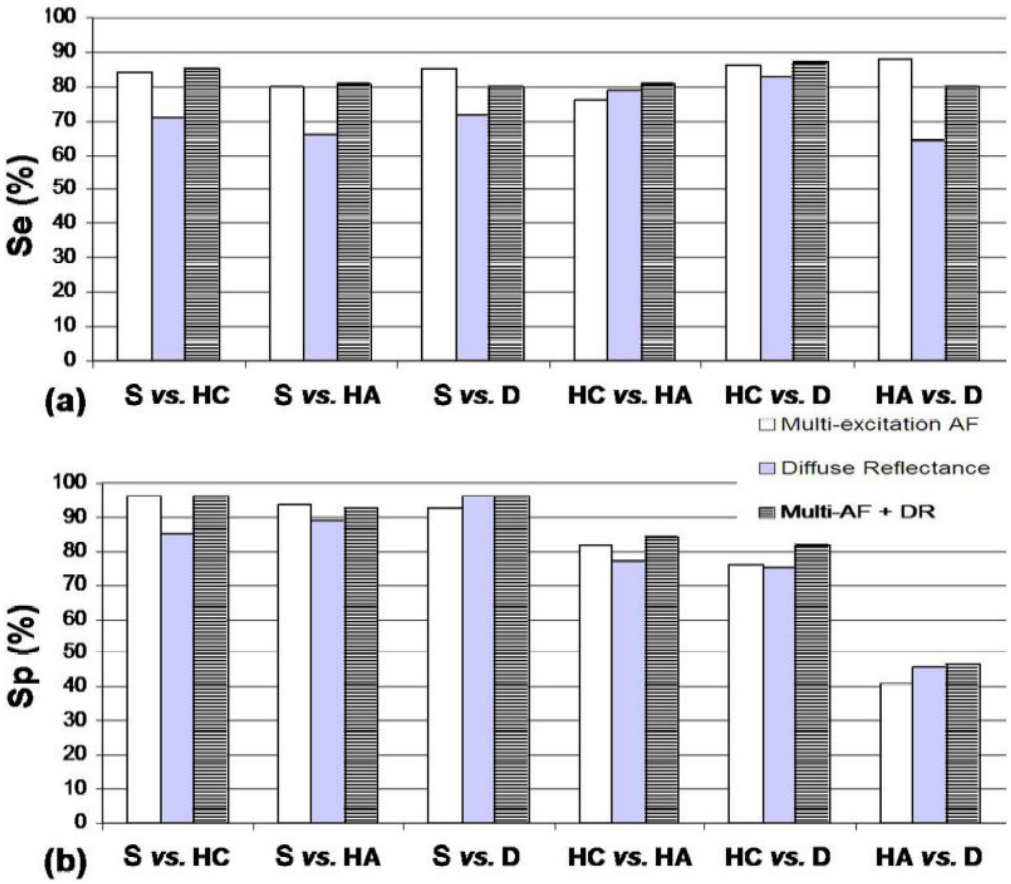

FIGURE 3.26 – Sensibilités (a) et Spécificités (b) moyennes en multi-excitation d'autofluorescence (AF : blanc), en réflectance diffuse seule (RD : gris) et en bimodalité (multi-excitation AF + RD : rayé) pour discriminer les six paires de classes histologiques.

Finalement, le tableau 3.8 synthétise les meilleurs résultats obtenus pour les valeurs de Se et en Sp, ainsi que les valeurs prédictives positives et négatives (VPP et VPN) correspondantes pour discriminer les six paires histologiques, en utilisant les modalités de la première approche (mono- et multi-excitation d'AF, RD seule et spectroscopie bimodale AF+RD).

3.4.4 Spectroscopie bimodale résolue spatialement (deuxième approche)

Les figures 3.27, 3.28, 3.29, 3.30, 3.31 et 3.32 résument les résultats de Sensibilité (SE, colonne de gauche) et de Spécificité (SP, colonne de droite) de la seconde approche discriminant les 6 paires histologiques : a) S vs HC, b) S vs HA, c) S vs D, d) HC vs HA, e) HC vs D et f) HA vs D. Chacun des histogrammes présente les résultats pour les trois algorithmes de classification (k-NN, LDA et SVM) et pour chacune des combinaisons possibles de distances inter-fibres : D1, D2 et D3.

Les résultats des figures 3.27 et 3.28 ont été obtenus à partir de l'ensemble le plus réduit de 13 caractéristiques communes pour la discrimination des 6 paires de classes histologiques. Les résultats des figures 3.29 et 3.30 ont été obtenus en utilisant un ensemble étendu de 186 caractéristiques communes pour la discrimination d'au moins 5 paires de classes histologiques parmi les 6. Aucune augmentation significative de l'efficacité de classification n'a été obtenue en utilisant un ensemble beaucoup plus étendu de caractéristiques spectrales (306) communes pour la discrimination d'au moins 4 paires parmi les 6.

Table 3.8 – Résumé des meilleurs résultats des combinaisons en sensibilité et en spécificité, et les valeurs prédictives positives et négatives obtenus à partir de la classification des données en utilisant les modalités du première approche (mono- et multi-excitation d'AF, RD seule et spectroscopie bimodale AF+RD).

	Se (%)	Sp (%)	VPP(%)	VPN (%)
S vs HC	86	96.5	93.2	92.5
S vs HA	81.4	93	83.6	91.9
S vs D	85.4	93.3	89.4	90.5
HC vs HA	81.3	84.8	80.8	85.2
HC vs D	87.8	82.3	85.5	85
HA vs D	75.5	54.5	71.5	59.5

Les figures 3.27 et 3.28 montrent les résultats obtenus à l'aide de 13 caractéristiques spectrales (6 correspondant à la distance D1, 2 à la distance D2 et 5 pour D3). Les sensibilités et spécificités sont très élevées (près de 100%) pour discriminer la classe histologique HC des trois autres classes (S, HA et D), quelque soit l'algorithme de classification, à la distance D1 ou pour plusieurs combinaisons de D1/D2/D3. Pour la discrimination entre la classe S et les classes HA et D, la sensibilité et la spécificité sont plus élevées (Se <90% et Sp près de 100%) en utilisant la combinaison D1/D2/D3. Dans ce dernier cas, la sensibilité est maximale en utilisant l'algorithme SVM. Cependant, lorsque l'on discrimine HA de D, la sensibilité (environ 65%) et la spécificité (<80%) sont plus faibles. Dans ce cas, on remarque que la sensibilité est plus élevée en utilisant la méthode k-NN et que la spécificité est plus élevée en utilisant la distance D1 seule. Globalement l'algorithme SVM donne les meilleurs résultats.

En discriminant les 6 paires de classes histologiques, de façon globale, les meilleurs résultats sont obtenus pour la distance D1 seule ou pour plusieurs combinaisons entre D1/D2/D3 (sauf pour AH et D). L'algorithme SVM a tendance à discriminer un peu mieux (que les algorithmes k-NN et LDA) la classe saine (S) des autres classes de tissu pathologique (HC, HA vs D). L'algorithme k-NN est légèrement plus efficace pour discriminer les classes pathologiques entre elles. Ces résultats sont obtenus pour un grand nombre de CP, c'est-à-dire, représentant plus de 99% des informations contenues dans le jeu de données original.

Les figures 3.29 et 3.30 montrent un exemple des meilleurs résultats obtenus en suivant la seconde approche de classification utilisant 186 caractéristiques spectrales (44 pour D1, 59 pour D2 et 83 pour D3) discriminant au moins 5 des 6 paires de classes histologiques.

De même que pour le jeu de caractéristiques spectrales réduit, la sensibilité et la spécificité sont très élevés (près de 100%) pour discriminer la classe histologique HC des trois autres classes en utilisant la combinaison des distances D1/D2/D3 et quelque soit l'algorithme de classification. Les résultats obtenus avec un ensemble plus large de caractéristiques (figures 3.29 et 3.30) sont meilleurs que ceux avec un ensemble réduit (figures 3.27 et 3.28) pour discriminer S de AH et D (Se $>$ 95% et Sp $\approx$ 100%) en utilisant les distances D2 ou D3 seules ou la combinaison D1/D2/D3. Dans ces cas, les algorithmes LDA et SVM donnent en moyenne de meilleurs résultats que l'algorithme k-NN.

Comparativement aux résultats obtenus pour 13 caractéristiques (figures 3.27 et 3.28), une faible augmentation de l'efficacité de la discrimination est constatée lorsque l'on discrimine HA de D : la sensibilité est plus élevée lors de l'utilisation des distances D1, D2 ou D3 seules et la spécificité est la plus élevée en utilisant la combinaison des trois distances D1/D2/D3. Dans ce cas,

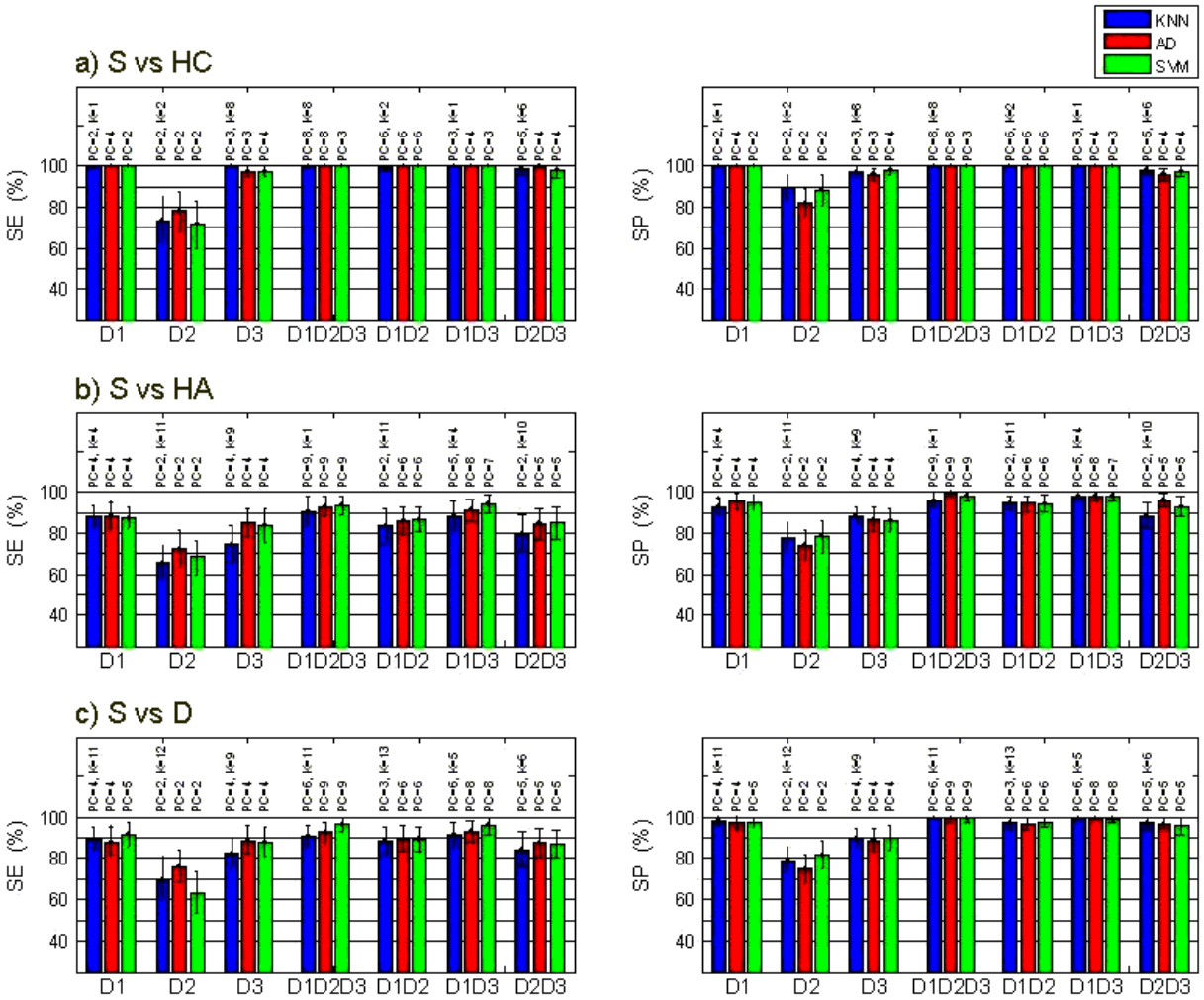

FIGURE 3.27 – Sensibilités (SE) et Spécificités (SP), moyennes calculées à partir d'un jeu de 13 caractéristiques spectrales (D1=6, D2=2 et D3=5) capables de discriminer les 6 paires de classes histologiques : a) S (Sain) vs. HC (Hyperplasie Compensatoire), b) S vs. HA (Hyperplasie Atypique), c) S vs. D (Dysplasie), HC vs. HA, HC vs. D et HA vs. D. Sur chaque histogramme, les résultats sont donnés pour toutes les combinaisons possibles des 3 distances inter-fibres (D1=271 μm, D2 = 536 μm et D3 = 834 μm) et pour chacune des trois méthodes de classification. PC et K indiqués sur chaque histogramme correspondent aux nombres de composantes principales (PC) et de plus proches voisins (k) permettant d'obtenir les résultats optimaux montrés ici. Les barres d'erreur représentent les écart-types obtenus pour les moyennes de Se et Sp calculées sur 100 valeurs (itérations).

la valeur la plus élevée de sensibilité (65%) est obtenue en utilisant la combinaison D1/D2/D3 avec l'algorithme LDA, la valeur la plus élevée de spécificité (80%) est obtenue en utilisant la combinaison D2/D3 avec l'algorithme k-NN.

La précision générale de classification est accrue notamment en discriminant S vs HA et D, en utilisant la combinaison entre les trois distances D1/D2/D3 et un ensemble de 13 à 186 caractéristiques spectrales. Les meilleurs résultats sont obtenus pour des nombres de 10 à 20 CP contenant entre 90 et 95% de la variance de l'information du jeu de données originales.

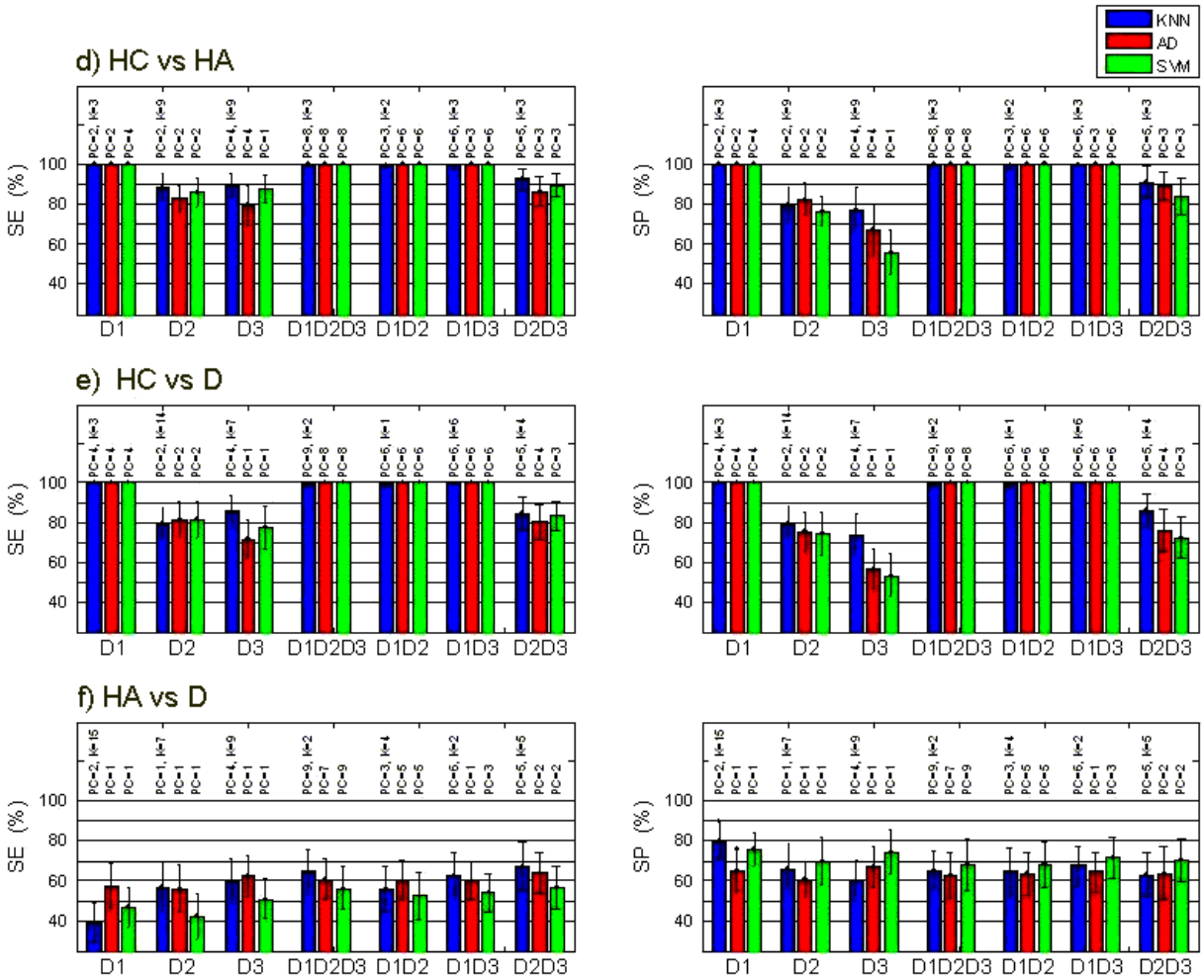

FIGURE 3.28 – Sensibilités (SE) et Spécificités (SP), moyennes calculées à partir d'un jeu de 13 caractéristiques spectrales (D1=6, D2=2 et D3=5) capables de discriminer les 6 paires de classes histologiques : S (Sain) vs. HC (Hyperplasie Compensatoire), S vs. HA (Hyperplasie Atypique), S vs. D (Dysplasie), d) HC vs. HA, e) HC vs. D et f) HA vs. D. Sur chaque histogramme, les résultats sont donnés pour toutes les combinaisons possibles des 3 distances inter-fibres (D1=271 μm, D2 = 536 μm et D3 = 834 μm) et pour chacune des trois méthodes de classification. PC et K indiqués sur chaque histogramme correspondent aux nombres de composantes principales (PC) et de plus proches voisins (k) permettant d'obtenir les résultats optimaux montrés ici. Les barres d'erreur représentent les écart-types obtenus pour les moyennes de Se et Sp calculées sur 100 valeurs (itérations).

Autrement dit, la sensibilité et la spécificité sont proches de 100% pour toutes les paires histologiques comparées (à l'exception de HA vs D) en utilisant la combinaison des trois distances D1/D2/D3 et les caractéristiques spectrales capables de discriminer au moins 5 des 6 paires histologiques. Globalement les algorithmes SVM et LDA semblent un peu plus performants que l'algorithme k-NN. Toutefois, lorsque l'on cherche à discriminer HA de D, la sensibilité et la spécificité restent inférieures à 70% et 80% respectivement.

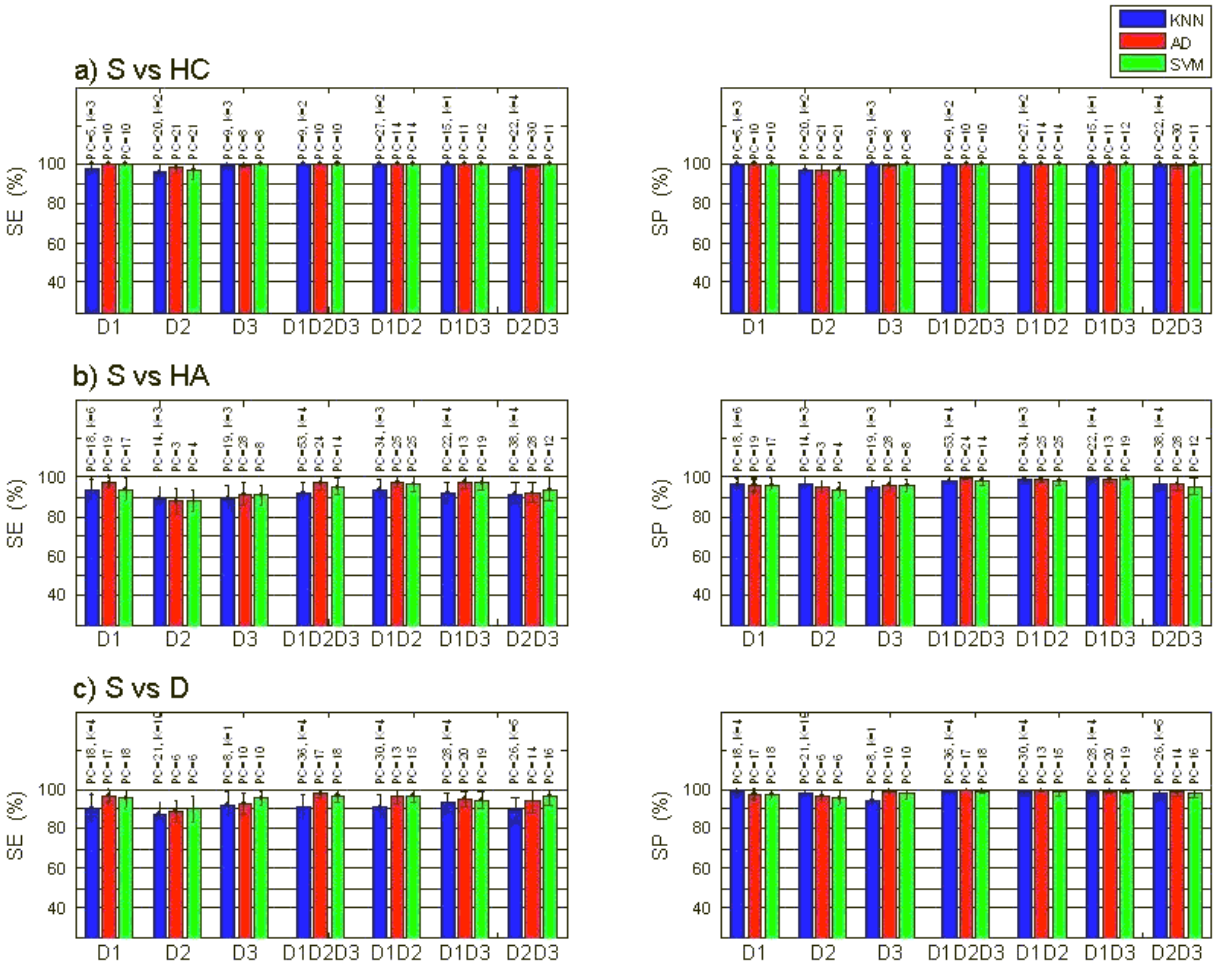

FIGURE 3.29 – Sensibilités (SE) et Spécificités (SP), moyennes calculées à partir d'un jeu de 186 caractéristiques spectrales (D1=44, D2=59 et D3=83) capables de discriminer au moins 5 des 6 paires histologiques : a) S (Sain) vs. HC (Hyperplasie Compensatoire), b) S vs. HA (Hyperplasie Atypique), c) S vs. D (Dysplasie), HC vs. HA, HC vs. D et HA vs. D. Sur chaque histogramme, les résultats sont donnés pour toutes les combinaisons possibles des 3 distances inter-fibres (D1=271 μm, D2 = 536 μm et D3 = 834 μm) et pour chacune des trois méthodes de classification. PC et K indiqués sur chaque histogramme correspondent aux nombres de composantes principales (PC) et de plus proches voisins (k) permettant d'obtenir les résultats optimaux montrés ici. Les barres d'erreur représentent les écart-types obtenus pour les moyennes de Se et Sp calculées sur 100 valeurs (itérations).

Nous observons sur les figures 3.31 et 3.32 les résultats obtenus en utilisant 306 caractéristiques spectrales (D1=83, D2=98 et D3=125), c'est à dire capables de discriminer au moins 4 des 6 paires histologiques. Nous ne remarquons pas d'amélioration significative, Se et Sp sont proches de 100% pour S vs HC, HA et D. Se $<$ 65% et Sp $<$ 80% pour HA vs D sauf pour discriminer S vs HA et D pour lesquels Se et Sp $>$ 98%.
La paire de classes histologiques la plus difficile à discriminer reste encore HA vs D. Nous avons donc testé une autre approche de sélection du jeu de caractéristiques en ajoutant aux 3 jeux de caractéristiques testés précédemment (13 : D1 = 6, D2 = 2 et D3 = 5 ; et 186 : D1=44, D2=59 et D3=83) les caractéristiques qui discriminent exclusivement la paire HA vs D.

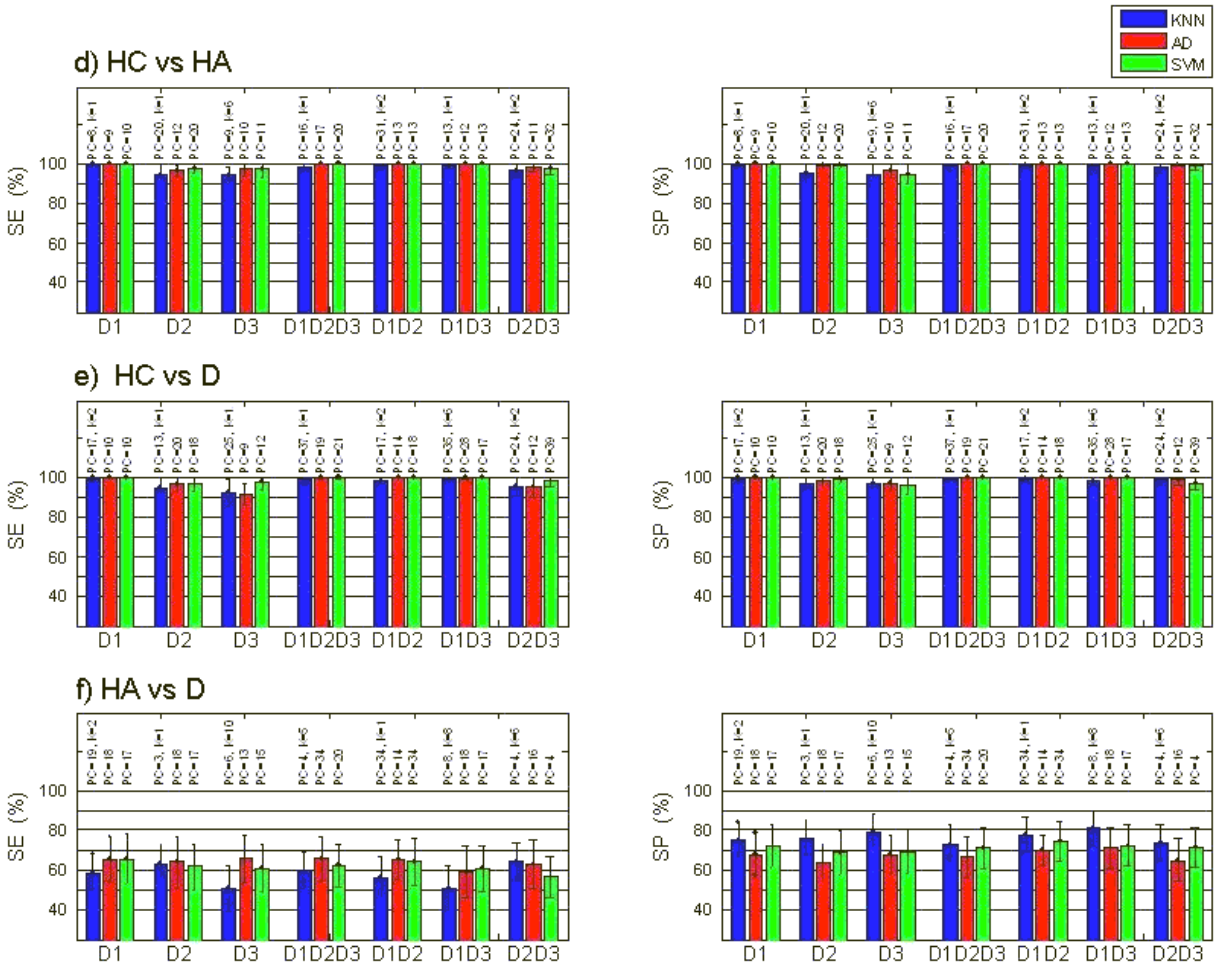

FIGURE 3.30 – Sensibilités (SE) et Spécificités (SP), moyennes calculées à partir d'un jeu de 186 caractéristiques spectrales (D1=44, D2=59 et D3=83) capables de discriminer au moins 5 des 6 paires histologiques : S (Sain) vs. HC (Hyperplasie Compensatoire), S vs. HA (Hyperplasie Atypique), S vs. D (Dysplasie), d) HC vs. HA, e) HC vs. D et f) HA vs. D. Sur chaque histogramme, les résultats sont donnés pour toutes les combinaisons possibles des 3 distances inter-fibres (D1=271 μm, D2 = 536 μm et D3 = 834 μm) et pour chacune des trois méthodes de classification. PC et K indiqués sur chaque histogramme correspondent aux nombres de composantes principales (PC) et de plus proches voisins (k) permettant d'obtenir les résultats optimaux montrés ici. Les barres d'erreur représentent les écart-types obtenus pour les moyennes de Se et Sp calculées sur 100 valeurs (itérations).

Les résultats montrés sur les figures 3.33 et 3.34 correspondent ainsi aux algorithmes utilisant la concaténation des caractéristiques qui discriminent exclusivement la paire HA vs D plus les 13 caractéristiques qui discriminent les six paires. Nous observons une amélioration de Se vers 73% et une petite diminution de Sp vers 76 %. Globalement, tant pour Se que pour Sp, l'algorithme k-NN donne de meilleurs résultats par rapport aux deux autres algorithmes (LDA et SVM). La meilleure combinaison (Se $\approx$ 73% et Sp $\approx$ 76%) a été obtenue avec le couple de plus grandes distances D2/D3.

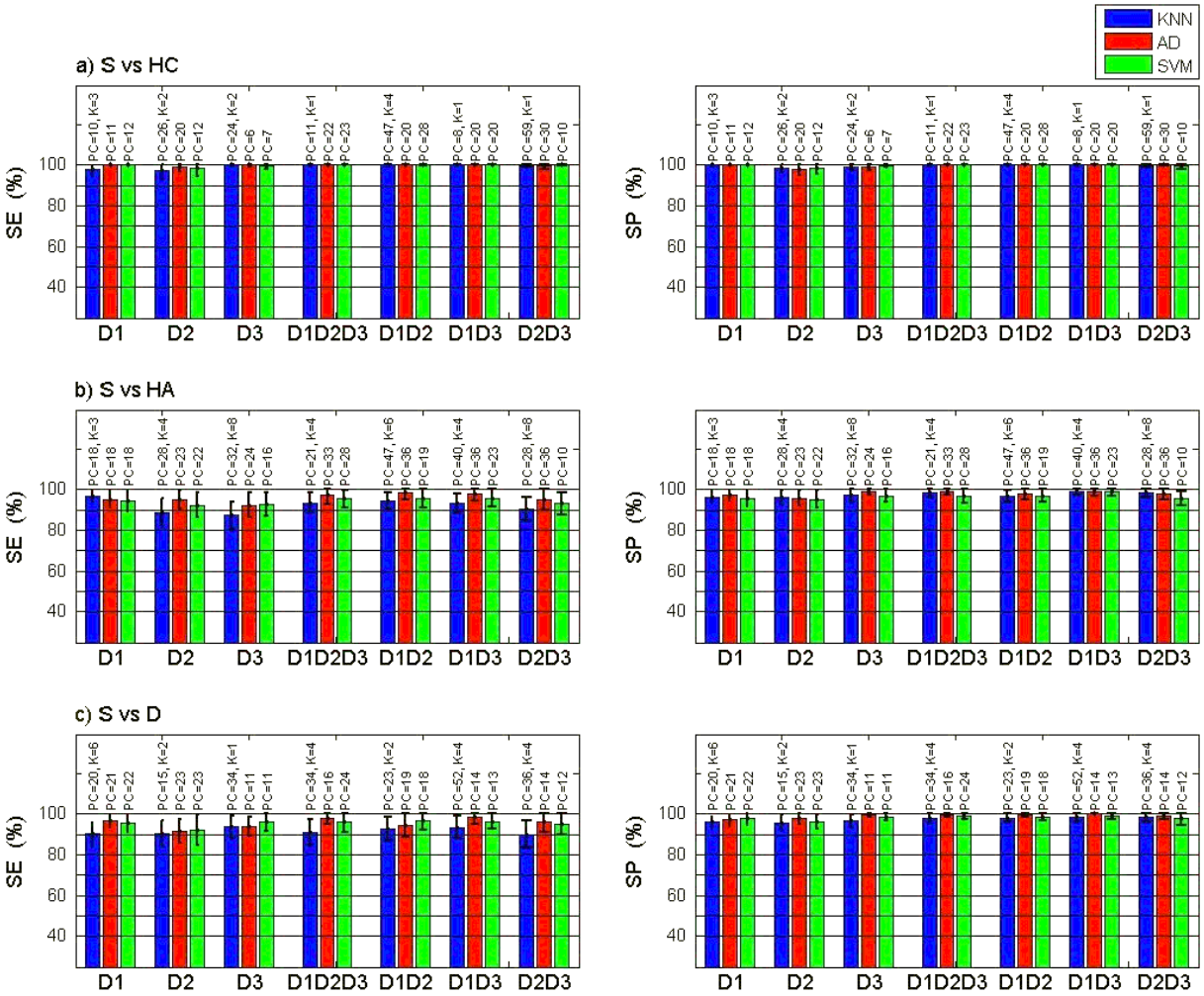

FIGURE 3.31 – Sensibilités (SE) et Spécificités (SP), moyennes calculées à partir d'un jeu de 306 caractéristiques spectrales (D1=83, D2=98 et D3=125) capables de discriminer au moins 4 des 6 paires de classes histologiques : a) S (Sain) vs. HC (Hyperplasie Compensatoire), b) S vs. HA (Hyperplasie Atypique), c) S vs. D (Dysplasie), HC vs. HA, HC vs. D et HA vs. D. Sur chaque histogramme, les résultats sont donnés pour toutes les combinaisons possibles des 3 distances inter-fibres (D1=271 μm, D2 = 536 μm et D3 = 834 μm) et pour chacune des trois méthodes de classification. PC et K indiqués sur chaque histogramme correspondent aux nombres des composants principaux (PC) et de plus proches voisins (k) permettant d'obtenir les résultats optimaux montrés ici. Les barres d'erreur représentent les écart-types obtenus pour les moyennes de Se et Sp calculées sur 100 valeurs (itérations).

Quand nous utilisons la concaténation des caractéristiques qui discriminent exclusivement la paire histologique HA vs D avec les 186 caractéristiques qui discriminent au moins 5 des six paires, les résultats (figures 3.35 et 3.36) concernant la discrimination HA vs D ne montrent pas d'amélioration significative (Se $<$ 65% et Sp $<$ 80%). La meilleure combinaison (Se $\approx$ 64% et Sp $\approx$ 75%) est obtenue pour la distance D2 et l'algorithme k-NN. En général, les résultats pour les 5 autres paires de classes histologiques restent autour des valeurs obtenues avec les trois approches utilisées précédemment (pour les 13, 186 et 306 caractéristiques).

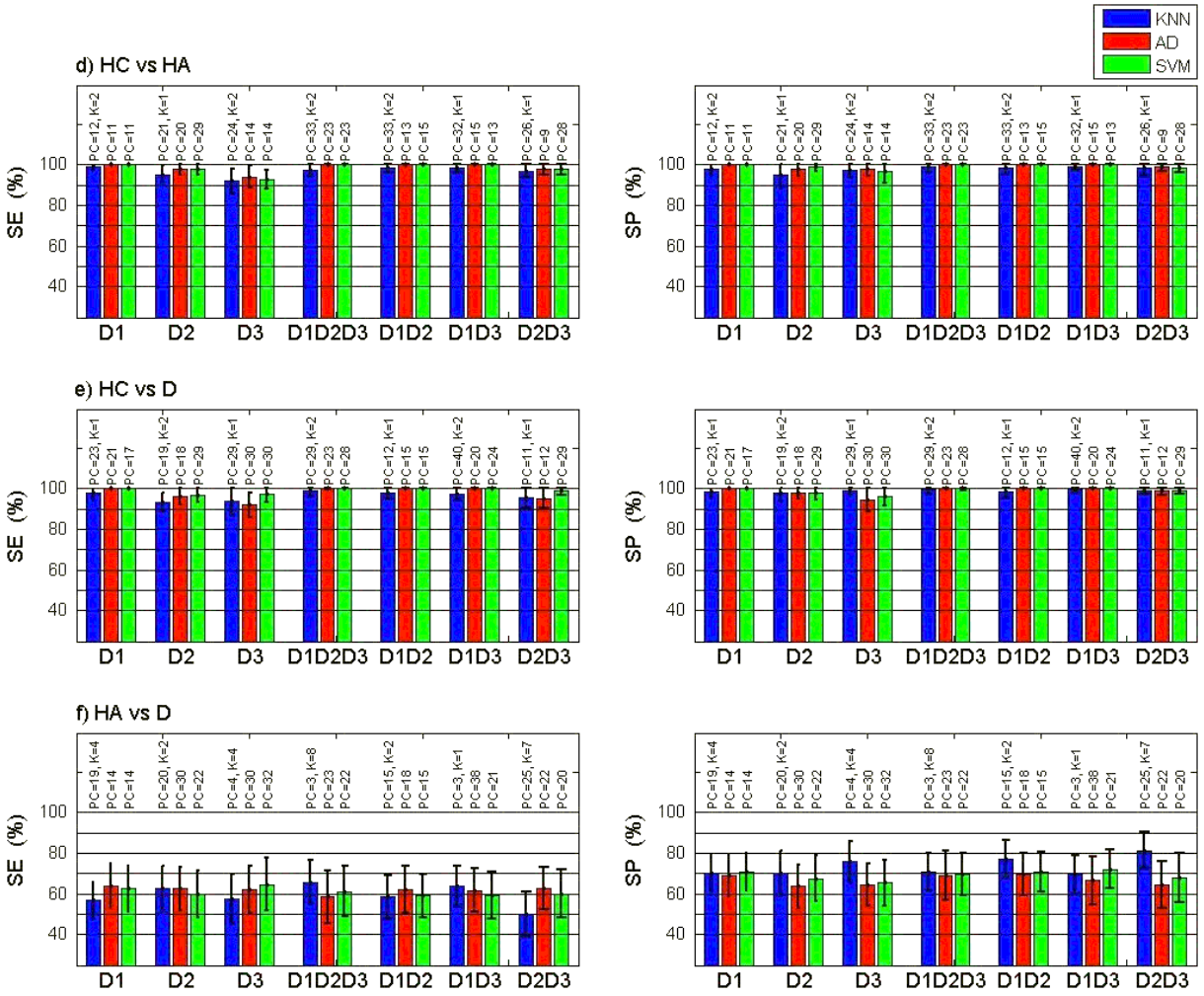

FIGURE 3.32 – Sensibilités (SE) et Spécificités (SP), moyennes calculées à partir d'un jeu de 306 caractéristiques spectrales (D1=83, D2=98 et D3=125) capables de discriminer au moins 4 des 6 paires de classes histologiques : S (Sain) vs. HC (Hyperplasie Compensatoire), S vs. HA (Hyperplasie Atypique), S vs. D (Dysplasie), d) HC vs. HA, e) HC vs. D et f) HA vs. D. Sur chaque histogramme, les résultats sont donnés pour toutes les combinaisons possibles des 3 distances inter-fibres (D1=271 μm, D2 = 536 μm et D3 = 834 μm) et pour chacune des trois méthodes de classification. PC et K indiqués sur chaque histogramme correspondent aux nombres des composants principaux (PC) et de plus proches voisins (k) permettant d'obtenir les résultats optimaux montrés ici. Les barres d'erreur représentent les écart-types obtenus pour les moyennes de Se et Sp calculées sur 100 valeurs (itérations).

Finalement, le tableau 3.9 synthétise les meilleurs résultats obtenus pour les valeurs de Se et en Sp, ainsi que les valeurs prédictives positives et négatives (VPP et VPN) correspondantes pour discriminer les six paires histologiques, en utilisant la spectroscopie bimodale résolue spatialement (deuxième approche).

Table 3.9 – Résumé des meilleurs résultats des combinaisons en sensibilité et en spécificité et les valeurs prédictives positives et négatives obtenues à partir de la classification des données en utilisat la spectroscopie bimodale résolue spatialement (deuxième approche).

	Se (%)	Sp (%)	VPP(%)	VPN (%)
S vs HC	100	100	100	100
S vs HA	97.2	99.8	99.8	97.9
S vs D	98	100	100	98.7
HC vs HA	100	100	100	100
HC vs D	100	100	100	100
HA vs D	73	76	73	75.9

3.5 Discussion des résultats

Nos résultats confirment et approfondissent ceux d'autres travaux déjà publiés, notamment par Diagardjane et al. [Diagaradjane *et al.*, 2005] qui utilisent la multi-excitation en AF pour différencier plusieurs états cancéreux chimio-induits sur peau de souris, par Chang et al. [Chang *et al.*, 2005] et Georgakoudi et al. [Georgakoudi *et al.*, 2002] qui utilisent les spectroscopies bimodale et trimodale (multi-excitation d'AF et DR) pour diagnostiquer divers états cancéreux du col de l'utérus, ainsi que par Inaguama et al. [Inaguma and Hashimoto, 1999] qui utilisent la mono-excitation d'AF à 410 nm pour diagnostiquer le cancer oral humain. Dans ces études, les auteurs ont mentionné que les pics d'absorption de l'hémoglobine ($\approx$ 420, 545 et 575 nm) liés à l'activité vasculaire hyperplasique progressive et les émissions d'AF liées aux flavines, collagène, NADH et porphyrines peuvent être utilisés comme "bio-marqueurs" pour différencier divers états précancéreux de tissus. Plus spécifiquement, la présence d'augmentation d'intensité d'émission liée aux porphyrines est également associée aux modifications hyperplasiques impliquant des transformations de l'hémoglobine [Yang *et al.*, 1987] pris de [Karthikeyan *et al.*, 1999], ou aux changements de l'environnement cellulaire [Balasubramanian *et al.*, 1995] pris de [Karthikeyan *et al.*, 1999]. Inaguama et al. [Inaguma and Hashimoto, 1999] ont également publié que la porphyrine peut être excrétée comme des métabolites par le tissu cancéreux et qu'elle est présente non seulement dans le cancer avancé mais également aux étapes "préliminaires" de cancer.
Les caractéristiques spectrales (pentes, rapports, aires, etc.) extraites et sélectionnées parmi nos spectres de RD sont liées aux pics d'absorption d'hémoglobine et ceux des spectres d'AF sont liés aux spectres d'émission des fluorophores endogènes : flavines, collagène, NADH et porphyrines.

En observant les spectres moyens d'émission d'AF normalisés pour les excitations à 390, 400, 410, 420 et 430 nm, nous remarquons que l'intensité globale moyenne dans la bande 450-550 nm (liée au collagène, NADH et flavines), pour les spectres classés S, est plus élevée que celle des trois autres classes, pour la classe HC est inférieure à celle des trois autres classes, pour la classe D est légèrement plus élevée que celle de la classe HA. Dans la bande spectrale 550-700 nm (liée aux flavines et porphyrines), l'intensité globale moyenne de la courbe spectrale, pour la classe HC, est supérieure à celle des trois autres classes, pour la classe S est inférieure à celle des trois autres classes, pour la classe HA est légèrement plus élevée que celle de la classe D.
Pour les spectres de RD acquis aux distances D1, D2 et D3, l'amplitude globale moyenne de la courbe spectrale, pour les spectres classés HC est inférieure à celle des classes AH et D, pour la classe HA est plus élevée que celle des classes HC et D, pour la classe D est légèrement inférieure à celle de la classe HA. L'amplitude globale de la courbe spectrale correspondant à la classe S

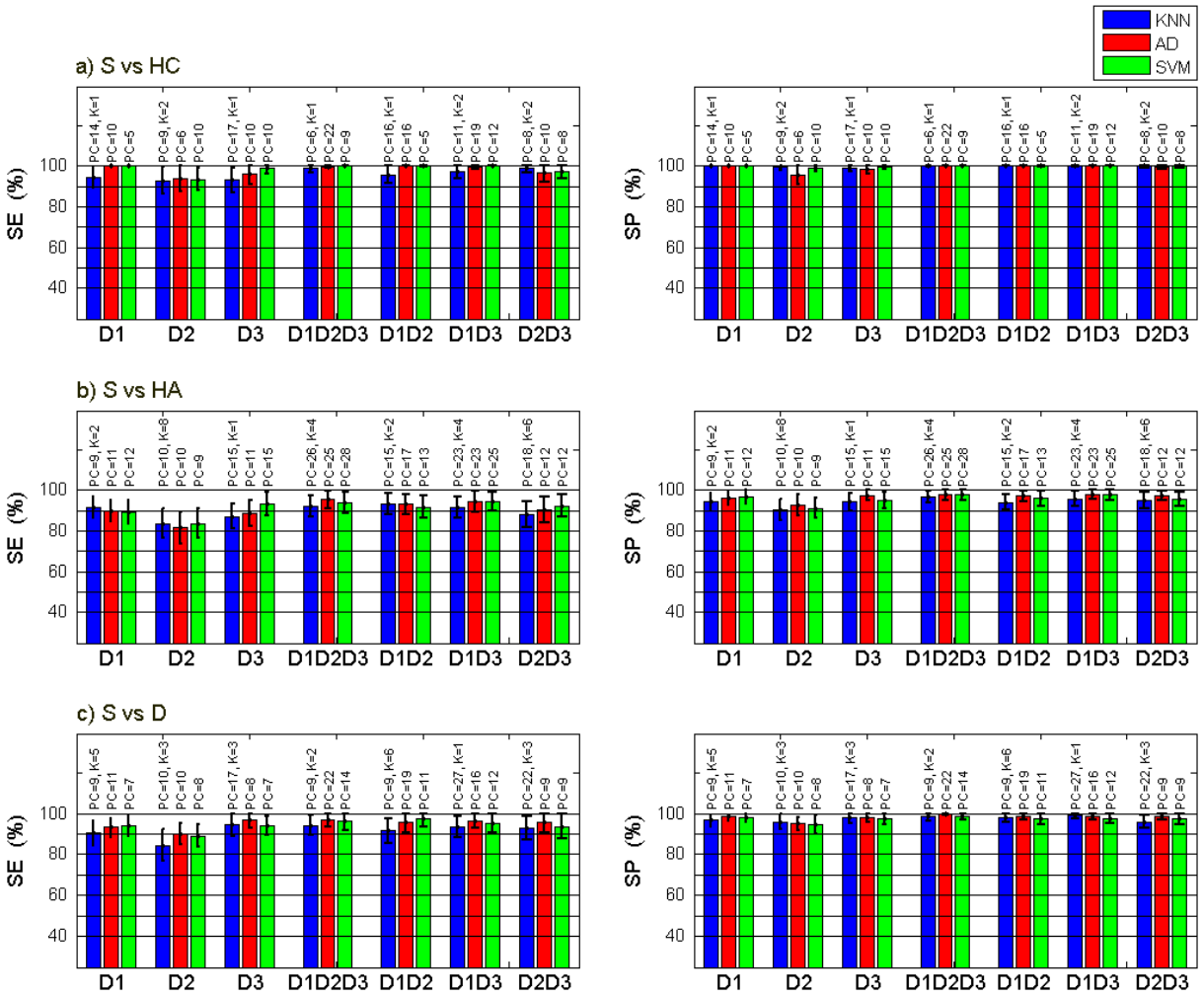

FIGURE 3.33 – Sensibilités (SE) et Spécificités(SP) en utilisant les caractéristiques qui discriminent exclusivement HA (Hyperplasie Atypique) vs D (Dysplasie) + moyennes calculées à partir d'un jeu de 13 caractéristiques spectrales (D1=6, D2=2 et D3=5) capables de discriminer les 6 paires de classes histologiques : a) S (Sain) vs. HC (Hyperplasie Compensatoire), b) S vs. HA (Hyperplasie Atypique), c) S vs. D (Dysplasie), HC vs. HA, HC vs. D et HA vs. D. Sur chaque histogramme, les résultats sont donnés pour toutes les combinaisons possibles des 3 distances inter-fibres (D1=271 μm, D2 = 536 μm et D3 = 834 μm) et pour chacune des trois méthodes de classification. PC et K indiqués sur chaque histogramme correspondent aux nombres des composantes principales (PC) et de plus proches voisins (k) permettant d'obtenir les résultats optimaux montrés ici. Les barres d'erreur représentent les écart-types obtenus pour les moyennes de Se et Sp calculées sur 100 valeurs (itérations).

est très différente des trois autres classes. Pour la distance D1, dans la bande spectrale 390-450 nm (pic d'absorption d'hémoglobine à 420 nm), cette amplitude est plus élevée que celles des trois autres classes, dans la bande 450-575 nm, elle est inférieure à celle de la classe HA et dans la bande 575-720 inférieure à celle des classes HA et D. Pour les distances D2 et D3, l'amplitude globale moyenne des spectres classés S diminue : dans la bande spectrale 390-450 nm, elle est inférieure à celle de la classe HA et similaire à celle de la classe D ; dans la bande spectrale 450-720 nm, elle est inférieure à celles des classes HA et D.

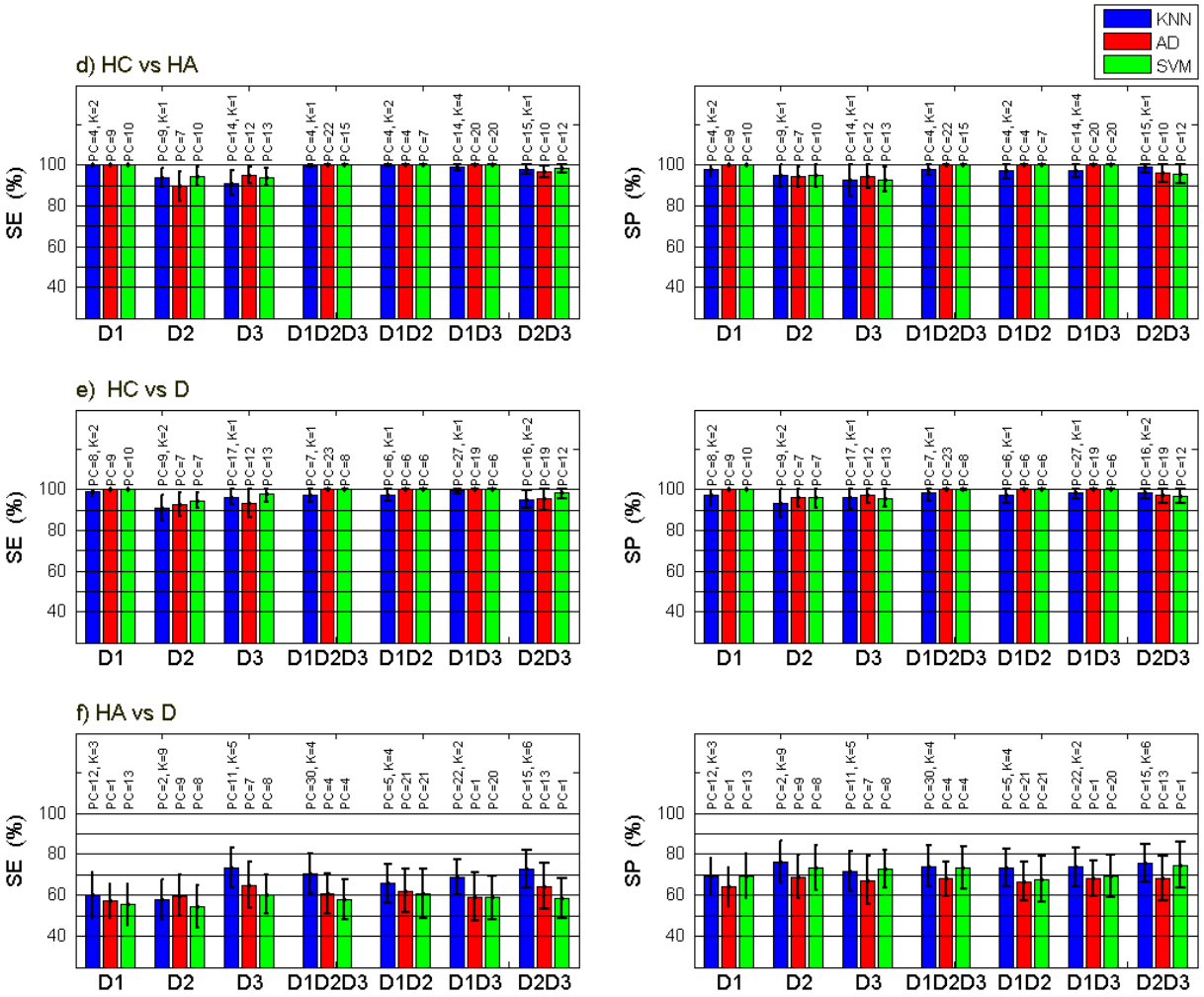

FIGURE 3.34 – Sensibilités (SE) et Spécificités(SP) en utilisant les caractéristiques qui discriminent exclusivement HA (Hyperplasie Atypique) vs D (Dysplasie) + moyennes calculées à partir d'un jeu de 13 caractéristiques spectrales (D1=6, D2=2 et D3=5) capables de discriminer les 6 paires de classes histologiques : S (Sain) vs. HC (Hyperplasie Compensatoire), S vs. HA (Hyperplasie Atypique), S vs. D (Dysplasie), d) HC vs. HA, e) HC vs. D et f) HA vs. D. Sur chaque histogramme, les résultats sont donnés pour toutes les combinaisons possibles des 3 distances inter-fibres (D1=271 μm, D2 = 536 μm et D3 = 834 μm) et pour chacune des trois méthodes de classification. PC et K indiqués sur chaque histogramme correspondent aux nombres des composantes principales (PC) et de plus proches voisins (k) permettant d'obtenir les résultats optimaux montrés ici. Les barres d'erreur représentent les écart-types obtenus pour les moyennes de Se et Sp calculées sur 100 valeurs (itérations).

Deux des creux liés aux pics d'absorption de l'hémoglobine (545 et 575 nm) sont légèrement visibles pour les spectres d'AF acquis à la distance D1, et deviennent plus évidents (ils augmentent) pour les spectres d'AF acquis à la distance D3. L'intensité du pic d'émission à 633 nm (liée à la porphyrine) est également augmentée pour les spectres d'AF acquis à la distance D3. Pour les spectres de RD, les pics d'absorption de l'hémoglobine sont plus nettement visibles sur les courbes acquises à la distance D3 en comparaison de celles acquises à la distance D1. Quand la distance entre les fibres d'excitation-réception augmente, la profondeur de la peau sondée aug-

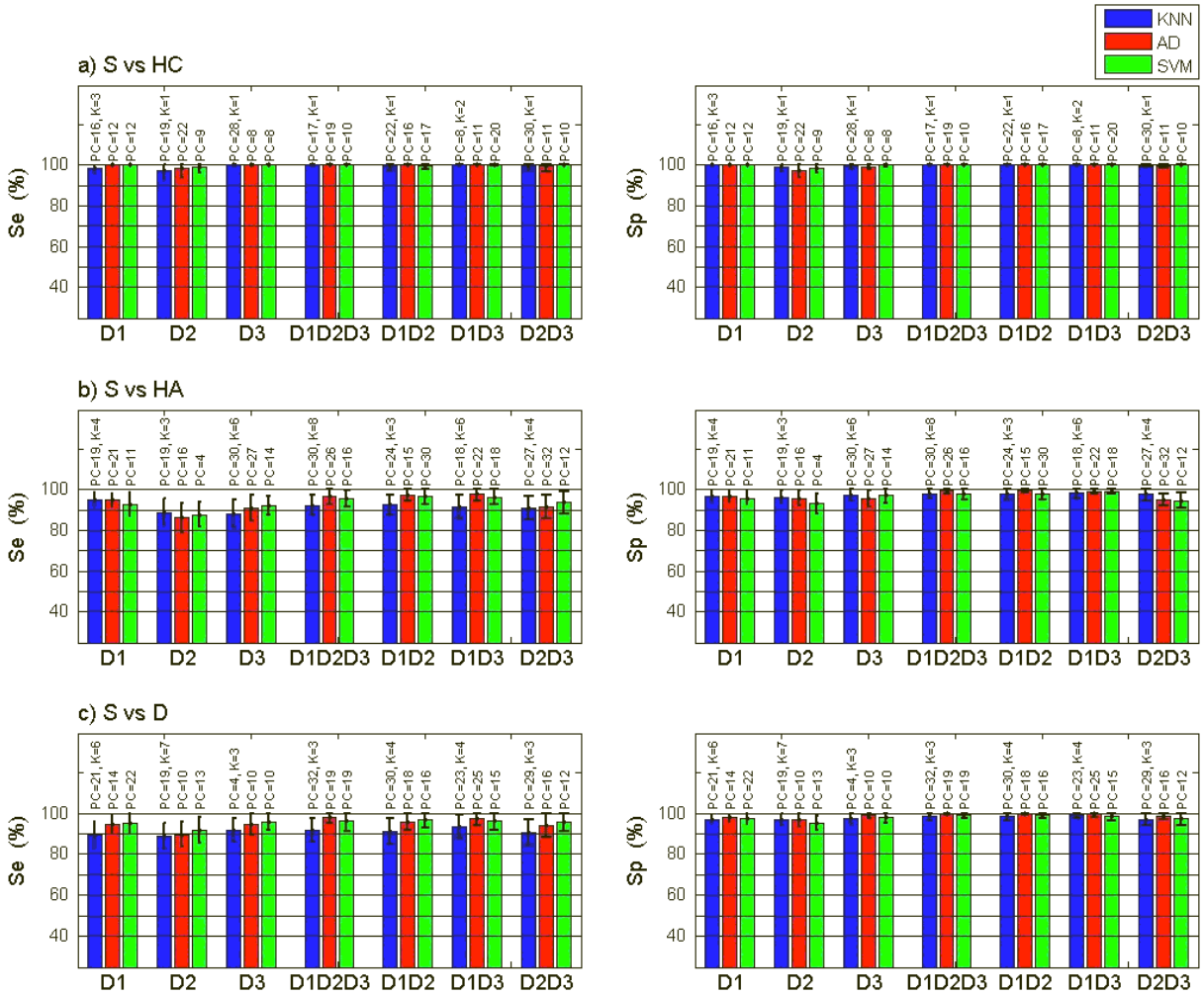

FIGURE 3.35 – Sensibilité (SE) et Spécificité (SP) en utilisant les caractéristiques qui discriminent exclusivement HA (Hyperplasie Atypique) vs D (Dysplasie) + moyennes calculées à partir d'un jeu de 186 caractéristiques spectrales (D1=44, D2=59 et D3=83) capables de discriminer au moins 5 des 6 paires de classes histologiques : a) S (Sain) vs. HC (Hyperplasie Compensatoire), b) S vs. HA (Hyperplasie Atypique), c) S vs. D (Dysplasie), HC vs. HA, HC vs. D et HA vs. D. Pour chaque histogramme, les résultats sont donnés pour toutes les combinaisons possibles des 3 distances inter-fibres (D1=271 μm, D2 = 536 μm et D3 = 834 μm) et pour chacune des trois méthodes de classification. PC et K indiqués sur chaque histogramme correspondent aux nombres de composantes principales (PC) et de plus proches voisins (k) permettant d'obtenir les résultats optimaux montrés ici. Les barres d'erreur représentent les écart-types obtenus pour les moyennes de Se et Sp calculées sur 100 valeurs (itération).

mente aussi [Katika and Pilon, 2006], donc l'absorption (visible dans les spectres de RD et d'AF) et l'émission des porphyrines (pour l'AF) sont plus nettement visibles sur les spectres acquis à la distance D3.

Dans leur étude sur un modèle de tumeur chimio-induite (DMBA/TPA) sur la peau de souris, Diagardjane et al. [Diagaradjane *et al.*, 2005] ont obtenu de bons résultats en distinguant différents états précancéreux en utilisant la multi-excitation d'AF dans la bande 280-460 nm et

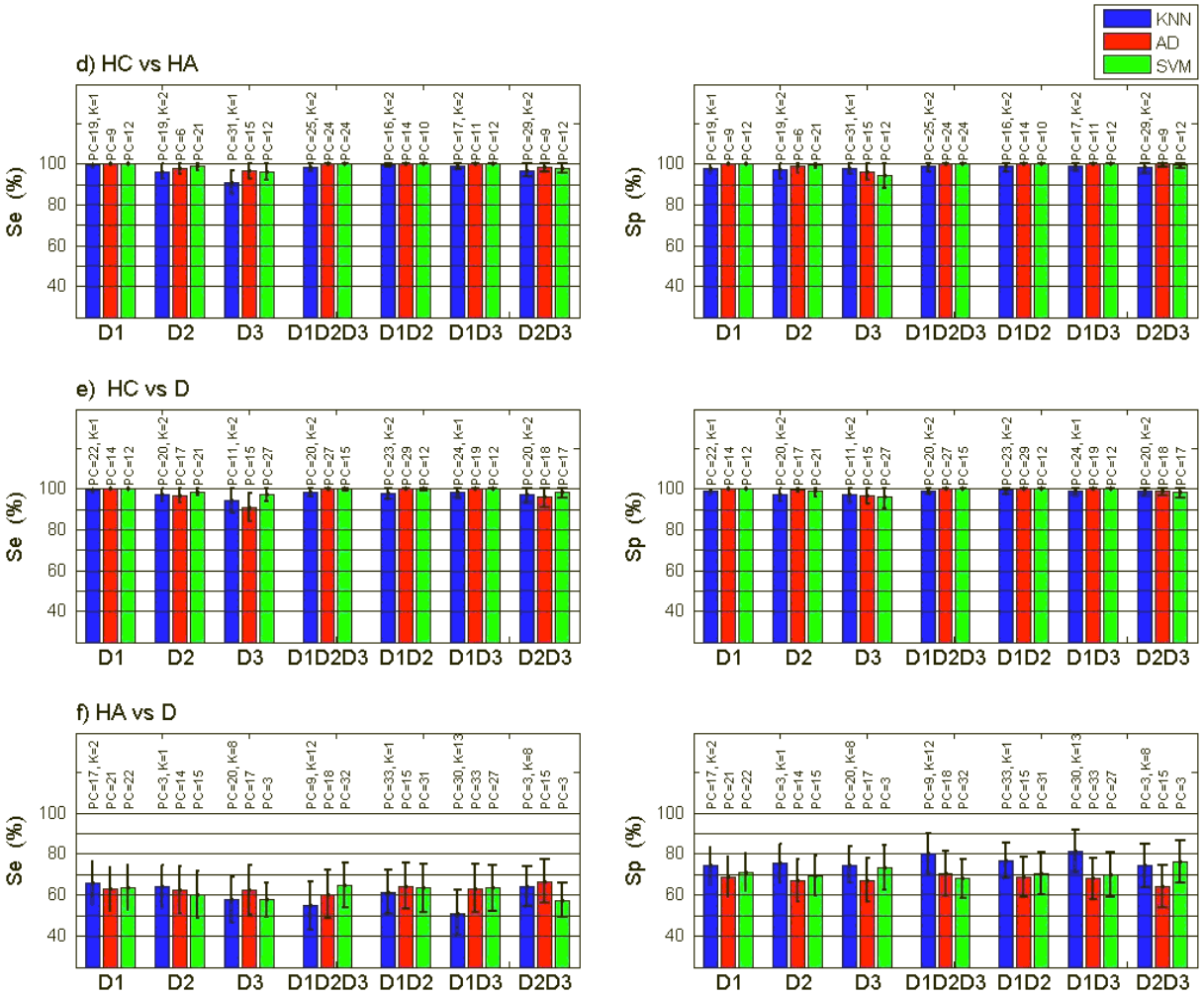

FIGURE 3.36 – Sensibilité (SE) et Spécificité (SP) en utilisant les caractéristiques qui discriminent exclusivement HA (Hyperplasie Atypique) vs D (Dysplasie) + moyennes calculées à partir d'un jeu de 186 caractéristiques spectrales (D1=44, D2=59 et D3=83) capables de discriminer au moins 5 des 6 paires de classes histologiques : S (Sain) vs. HC (Hyperplasie Compensatoire), S vs. HA (Hyperplasie Atypique), S vs. D (Dysplasie), d) HC vs. HA, e) HC vs. D et f) HA vs. D. Pour chaque histogramme, les résultats sont donnés pour toutes les combinaisons possibles des 3 distances inter-fibres (D1=271 μm, D2 = 536 μm et D3 = 834 μm) et pour chacune des trois méthodes de classification. PC et K indiqués sur chaque histogramme correspondent aux nombres de composantes principales (PC) et de plus proches voisins (k) permettant d'obtenir les résultats optimaux montrés ici. Les barres d'erreur représentent les écart-types obtenus pour les moyennes de Se et Sp calculées sur 100 valeurs (itération).

la classification LDA. Ils ont défini 5 catégories : I (Sain), II (Inflammation et Hyperplasie), III (Hyperplasie et Dysplasie), IV et V (Carcinomes). Pour la classification des catégories I, II et III en utilisant des excitations dans la bande 360-420 nm, leurs résultats étaient 62.1% $<$ Se $<$ 69.0% et 82.2% $<$ Sp $<$ 95.6%. Dans notre travail, nous nous sommes concentré sur une classification plus fine correspondant aux catégories II et III, et nous avons obtenu, grâce à la bimodalité notamment, de meilleurs résultats en Se et Sp, en utilisant des longueurs d'onde d'excitations supérieures à 360 nm.

Chang et al. [Chang *et al.*, 2005] ont classifié des tissus sains (épithélium pavimenteux normal, SN) et pathologiques du col d'utérus (lésions intra-épithéliales de bas et haut grades LGSIL et HGSIL), en utilisant la multi-excitation d'AF dans la bande 330-480 nm et la RD, et en combinant l'ACP et l'algorithme de distance de Mahalanobis. Plusieurs paires de discrimination ont été définies (SN vs NC, SN vs LGSIL, SN vs HGSIL, NC vs LGSIL et NC vs HGSIL). Pour la classification SN vs LGSIL, leurs résultats étaient $53\% < \text{Se} < 95\%$ et $69\% < \text{Sp} < 91\%$. Bien que notre travail concerne un autre type d'épithélium, nous avons proposé une classification plus fine des tissus sains et précancéreux dans 4 sous-classes (S, HC) et (HA, D). Nos résultats sont globalement meilleurs avec Se et Sp $> 97\%$, sauf pour discriminer HA vs D (Sp $\approx 76\%$ et Se $\approx 73\%$).

Nos résultats (Se et Sp $\approx 100\%$ pour HC vs autres, Sp $\approx 100\%$ et Se $> 97\%$ pour S vs HA ou D, Sp $\approx 76\%$ et Se $\approx 73\%$ pour HA vs D) sont également en accord avec divers résultats de travaux qui ont employés des techniques de classification comme les SVM ou les réseaux de neurones artificiels (RNA). Lin et al. [Lin *et al.*, 2004] ont développé des algorithmes basés sur les SVM (linéaire et non linéaire), en utilisant des excitations d'AF à 405 et 436 nm pour distinguer des tissus nasopharyngés normaux et cancéreux. Ils ont obtenu Se = 94% et Sp = 97% et Se = 95% et Sp = 99% en utilisant des SVM linéaire et non linéaire respectivement. Ils ont combiné l'ACP avec les SVM et ont ainsi réduit la complexité de leurs algorithmes sans sacrifier la performance. Nayak et al. [Nayak *et al.*, 2006] ont développé des algorithmes basés sur l'ACP et les RNA, en utilisant une excitation d'AF à 325 nm pour discriminer des tissus oraux humains normaux, précancéreux et cancéreux. Ils ont obtenu Se = 100% et Sp = 92.9% en utilisant l'ACP et Se = 100% et Sp = 96,5% avec les RNA. Majunder et al. [Majumder *et al.*, 2005] ont développé un algorithme basé sur les SVM, en utilisant une excitation d'AF à 337 nm pour différencier l'épithélium pavimenteux sain de SCC de tissus oraux humain. Ils ont obtenu Se = 91% et Sp = 96%.

Dans notre étude, afin d'améliorer l'efficacité de discrimination HA vs D (les plus faibles), nous avons réalisé une autre approche de classification en ajoutant au jeu initial de caractéristiques spectrales choisies des caractéristiques complémentaires qui discriminent exclusivement HA vs D. Cette approche n'a pas amélioré significativement les résultats obtenus précédemment. D'autres méthodes de sélection de caractéristiques spectrales et de classification non linéaires notamment, doivent être évaluées pour améliorer ces résultats.

3.6 Conclusion du chapitre

Nous avons réalisé et validé plusieurs algorithmes de traitement de données pour le diagnostic automatisé de lésions précancéreuses sur un modèle préclinique, en utilisant une approche de spectroscopie optique multi-modalités.

Nous avons présenté une étude bibliographique des traitements des données appliqués en spectroscopie optique bimodale (AF et RD). Nous nous sommes basé sur les travaux publiés précédemment pour :

- Proposer et mettre en place une méthode de prétraitement pour les signaux spectroscopiques bimodaux (filtrage, normalisation, corrections des variations d'intensité d'excitation et de la réponse spectrale du système, etc.).
- Réaliser une sélection des données spectrales d'intérêt en trois étapes, avec :

- l'extraction de caractéristiques spectrales liées aux émissions de fluorophores spécifiques (flavines, porphyrines, etc.), à l'absorption de l'hémoglobine, à la réflexion et à la dispersion de la lumière dans des bandes spectrales spécifiques,
- l'utilisation de tests statistiques pour la sélection de plusieurs jeux de caractéristiques les plus discriminantes, à différentes distances inter-fibres, et capables de discriminer au moins 4, 5 ou 6 des six paires de classes histologiques définies,
- la réduction de la dimension des jeux de données spectrales extraites/sélectionnées en utilisant l'ACP.

Finalement nous avons évalué l'efficacité de trois algorithmes de classification supervisés linéaires (k-NN, LDA et SVM), pour discriminer les paires de classes histologiques établies (S vs HC, S vs HA, S vs D, HC vs HA, HC vs D et HA vs D) en fonction de différents nombres de k plus proches voisins (algorithme k-NN), différents nombres de composantes principales (ACP), et différentes combinaisons des modalités spectroscopiques : mono-excitation d'AF seule, multi-excitation d'AF seule, RD seule, spectroscopie bimodale (AF+RD) à une ou trois distances (271, 536 et 834 m). Les meilleurs résultats obtenus en Se et Sp sont $\approx 100\%$ en discriminant CH des trois autres classes histologiques et $> 97\%$ en discriminant S de HA et D ; les résultats les moins bons (Se $\approx 73\%$ et Sp $\approx 76\%$) ont été obtenus en discriminant HA vs D. Étant donné que la sensibilité et la spécificité sont très élevées pour la discrimination de la classe Saine des trois types de tissus hyperplasiques, d'une part, et pour la discrimination de HC vs HA et D d'autre part, la spectroscopie bimodale semble être un outil prometteur pour aider les dermatologues et les histo-pathologistes à augmenter la précision du diagnostic *in vivo* de lésions cutanées. Il est à noter que pour ces 5 paires de classes histologiques, la résolution spatiale améliore la précision et les algorithmes de classification SVM et LDA donnent de meilleurs résultats que l'algorithme k-NN. Ces résultats prometteurs permettent d'envisager le transfert de la méthode dans le cadre d'autres études sur des patients en collaboration étroite avec les cliniciens.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a permis de démontrer la capacité diagnostique de la spectroscopie bimodale (Autofluorescence AF + Réflectance Diffuse RD) résolue spatialement pour discriminer *in vivo* les états sains des états hyperplasiques cutanés.

L'étude bibliographique des différentes méthodes de spectroscopie fibrée et la présentation du cadre applicatif de l'étude décrits dans le chapitre 1 nous ont permis de préciser les problématiques technologiques et scientifiques à résoudre concernant l'instrumentation, le protocole expérimental pré-clinique et le traitement des données spectroscopiques.

La première partie de nos travaux a consisté à développer une nouvelle instrumentation de spectroscopie bimodale fibrée résolue spatialement, combinant les mesures en multiple excitation d'AF et de RD. Nous avons d'abord développé et mis en œuvre une première solution technique de multi-excitation d'AF à base de LED et de diodes LASER ; des contraintes mécaniques et de focalisation des excitations dans la fibre excitatrice nous ont obligé à envisager une autre option plus adaptée et réalisable à court terme. La seconde solution conçue et développée est basée sur une lampe à lumière blanche (Xénon), large bande et une paire de filtres passe bas et passe haut linéairement variables. Pour la focalisation du faisceau de la source dans la fibre excitatrice, deux approches optiques ont été testées ; dans la recherche d'un compromis de focalisation (taille du spot et angle d'incidence), les composants optiques retenus sont ceux qui permettent d'obtenir des puissances d'excitation acceptables pour réaliser l'AF.
La partie réception (spectromètre et sonde multi-fibres) utilise des composants validés lors de travaux précédents dans notre laboratoire.
Une interface a été développée en Visual C++, permettant de paramétrer et de contrôler le système de multi-excitation ainsi que sa synchronisation avec les acquisitions du spectromètre.

Après étude bibliographique du calibrage des instruments pour la spectroscopie fibrée, en particulier le travail de [Marín 2006], nous avons adapté une méthode de calibrage pour notre système instrumental en réalisant notamment les corrections de réponse spectrale du système, de variations d'intensité de la source d'excitation et de soustraction du courant d'obscurité.
Les points forts de notre système sont les suivants :

- La programmation successive de plusieurs excitations d'AF (entre 350 et 450 nm) et de RD (entre 350 et 800 nm) et l'ajustement précis (0,1 nm) des largeurs de bandes d'excitations (de 15 nm pour l'autofluorescence à plusieurs centaines pour la réflectance diffuse) ainsi que la longueur d'onde centrale du pic avec la même résolution,
- La résolution spatiale grâce à la modularité des combinaisons géométriques entre fibres d'excitation/réception (distances, positions) et à l'acquisition simultanée de spectres (jusqu'à 13 distances simultanément),
- La compatibilité avec une utilisation *in vivo* : acquisition de 7 spectres de fluorescence et 3 spectres de diffusion élastique à 6 distance inter-fibres en moins de 1 min.

Cet instrument développé avec un système d'excitation simple, automatisé et caractérisé métrologiquement a été validé au cours d'un protocole de mesures spectroscopiques bimodales des états sains et hyperplasiques de peau *in vivo* sur un modèle pré clinique, mené d'avril à novembre 2007.

Différents travaux sont en cours pour optimiser l'instrument développé, en particulier pour diminuer le temps d'acquisition de la totalité des spectres, augmenter les puissances d'excitation d'AF ou encore automatiser le calibrage des pics centraux des excitations.

Le système d'instrumentation, son calibrage ainsi que les résultats associés obtenus sont décrits dans deux publications dans des revues internationales [RI1][RI2][14]*, 3 communications dans des congrès internationaux [CI1][CI3][CI4]*[15] *(présentations orales) et 2 communications dans des congrès nationaux [CN1][CN2]*[16] *(présentation orale et poster).*

La deuxième partie de nos travaux a consisté à mettre en place un protocole expérimental de détection de stades précoces de cancers cutanés UV-induites sur un modèle animal (souris). Pour cette étude nous avons acquis des spectres d'intensité d'AF à 7 longueurs d'onde centrale d'excitation (360, 368, 390, 400, 410, 420 et 430 nm) et de RD (390-720 nm), à 6 distances inter-fibres (deux à 271 μm et les autres à 536, 834, 1076, 1341 μm). Ces mesures ont été ciblées sur des points anatomiques repérés à proximité de la colonne vertébrale et sur le ventre de chaque animal.
Après analyse histopathologique des sites prélevés (colocalisés avec les mesures spectroscopiques), (cf. thèse de [Amouroux, 2008]) et sur la base des caractéristiques morphologiques du derme et l'épiderme, 4 classes de référence ont pu être définies : Sains (S), Hyperplasie Compensatoire (HC), Hyperplasie Atypique (HA) et Dysplasie (D), menant à 6 combinaisons de paires histologiques à discriminer.

Au cours de ce protocole, nous avons recueilli plus de 170 000 spectres, dont près de 16% correspondent à des mesures réalisées dans les sites sélectionnés pour l'étude histopathologique. L'exploration des autres spectres est en cours, particulièrement pour étudier l'évolution temporelle des étapes de photocarcinogènese (sur un même site de mesure).

La troisième partie de nos travaux a consisté à développer différents algorithmes spécifiques pour le prétraitement, le traitement et la classification automatiques des données spectroscopiques. Les algorithmes de prétraitement incluent notamment la suppression d'artefacts, des opérations de moyennage et de filtrage et la correction de la réponse spectrale du système. Les algorithmes de traitement réalisent l'extraction et la sélection de caractéristiques spectroscopiques discriminantes et la réduction de la dimension du jeu de données par analyse en composantes principales.
Dans cette étude, nous avons comparé deux approches de classification spectroscopique. La première a été réalisée à partir d'un nombre restreint de caractéristiques extraites et nous avons testé l'algorithme k-NN en évaluant la contribution de différentes modalités spectroscopiques : mono-excitation d'AF, matrices d'excitation-émission en AF (EEMs), réflectance diffuse (RD) et couplage EEMs - RD. La seconde approche de classification a été menée en utilisant un jeu

14. Références dans la section "Production scientifique", page 1
15. Références dans la section "Production scientifique", pages 1 et 2
16. Références dans la section "Production scientifique", page 2

étendu de caractéristiques pour lequel trois algorithmes de classification (k-NN, LDA et SVM) ont été implémentés. Leurs performances ont été comparées en fonction de la résolution spatiale à 3 distances inter-fibres : 271, 536 et 834 μm.

L'efficacité finale de notre méthode diagnostique a été évaluée en termes de sensibilité (Se) et de spécificité (Sp) en fonction des caractéristiques spectroscopiques retenues et des combinaisons des diverses distances inter-fibres et des nombres de composantes principales.
Les meilleurs résultats sont : Se et Sp $\approx$ 100% pour discriminer CH vs autres ; Sp $\approx$ 100% et Se $>$ 97% pour discriminer S vs AH ou D ; Sp $\approx$ 76% et Se $\approx$ 73% pour discriminer AH vs D. Ces résultats ont été obtenus avec la seconde approche utilisant la bimodalité et la résolution spatiale qui améliorent notablement les performances pour discriminer 5 paires histologiques par rapport à la première approche ; en revanche la discrimination de la paire AH vs D n'est pas améliorée. D'autres algorithmes ont été testés afin d'améliorer la performance de classification pour discriminer HA vs D mais les résultats obtenus ne sont pas significativement meilleurs. Nous pensons que d'autres approches (en particulière non linéaires) pourraient être mises en œuvre afin d'augmenter la performance de classification de cette paire histologique.

Les résultats obtenus suggèrent que la spectroscopie bimodale résolue spatialement est un outil efficace pour discriminer *in vivo*, les états sains et bénins (S et HC) d'états précancéreux cutanés (AH et D). Enfin, notre étude a permis de poser les bases d'une méthode de diagnostic d'états précancéreux cutanés avec une instrumentation simple et compatible avec une utilisation *in vivo* associé à des algorithmes de classification performants. Pour confirmer la capacité de la méthode diagnostique établie en situation pré-clinique, des études chez l'humain sont nécessaires.

Le détail des traitements de données réalisés (prétraitements, extraction, sélection, classification) ainsi que les résultats associés obtenus ont été publiés dans deux articles en revues internationales [RI1][RI2], 1 communication dans un congrès international [CI1] (présentation orale) et 1 communication dans un congrès national [CN1] (présentation orale).

Perspectives
Plusieurs travaux sont envisagés afin d'optimiser la méthode de diagnostic spectroscopique implémentée, qui concernent deux axes importantes : l'instrumentation et le traitement des données.

Plusieurs actions sont envisagées pour améliorer le fonctionnement de l'instrumentation en termes de puissance d'excitation et de vitesse de mesure. En première instance une mise à niveau de l'instrument est proposée pour réaliser de façon automatique le positionnement des filtres d'excitation et la routine de calibrage , ainsi que la mesure de la RD sur la totalité de la bande spectrale d'intérêt en une seule fois. Il est également proposé d'améliorer le niveau d'intensité moyen des spectres mesurés en augmentant les puissances d'excitation ayant ensuite pour effet d'améliorer encore la résolution optique et le rapport signal sur bruit.

D'autres axes de travaux sont proposés pour optimiser les algorithmes de discrimination spectroscopique en termes d'automatisation des prétraitements, de vitesse de calcul et d'efficacité de discrimination de la paire HA vs D. En première instance, il est proposé une optimisation liée à la sélection des caractéristiques le plus discriminantes, une option possible étant l'utilisation d'algorithmes automatiques de sélection de caractéristiques spectrales et de classification sur la base de modèles non linéaires. Une autre voie d'amélioration possible porte sur la réalisation d'algorithmes d'évaluation et de sélection de longueurs d'onde d'excitation les plus discriminantes.

A

Article publié en revue EPJAP

Cette annexe contient l'article publié en revue international : "The European Physical Journal Appied Physics", EPJAP. "La version originale est disponible sur www.epj.org"

EPJ AP
Applied Physics
www.epj.org

Eur. Phys. J. Appl. Phys. **47**, 12707 (2009) DOI: 10.1051/epjap/2009032

Bimodal spectroscopic evaluation of ultra violet-irradiated mouse skin inflammatory and precancerous stages: instrumentation, spectral feature extraction/selection and classification (k-NN, LDA and SVM)

G. Díaz-Ayil, M. Amouroux, W.C.P.M. Blondel, G. Bourg-Heckly , A. Leroux,
F. Guillemin and Y. Granjon

EDP SCIENCES

The title "The European Physical Journal" is a joint property of EDP Sciences, Società Italiana di Fisica (SIF) and Springer

Eur. Phys. J. Appl. Phys. **47**, 12707 (2009)
DOI: 10.1051/epjap/2009032

THE EUROPEAN PHYSICAL JOURNAL
APPLIED PHYSICS

Bimodal spectroscopic evaluation of ultra violet-irradiated mouse skin inflammatory and precancerous stages: instrumentation, spectral feature extraction/selection and classification (k-NN, LDA and SVM)

G. Díaz-Ayil[1], M. Amouroux[1], W.C.P.M. Blondel[1,a], G. Bourg-Heckly[2], A. Leroux[3], F. Guillemin[1,3], and Y. Granjon[1]

[1] Centre de Recherche en Automatique de Nancy, CRAN UMR 7039 CNRS, Nancy University, 2 av. de la Forêt de Haye, 54516 Vandœuvre-lès-Nancy, France
[2] Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Cellulaire et Tissulaire, BioMoCeTi UMR 7033 CNRS, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Génopôle Campus 1, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Évry Cedex, France
[3] Centre Alexis Vautrin, 6 av. de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

Received: 1st June 2008 / Received in final form: 8 October 2008 / Accepted: 10 December 2008
Published online: 15 April 2009 – © EDP Sciences

Abstract. This paper deals with the development and application of in vivo spatially-resolved bimodal spectroscopy (AutoFluorescence AF and Diffuse Reflectance DR), to discriminate various stages of skin precancer in a preclinical model (UV-irradiated mouse): Compensatory Hyperplasia CH, Atypical Hyperplasia AH and Dysplasia D. A programmable instrumentation was developed for acquiring AF emission spectra using 7 excitation wavelengths: 360, 368, 390, 400, 410, 420 and 430 nm, and DR spectra in the 390–720 nm wavelength range. After various steps of intensity spectra preprocessing (filtering, spectral correction and intensity normalization), several sets of spectral characteristics were extracted and selected based on their discrimination power statistically tested for every pair-wise comparison of histological classes. Data reduction with Principal Components Analysis (PCA) was performed and 3 classification methods were implemented (k-NN, LDA and SVM), in order to compare diagnostic performance of each method. Diagnostic performance was studied and assessed in terms of sensitivity (Se) and specificity (Sp) as a function of the selected features, of the combinations of 3 different inter-fibers distances and of the numbers of principal components, such that: Se and $Sp \approx 100\%$ when discriminating CH vs. others; $Sp \approx 100\%$ and $Se > 95\%$ when discriminating Healthy vs. AH or D; $Sp \approx 74\%$ and $Se \approx 63\%$ for AH vs. D.

PACS. 87.64.-t Spectroscopic and microscopic techniques in biophysics and medical physics – 87.80.-y Biophysical techniques (research methods) – 07.60.-j Optical instruments and equipment

1 Introduction

Because outdoor activities and esthetic considerations (such as skin tanning) are of growing interest in western countries, fair-skinned populations have been more and more exposed to sun light in the past decades. Since solar ultra-violet (UV) radiation is the main environmental cause of skin cancer, the incidence of the three major forms of skin cancer (melanoma, squamous cell carcinoma (SCC) and basal cell carcinoma) is growing. Even though most deaths are attributable to melanoma, SCC is the most common life-threatening cancer type [1]. In dermatology, diagnosis is based on direct visualisation of the lesion. Because such observation depends on personal experience of the physician, lesions may be falsely considered benign, may not undergo biopsy, and therefore may not be subjected to the reference diagnostic gold standard i.e. histopathology [2]. Currently, full diagnosis of suspicious skin lesions implies excision-biopsy of the lesion followed by anatomo-pathological examination. Such a diagnosis process is invasive and thus implies pain, increased morbidity and substantial damage to nearby healthy skin (esthetic inconvenience). Moreover the sensitivity of this method is limited because only a few tissue samples can be biopsied in a suspicious area. Noninvasive methods such as MRI, ultrasounds and spectroscopy have the potential to eliminate these problems and also to permit the monitoring of treatment effects [3]. Optical methods (imaging and spectroscopy) in the UV-Visible – Near-Infra-Red spectral range are of particular interest because they are harmless (using the non-ionizing part of the electromagnetic spectrum) and sensitive to morphologic and functional modifications of biological tissues occurring

[a] e-mail: walter.blondel@ensem.inpl-nancy.fr

during early stages of cancer development [4]. Furthermore to improve inter-observer agreement and diagnosis' accuracy (sensitivity and specificity), optical spectroscopy can be useful by providing physicians with more objective criteria. Spectroscopy methods are based on interactions of light with biological tissues. During the past twenty years, Diffuse Reflectance (DR) and AutoFluorescence (AF) spectroscopies have been the most investigated spectroscopy modalities [4]. DR spectroscopy is based on elastic scattering of photons within biological tissues. Elastic scattering is caused by variations in the refractive index of small particles in the medium, resulting in dispersion of light in all directions, without loss of energy, i.e. no wavelength shift between incident and reflected light. Different types and sizes of scattering centers can be found within the tissue: collagen fibers, cellular membranes and subcellular structures (nuclei, mitochondria) [5]. AF spectroscopy is based on the analysis of fluorescence emission by endogenous molecules, i.e. materials that are natural constituents of biological tissues (intra or extra-cellular metabolic products). Such endogenous fluorophores are usually excited in the 300–450 spectral range. These molecules are related to the structure arrangement of cells and tissues (such as collagen, elastin, etc.) and to the cellular metabolism (such as NAD(P)H, flavins, etc.). As a result, different morphofunctional conditions of the skin related to pathologic alterations such as cancer development can be characterized using either AF, DR or both [5]. As shown in previous works [6–8], combining both modalities (DR and AF) provides a more accurate diagnosis (increased sensitivity and specificity). A typical optical spectroscopy set-up includes a light source, an optical fiber bundle (including excitation and collection fibers) put in gentle contact with the skin and a spectrometer. Optical fibers allow spectroscopy to be used not only on skin but also on less accessible anatomical sites such as hollow inner organs (bladder, oesophagus, cervix, etc.) Most optical fiber bundles are currently used with different Collection-to-Excitation Fiber Separations (CEFS) and with various geometrical configurations in order to optimize signal collection [9,10] and to probe tissues at various depths. Systems for DR spectroscopy (380–950 nm or 300–800 nm) associated to AF excitations between 300 and 500 nm have been built and used in several studies [11–13]. They were composed of an arc-lamp and a monochromator in order to get a large number of fluorescence excitation wavelengths and wide spectral range for diffuse reflectance. These systems used 7 to 46-fiber bundles and highly sensitive multi-track acquisition devices (intensified CCD). The spectroscopic set of acquired data consists in AF and DR spectra whose shape and intensity vary as a function of tissue structure and CEFS. Such a set of spectra represents a large amount of data to be reduced and analyzed. Various methods of processing spectral data were previously described. They usually include three steps:

(i) features extraction: although full spectra can be directly processed, most of the time, specific spectral features (such as areas, peak intensities, ratios, etc.) are extracted;
(ii) spectral data set reduction based on factorial analysis mostly using Principal Component Analysis (PCA);
(iii) classification based on different types of supervised and non-supervised algorithms, the latter allowing to calculate sensitivity (Se) and specificity (Sp), both being diagnostic parameters of clinical interest, with reference to histological classes. The choice of the method will influence the obtained values of sensitivity and specificity.

The aim of the current work is to assess bimodal spectroscopy's accuracy in classifying UV- irradiated mouse skin samples into four histological classes.

The objectives are threefold: (i) to develop a bimodal spectroscopy instrumentation for in vivo acquisition of AF and DR spectra from mouse skin. Since the measurement protocol lasted for several months, calibration and normalization procedures were developed to account for the system thoughput variations (light source intensity, acquisition set-up) over the 30-week period of time; (ii) to extract an extended set of a priori spectral data, then select the most discriminative ones with reference to each pair-wise discrimination; (iii) to investigate whether improvements in classification performance could be obtained using different linear classification methods (namely k-Nearest Neighbor, Linear Discriminant Analysis or Support Vector Machine).

2 Materials and methods

2.1 Bimodal multi-excitation spectroscopy set-up

Figure 1 presents a scheme of the developed multi-excitation-collection spatially resolved spectroscopic system. Source light injected in the excitation fiber (Fexc) comes from a short-arc 300W Xenon lamp with a parabolic mirror (Eurosep, France). The lamp emits mainly in the 300–800 nm spectral range. An anti-caloric filter (F1) protects optical components from heating by infra-red wavelengths. Light from the lamp is focused at the entrance of the optical excitation fiber (Fexc) using the convex lens L1. A bandpass filter F2 is used to limit the excitation spectral range to 350–450 nm in order to avoid at best the transmission of light interfering with the endogenous fluorescence emission, mainly emitting in the 450–700 nm range. The set-up consists in a dynamically-tunable excitation fluorescence system: center wavelength and Full Width at Half Maximum (FWHM) can be set thanks to the combination of linearly variable high-pass (FL1) and low-pass (FL2) filters. Both filters are fixed on translation stages (UMR 8.51, Newport) controlled by a motorized micrometric positioning system (actuators LTA-HS, 0.1 μm precision and XPS controller, Newport) used to tune excitation peaks (between 350 and 460 nm) as well as illumination bandwidths (FWHM between 15 and 25 nm) in a precise and repeatable way. For diffuse reflectance, three illumination spectral bands were selected: 365–545, 450–640 and 550–740 nm. We used a 37-optical fiber bundle (available CEFS are between 250 and 1500 μm). Up to 13 spectra can be acquired simultaneously thanks

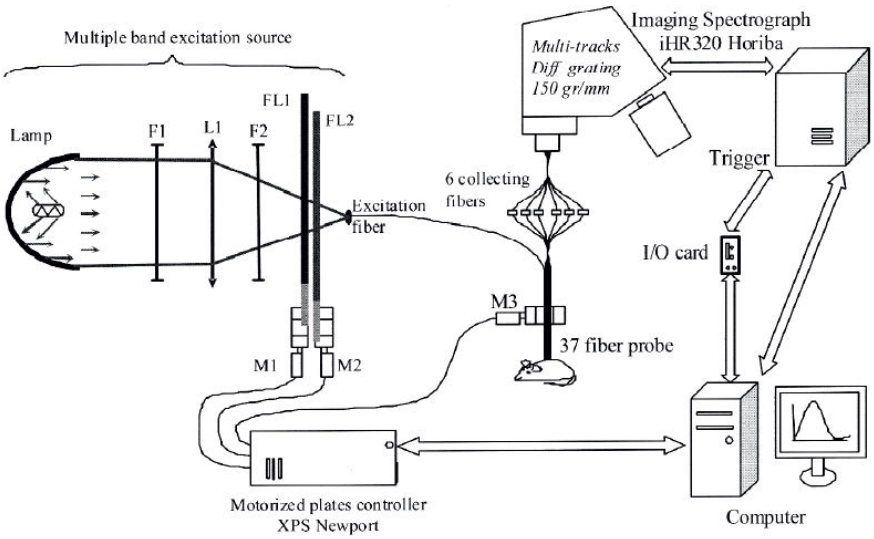

Fig. 1. Scheme of the bimodal spectroscopy device developed. Short arc lamp (300 W Xenon), F1: anticaloric filter, L1: convex lens, F2: bandpass filter, FL1 and FL2: high-pass and low-pass linearly variable filters, Fexc: exciting optical fiber, M1, M2 and M3: motorized micrometric positioning actuators used for linear displacement.

to a multi-track imaging spectrograph equipped with a UV back-illuminated CCD (iHR 320, Horiba Jobin Yvon, France) and an emission filter-wheel with various filters used to reject the backscattered excitation light. For our application, we selected 3 different CEFS: 271, 536 and 834 μm so as to probe the tissue at various depths; as mentioned by Katika et al. [14] for instance, a 250 μm-CEFS provides information from a 100 μm-depth in the skin at 442 nm. Integration times were 500 ms and 50 ms for AF and DR respectively. Spectra were all acquired using a diffraction grating (150 lines/mm) blazed at 600 nm.

A dedicated software was developed using Visual C++ 6.0 (Microsoft corporation) in order to control the translation stage displacements (for excitation peaks and bands tuning) and to synchronize the excitation system with the iHR320 spectrometer acquisition using external triggering.

The system automatically switches from each acquisition wavelength to the following one. Such a combination of procedures can be repeated as many times as required. For each excitation, 3 spectra were acquired and averaged in order to improve signal-to-noise ratio.

2.2 Skin cancer animal model and experimental protocol

The device being described in the current paper was developed in order to diagnose precancerous stages of Squamous Cell Carcinomas (SCC) which is the most lethal form of non melanoma skin cancers. Skin tumours are induced by UV-irradiation of SKH1 mice (albino and hairless). We chose this way of inducing tumours (also called "spontaneous" tumours) in order to remain as close to human etiology as possible. Twenty-eight mice were divided into three groups: group I included 8 sham-irradiated mice (control group), group II included 10 mice irradiated for 1 month (50 mJ/cm^2 weekly dose) and group III included 10 mice irradiated for 6 months (50 mJ/cm^2 once a week for the first 15 weeks then twice a week for the rest of the irradiation protocol). Mice were anesthetized with a mix of Ketamine and Xylazine during spectroscopic measurements. During the 30-week protocol, 2 mice a week were regularly euthanized and back skin was sampled. Each piece of skin was further fixed in 10% formaldehyde solution and 5 μm-slices were stained with standard Hematoxylin and Eosin (to evaluate epidermis features) and specific Weigert staining (to evaluate dermal elastic fibers). Then, based on histopathological criteria, main precancerous mouse skin stages characteristics were identified and skin samples were further classified in each of the four following classes: Healthy (H), Compensatory Hyperplasia (CH), Atypical Hyperplasia (AH) and Dysplasia (D). Such a classification was made thanks to a pathologist's evaluation of epidermis and dermis features: epidermis thickness, presence of mitosis in upper layers of epidermis, hyperkeratosis, nucleoted upper layers, heterogenous chromatin, cell layer disorganization, parakeratosis, dyskeratosis and elastosis.

Finally, the histological set of data used in the present contribution consisted of 84 healthy, 47 compensatory hyperplastic, 64 atypical hyperplastic and 57 dysplastic hyperplastic skin samples.

Colocalized AF and DR spectra were acquired on twelve spots of each mouse's back skin: six spots along the backbone on each side (left and right). Seven excitation wavelengths (360, 368, 390, 400, 410, 420 and 430 nm) were used for AF spectroscopy and three illumination bands (365–545, 450–640 and 550–740 nm) were used for

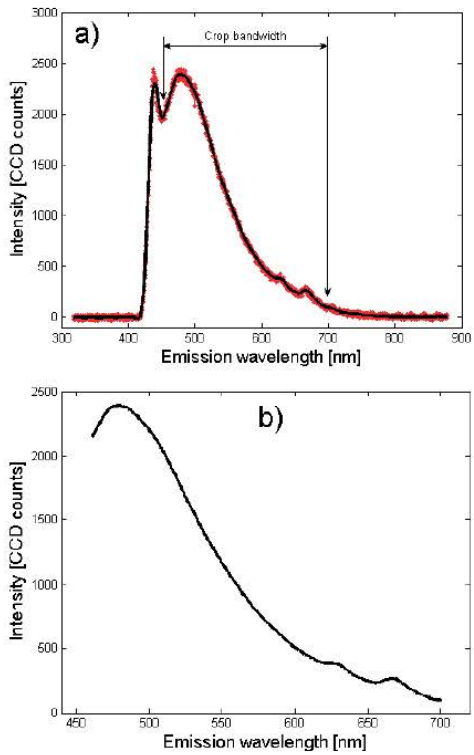

Fig. 2. (Color online) Crop bandwidth, mean and filtered AF-410 nm emission. a) mean spectra (red), filtered spectra (black); b) crop bandwidth.

DR spectroscopy. Three Collection to Excitation Fibers Separations (CEFS) were used: 271, 536 and 834 μm.

2.3 Spectral data processing

2.3.1 Preprocessing (filtering, spectral correction, normalization)

After building 3D-matrices made of three (number of CEFS) 2D-matrices of 30 intensity spectra each (7 excitations for AF and 3 DR illumination bands, $n = 3$ for each), a 6-step preprocessing was performed on raw Auto-Fluorescence (AF) spectra:

1. High amplitude narrow peak artefacts suppression: a 4 nm-width (15 points) sliding window was applied over the entire intensity spectra. Artefacts are detected based on a variance variation higher than 400% between successive windows. Then parasitic points are suppressed based on a 30 time-averaging with the previous data point.
2. The raw spectral intensity curves acquired are affected by a random measurement noise characterized by a Gaussian distribution. In order to improve the signal signal-to-noise ratio [7,15] 3 acquisitions in a raw were systematically performed then averaged ($n = 3$, maximum number compatible with acquisition time); by this way noise amplitude was reduced by 40%.
3. Residual high frequency was removed using a polynomial smooth filtering (Stavizky-Golay) [16]. The window size and order of the filter were determined for each type of spectra (AF or DR) with reference to their specific shape characteristics. A 22 nm width window (2nd order) was applied to all AF spectra and 15 to 30 nm width window (2nd order) were used for DR depending on the spectra width band. The windows widths and filter order of the implemented filters were defined in particular to smooth "correctly" the informative narrowest parts of the curves while preserving the main shape (for instance porphyrin emission peaks of width 35–40 nm visible in the 620–690 nm band, Fig. 2a).
4. The curve of a typical AF emission spectrum (Fig. 2a) acquired can be subdivided in 3 parts, the central part being the useful informative one. The lower wavelengths part may exhibit residual intensities due to the backscattered excitation light (although filtered), and no more AF signals is observed beyond 700 nm. In order to only keep the useful part of the emission spectra acquired (Fig. 2b, crop bandwidth for AF-410), we defined the following crop bandwidths of interest: 410-700 nm for AF-360 and AF-368; 460–700 nm for AF-390, AF-400 and AF-410; 463–700 nm for AF-420; 476–700 nm for AF-430; and 390–720 nm for DR.
5. The various components of the acquisition system i.e. optical probe, fibers, lenses, mirrors, diffraction gratings, CCD, have specific spectral responses which affect the shape and amplitude of the acquired spectra. Therefore a correction of the system throughput is needed and was applied thanks to a calibration lamp (HL 2000-CAL, Ocean Optics). Correction coefficients were calculated by dividing the experimentally measured calibration lamp spectrum (acquired with the same acquisition configurations as the ones that were used during mouse skin measurements) by the reference or calibrated spectrum of the lamp.
6. The excitation source (Lamp Xenon 300 W) has a relative power output that decreases with the operation time. As measurement protocol lasted for several weeks, a correction method was implemented to take this diminution into account. Source light intensity variations were taken into account thanks to power measurements at the probe tip every day at start of the experiment (Powermeter 841PE and detector UV 818-UV, Newport Corp.). Corrections were performed thanks to the division of raw spectra by the excitation light power measured on the same day of experiment.

For Diffuse Reflectance (DR) spectra, preprocessing approach was the same as the one used for AF spectra up to step # 4. In this case, once bandwidths of interest were defined, skin spectra were normalized by standard spectra acquired on a Lambertian surface (WS-1 Diffuse Reflection Standard, Ocean Optics) obtained at the shortest CEFS (271 μm).

Table 1. Spectral characteristics extracted for spectra acquired for each Autofluorescence excitation (e.g. AF-360 for the 360 nm excitation) and for DR spectra. Aera under the spectrum (A), Aera Above the spectrum (AA), Total Area (AT), Normalized Area (AN), Normalized Slope (NS), Slope (S), Ratio (R) Mean (M), Standard Deviation (SD), Median (Me), Fitting Residual (F).

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

2.3.2 Spectral features selection and data reduction

Based on our own observations of the main intensity and shape variations of acquired spectra and on previously published studies [17–23], we extracted 762 spectral features from each of the 24 spectra acquired on each skin spot (7 AF + 1 DR at each of the 3 CEFS):

- Areas: partial under the spectrum between λ_a and λ_b ($A_{\lambda a-\lambda b}$), total under the spectrum between λ_a and λ_b ($AT_{\lambda a-\lambda b}$), above the spectrum ($AA_{\lambda a-\lambda b}$), and normalized areas ($AN_{\lambda a-\lambda b}$).
- Ratio of intensities at λ_a and λ_b ($R_{\lambda a-\lambda b}$) and ratio of areas ($A_{\lambda a-\lambda b}/A_{\lambda b-\lambda c}$).
- Spectral fitting residual (F): a 10th $-$ *degree* polynomial curve was fitted on the entire spectra and residual value registered.
- Slope between λ_a and λ_b ($S_{\lambda a-\lambda b}$) and normalized slope ($NS_{\lambda a-\lambda b}$).
- Median (Me), mean (M) and standard deviation (SD) of the entire spectra.

Table 2. Number of characteristics finally selected after statistical tests using each of the CEFS combinations of spatially-resolved bimodal spectroscopy (each distance $D1$, $D2$, $D3$ and their 4 possible combinations) for spectral features that allowed a pair-wise discrimination of either 6, 5 or 4 pairs of histological skin classes.

Distance	$D1$	$D2$	$D3$	$D1$+$D2$+$D3$	$D1$+$D2$	$D1$+$D3$	$D2$+$D3$
6 pairs	6	2	5	13	8	11	7
≤5 pairs	44	59	83	186	103	127	142
≤4 pairs	83	98	125	306	181	208	223

All these spectral characteristics for AF and DR are given in detail in Table 1.

A normality Lilliefors test was implemented in order to keep (for next statistical test) only the spectral characteristics with normal statistical distribution. Then, a Student T-test was performed between all pairs of histological classes to set 3 groups of spectral features that give a pair-wise discrimination of either 6, 5 or 4 pairs of

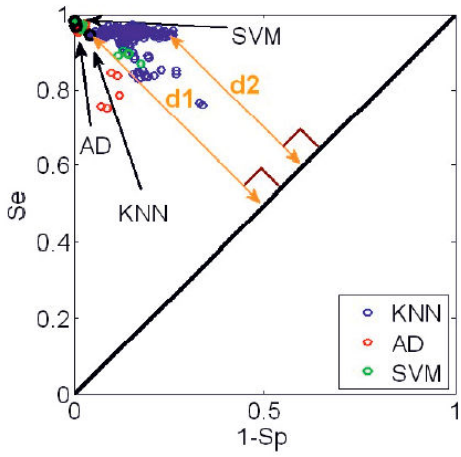

Fig. 3. (Color online) Receiver Operating Characteristic (ROC) curve. The best global diagnostic performance for the (SE, SP) couple is achieved when the data point is the furthest away from the median line.

histological skin classes (Tab. 2). Spectral features were extracted for each of the 3 CEFS: 271 ($D1$), 536 ($D2$) and 834 ($D3$) μm.

In order to test spatially-resolved bimodal spectroscopy's accuracy in discriminating either 6, 5 or 4 pairs of histological classes, we combined spectral features as indicated in Table 2: ($D1$ and $D2$), ($D1$ and $D3$), ($D2$ and $D3$) and ($D1$ and $D2$ and $D3$).

Once all the spectral features combinations were established, data were mean centered and Principal Component Analysis (PCA) was performed in order to reduce data set to a lower dimension and to provide uncorrelated data (Principal Components: PCs) for classification.

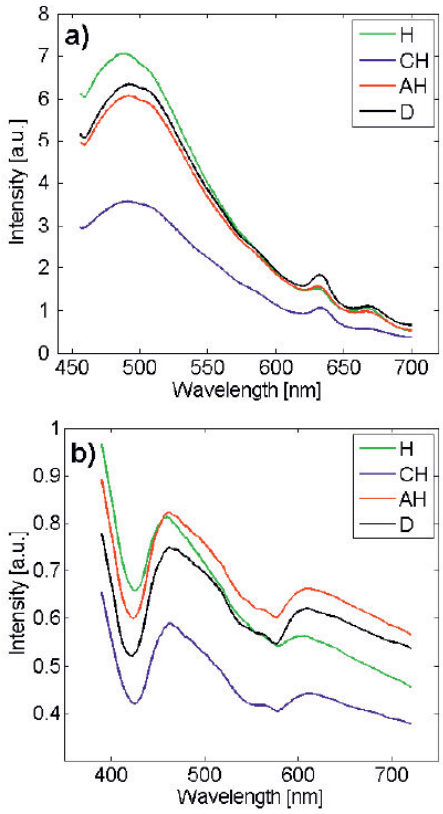

Fig. 4. (Color online) Mean preprocessed spectra acquired with the developed spectroscopy set-up at the shortest CEFS ($D1 = 271$ μm) for each of the four histological classes (H: $n = 84$, CH: $n = 47$, AH: $n = 64$ and D: $n = 57$). (a) AF spectra obtained for a 410 nm excitation. (b) DR spectra.

2.3.3 Classification

The results of three types of linear classification algorithm (k-NN, LDA and SVM) were compared. A supervised classification was performed based on the results of histological analysis. The performance of this classification was expressed in the form of Sensitivity Se (number of well classified pathologic samples) and Specificity Sp (number of well classified healthy samples) calculation. k-Nearest Neighbors (k-NN) is a simple classification method giving good results with normal and non normal populations [24]. Using the Euclidean distance measure, the distances between validation data set and the calibration data set is computed with k neighbors samples number, then each measurement in the validation set is assigned the majority class belonging to its closest k neighbors in the training set. A difficulty for this method is the determination of the appropriate k-value, this is the reason why we proposed to test a wide range of values (typically 1 to 15).

The Linear Discriminant Analysis (LDA) aims at defining a set of axes (so-called linear discriminant functions) that best represent the distances existing between groups of data with reference to their variances. This method maximizes the ratio of between-class variance to the within-class variance in any particular data set thereby guaranteeing maximal separability. It requires the data set to be normally distributed [25].

The Support Vector Machines (SVM) method applies a transformation to the data (linear or nonlinear) in a greater dimension space, then applies a linear discrimination to separate the data. The objective of SVM is to obtain an optimal separating hyper-plane that maximizes the margin between two classes in a multidimensional data space. SVM was designed to be particularly effective in developing a reliable classifier from a training set with a small sample size [26–28].

For each of the three classification methods, algorithms to discriminate the 6 pairs of histological classes (H vs. CH, H vs. AH, H vs. D, CH vs. AH, CH vs. D and AH vs. D) were developed. True positives (pathologic skin samples that were correctly classified) and true negatives ("healthy" skin samples that were correctly classified) were used to evaluate sensitivity and specificity of the classification method. In order to test the robustness

Table 3. Number of Principal Components (PCs) and nearest neighbors (K) used to evaluate k-Nearest Neighbors classification performance using each of the CEFS combinations of spatially-resolved bimodal spectroscopy (each distance $D1$, $D2$, $D3$ and their 4 possible combinations) for spectral features that allowed a pair-wise discrimination of either 6, 5 or 4 pairs of histological skin classes.

Distance	$D1$	$D2$	$D3$	$D1+D2+D3$	$D1+D2$	$D1+D3$	$D2+D3$
6 pairs	$PC = 1,2,...,5$	$PC = 1,2$	$PC = 1,2,3,4$	$PC = 1,2,...,9$	$PC = 1,2,...,6$	$PC = 1,2,...,8$	$PC = 1,2,...,5$
	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$
$\leq$5 pairs	$PC = 1,2...,19$	$PC = 1,2,...,21$	$PC = 1,2...,30$	$PC = 1,2...,53$	$PC = 1,2,...,34$	$PC = 1,2,...,42$	$PC = 1,2,...,43$
	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$
$\leq$4 pairs	$PC = 1,2...,23$	$PC = 1,2,...,33$	$PC = 1,2,...,38$	$PC = 1,2,...,70$	$PC = 1,2,...,47$	$PC = 1,2,...,52$	$PC = 1,2,...,60$
	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$	$K = 1,2,...,15$

Table 4. Number of Principal Components (PCs) used to evaluate Linear Discriminating Analysis (LDA) and Support Vector Machine (SVM) each of the CEFS combinations of spatially-resolved bimodal spectroscopy (each distance $D1$, $D2$, $D3$ and their 4 possible combinations) for spectral features that allowed a pair-wise discrimination of either 6, 5 or 4 pairs of histological skin classes.

Distance	$D1$	$D2$	$D3$	$D1+D2+D3$	$D1+D2$	$D1+D3$	$D2+D3$
6 pairs	$PC = 1,2,...,5$	$PC = 1,2$	$PC = 1,2,3,4$	$PC = 1,2,...,9$	$PC = 1,2,...,6$	$PC = 1,2,...,8$	$PC = 1,2...,5$
$\leq$5 pairs	$PC = 1,2,...,19$	$PC = 1,2,...,21$	$PC = 1,2,...,30$	$PC = 1,2,...,53$	$PC = 1,2,...,34$	$PC = 1,2,...,42$	$PC = 1,2...,43$
$\leq$4 pairs	$PC = 1,2,...,23$	$PC = 1,2,...,33$	$PC = 1,2,...,38$	$PC = 1,2,...,70$	$PC = 1,2,...,47$	$PC = 1,2...,52$	$PC = 1,2,...,60$

(generalization capacity), each algorithm was applied on 100 training and validation cycles with random selection of 66% of spectra as training set of data and the 34% left kept as the validation set of data.

k-NN algorithms were performed using several combinations of number of neighbors (k) and Principal Components (PCs accounting for up to 99% of the information contained in the original set of data) in order to get the optimum results for sensitivity and specificity. Combinations of the different numbers of k and PCs retained for each CEFS combinations tested are shown in Table 3. As shown in Table 4, PCs accounting for up to 99% were taken into account for both LDA and SVM algorithms.

The best classification accuracy achieved by each of the 378 algorithms tested (21 groups of spectral characteristics $\times$3 methods of classification $\times$6 pairs of histological classes) i.e. the optimum (Se, Sp) couple is found using a Receiver Operating Characteristic (ROC) test (see Fig. 3) that plots sensitivity as a function of (1 – specificity).

3 Results

An example of mean AF spectra for a 410 nm-excitation at the shortest CEFS ($D1 = 271$ μm) is given in Figure 4a for each histological class: H ($n = 84$), CH ($n = 47$), AH ($n = 64$) and D ($n = 56$). Significant global intensity differences can be noticed between H, CH and D on one hand and CH on the other hand. Global intensity is the highest for H, a little lower for AH and D (that are close to one another) and the lowest for CH. Focusing on the 500 nm main emission peak, AH and D display very close intensities (flavins characteristic emission). Typical porphyrins emission double peaks can be observed at 633 and 670 nm. A slight difference between D and AH is observed at the 633-nm emission peak (increased intensity for D). An example of mean DR spectra obtained at the shortest CEFS ($D1$) is given for each histological class (H, CH, AH and D) in Figure 4b. Same type of observation as for AF can be made: CH displays a significantly decreased intensity level than H, AH and D. H displays a significantly decreased intensity compared to both AH and D in the 450–700 nm spectral range, especially for wavelengths longer than 600 nm. It is to be noticed that the global spectral shape of H classified tissues is very different from the three others. Conversely, intensity and shape of AH and D mean spectra are very similar. Finally, haemoglobin absorption 577 nm-peak is deeper for CH, AH and D than for H.

Sensitivity (Se) and specificity (Sp) of pair-wise classification are given in the left and the right columns respectively of Figures 5 and 6: (a) H vs. CH, (b) H vs. AH, (c) H vs. D, (d) CH vs. AH, (e) CH vs. D, (f) AH vs. D. Each histogram displays results for the three classification algorithms (k-NN, LDA and SVM) at each of the 7 possible combinations of CEFS tested: $D1$ alone, $D2$ alone, $D3$ alone, and $D1D2D3$, $D1D2$, $D1D3$, $D2D3$.

Results in Figure 5 were obtained from a set of 13 characteristics that are common to the discrimination of the 6 pairs of histological classes. Results in Figure 6 were obtained using a set of 186 characteristics that are common to the discrimination of at least 5 pairs of histological classes out of the 6 tested.

No increase in discrimination accuracy was obtained using a more extended set of spectral characteristics (306) common to the discrimination of 4 out of 6 pairs of histological classes compared to the 186 characteristics

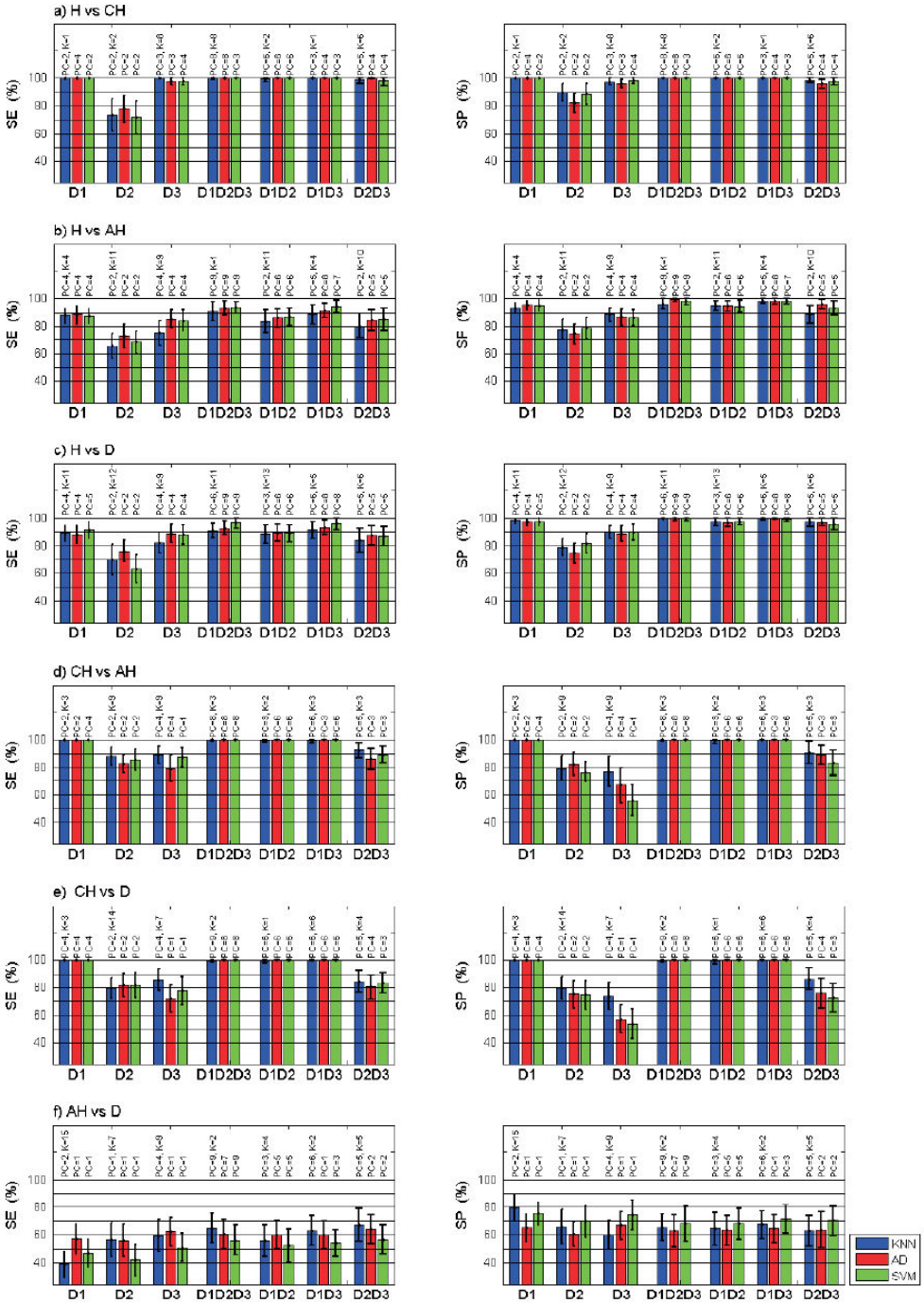

Fig. 5. (Color online) Mean sensitivity (SE) and specificity (SP) using 13 ($D1 = 6$, $D2 = 2$ and $D3 = 5$) characteristics common to the discrimination of the 6 pairs of histological classes: (a) H (healthy) vs. CH (Compensatory Hyperplasia), (b) H vs. AH (Atypical Hyperplasia), (c) H vs. D (Dysplasia), (d) CH vs. AH, (e) CH vs. D and (f) AH vs. D using several combinations of Collection to Excitation Fiber Separation (CEFS): $D1 = 271$ μm alone, $D2 = 536$ μm alone or $D3 = 834$ μm alone, or $D1D2D3$ or $D1D2$ or $D1D3$ or $D2D3$ and using each of the three classification algorithms: k-NN (k-Nearest Neighbor), LDA (Linear Discriminant Analysis) and SVM (Support Vector Machine). Error bars: standard deviation. PC and K indicated on top of each histogram correspond to the number of Principal Components (PC) and of neighbors (K) used to obtain optimum results displayed here.

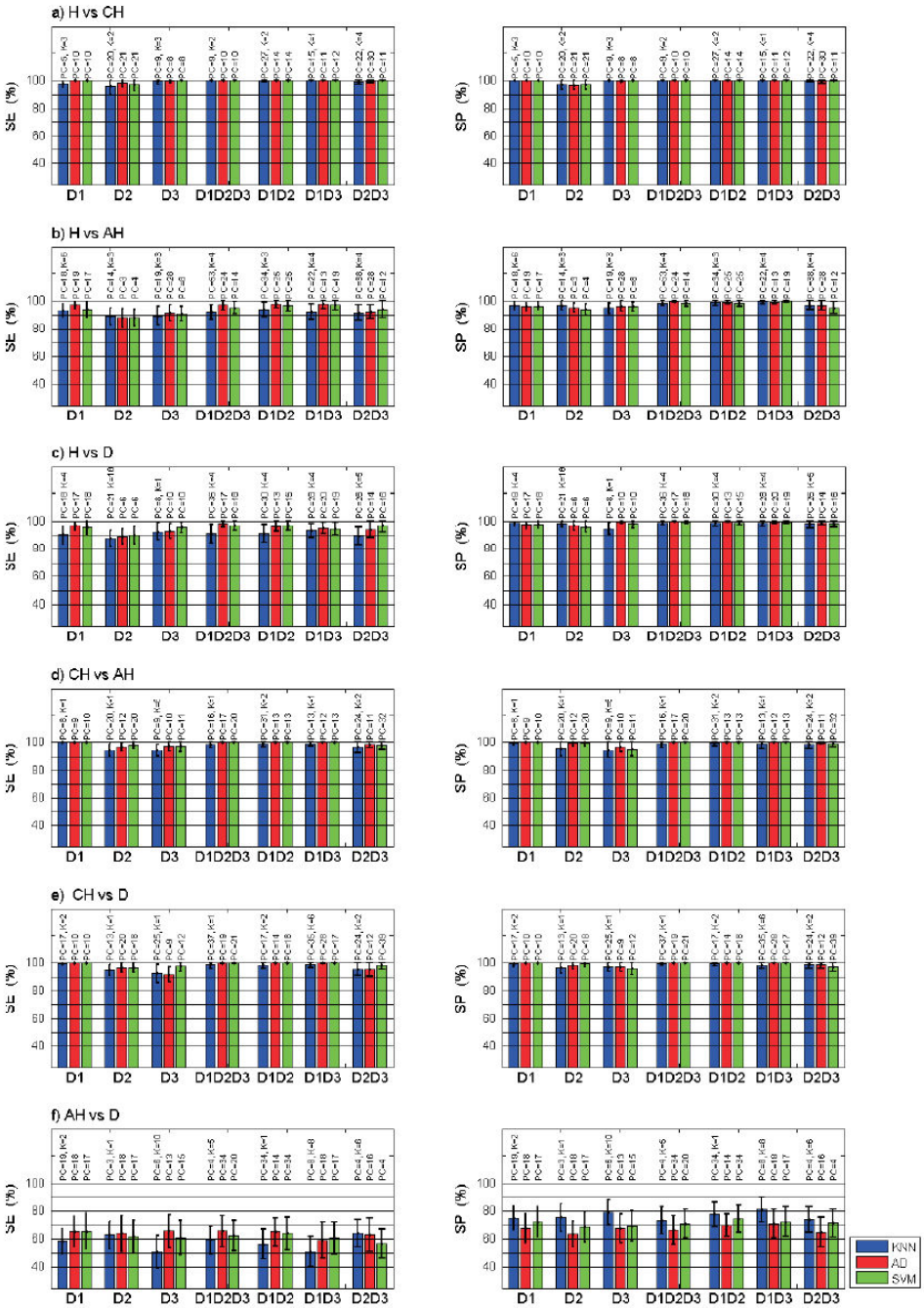

Fig. 6. (Color online) Mean sensitivity (SE) and specificity (SP) using 186 ($D1 = 44$, $D2 = 59$ and $D3 = 83$) spectral characteristics common to the discrimination of at least 5 out the 6 pairs of histological classes: (a) H (healthy) vs. CH (Compensatory Hyperplasia), (b) H vs. AH (Atypical Hyperplasia), (c) H vs. D (Dysplasia), (d) CH vs. AH, (e) CH vs. D and (f) AH vs. D using several combinations of Collection to Excitation Fiber Separation (CEFS): $D1 = 271$ μm alone, $D2 = 536$ μm alone or $D3 = 834$ μm alone, or $D1D2D3$ or $D1D2$ or $D1D3$ or $D2D3$ and using each of the three classification algorithms: k-NN (k-Nearest Neighbor), LDA (Linear Discriminant Analysis) and SVM (Support Vector Machine). Error bars: standard deviation. PC and K indicated on top of each histogram correspond to the number of Principal Components (PC) and of neighbors (K) used to obtain optimum results displayed here.

previously tested. These results are not showed in the current paper.

Using any of the classification algorithm for $D1$ and for the $D1D2D3$ combination, very high sensitivity and specificity levels are obtained (close to 100%) using 13 ($D1 = 6$, $D2 = 2$ and $D3 = 5$) spectral characteristics (Fig. 5). When discriminating H vs. AH and D, both sensitivity and specificity increase ($Se < 90\%$ and Sp close to 100%) when using the $D1D2D3$ combination. In the latter case, sensitivity is higher using the SVM algorithm than the two others. However, both sensitivity (around 65%) and specificity (<80%) are very low when discriminating AH from D. In that case, it is to be noticed that sensitivity is higher when using the k-NN method than when using the two others; however specificity is higher using $D1$ and on a global scale, SVM gives the highest results using any of the CEFS combinations.

When considering the 6 pairs of histological classes to discriminate, the $D1D2D3$ combination reaches higher scores except for the discrimination of AH and D. SVM tends to discriminate healthy (H) from any class of pathologic tissue (CH, AH and D) slightly better than k-NN and LDA algorithms. k-NN is slightly more efficient for longest CEFS in discriminating pathologic tissues from one another than LDA and SVM. Such results are always obtained for a large number of PCs, i.e. accounting for more than 99% of the information contained in the original data set.

Results using the 186 ($D1 = 44$, $D2 = 59$ and $D3 = 83$) characteristics discriminating at least 5 out the 6 pairs of histological classes are shown in Figure 6. Same types of results as the ones using 13 ($D1 = 6$, $D2 = 2$ and $D3 = 5$) characteristics are obtained when discriminating CH from any other histological class: both sensitivity and specificity get very high (close to 100%) using the $D1D2D3$ combination and any classification algorithm. Results obtained with extended sets of characteristics (Fig. 6) are better than the ones with reduced sets (Fig. 5), when considering the use of $D2$ or $D3$ alone and when considering the discrimination between H from AH and D ($Se > 95\%$ and Sp close to 100%) using the $D1D2D3$ combination. In such cases, LDA and SVM give better results than the k-NN algorithm. Compared to results obtained in Figure 5, a global increase in the discrimination accuracy is noticed when discriminating AH from D: sensitivity is the highest when using $D1$ alone, $D2$ alone or $D3$ alone and specificity is the highest when using any of the three combinations of CEFS. The highest sensitivity (65%) is obtained using $D1D2D3$ with the LDA algorithm. The highest specificity (80%) is obtained using the $D2D3$ combination using the k-NN method (better than both DA and SVM for any CEFS in this case). Neither sensitivity nor specificity is significantly increased compared to the scores obtained as plotted in Figure 5 but they are more "balanced" at each CEFS alone or in combination. Thus the overall accuracy seems better even though it remains low.

The overall classification accuracy is increased especially when discriminating H vs. AH and D, using the $D1D2D3$ combination and using an extended set of spectral characteristics (from 13 to 186). Such best results are obtained for 10 to 20 PCs i.e. accounting for 90 to 95% of the information contained in the initial set of data.

Finally, sensitivity and specificity are close to 100% for all pairs of histological classes (except for AH vs. D) using the $D1D2D3$ combination and for spectral characteristics discriminating at least 5 out of the 6 pairs of histological classes. SVM and LDA seem globally a little more efficient than k-NN. However, when discriminating AH from D, both sensitivity and specificity remain lower than 70 and 80% respectively.

4 Discussion

Our results confirm and extend other works published namely by Diagardjane et al. [19] in AF multi-excitation on chemically-induced mice skin cancers, by chang et al. [6] and Georgakoudi et al. [29] in bimodal and trimodal spectroscopies (AF multi-excitation and DR) on the cervix or by Inaguama et al. [30] in AF mono-excitation at 410 nm on human oral cancer. In these studies the authors mentioned that haemoglobin absorption peaks (≈420, 545 and 575 nm) related to progressive hyperplastic vascular activity and autofluorescence emissions related to flavins, collagen, NADH and porphyrins (≈633 and 672 nm) can be used as biomarkers to differentiate between various precancerous tissue states. More specifically, the presence of increased porphyrin intensity peaks is also associated with hyperplastic modifications implying haemoglobin transformations [31–33], or changes in the cellular environment [20]. Inaguama et al. [30] also stated that porphyrin may be continuously excreted by cancerous tissue as metabolites, therefore being found not only in advanced cancer but also in early cancer stages.

The spectral characteristics (slopes, ratios, areas, etc.) extracted and selected from our DR spectra are namely related to haemoglobin absorption peaks and those from AF spectra are related to endogenous fluorophores emission spectra of flavins, collagen, NADH and porphyrins. Looking at the averaged and standardized AF emission spectra for excitations at 390, 400, 410, 420 and 430 nm we observed that the overall intensity of the mean spectral curve in the emission band from 450 to 550 nm (related to collagen, NADH and flavins), for healthy classified spectra is higher than the one of the three other classes, for CH class is lower than the one of the other three classes, for D is slightly higher than AH ones. In the wavelength band 550 to 700 nm (related to flavins and porphyrins), the overall intensity of the mean spectral curve for CH is higher than the one of the three other classes, for H class is lower than the one of the three other classes, for AH class is slightly higher than D ones. For DR spectra acquired at distances $D1$, $D2$ and $D3$, the overall intensity of the mean spectral curve for CH classified spectra is lower than AH and D classes, for AH class is higher than CH and D classes, for D class is slightly lower than AH class. The overall intensity of the spectral curve of the

class H is very different from the three others: for $D1$ in the wavelength band 390–450 nm (haemoglobin absorption peak at 420 nm) it is higher than the 3 others; in the band 450–575 nm it is lower than AH and in the band 575–720 it is lower than AH and D. Towards $D2$ and $D3$ the overall intensity of the mean spectral curve decreases for H classified spectra: in wavelength band 390–450 it is lower than AH but of the same amplitude as D; in the band 450–720 nm it is lower than AH and D.

While two valleys related to haemoglobin absorption peaks (545 and 575 nm) are slightly visible for AF spectra acquired at distance $D1$, these valleys are more clearly visible (increased) for AF spectra acquired at distance $D3$; furthermore the emission peak intensity at 633 nm (porphyrin) is also increased for AF spectra acquired at distance $D3$. In DR spectra acquired at distance $D3$, the haemoglobin absorption peaks are increased compared to those acquired at $D1$. When the distance between excitation-reception fibers increases, the depth of skin probed increases [14], therefore absorption (in DR and AF) and porphyrin emission (in AF) increases (are more visible) for $D3$.

In a study characterizing early neoplastic changes in DMBA/TPA-induced mouse skin tumor model, using AF multi-excitation in the wavelength band 280–460 nm and LDA classification, Diagardjane et al. [19] obtained good results in discriminating different precancerous states. They defined 5 categories: category I (Healthy), category II (Inflammation and Hyperplasia), category III (Hyperplasia and Dysplasia), category IV (Moderately Differentiated Squamous Cell Carcinoma) and category V (Poorly Differentiated Squamous Cell Carcinoma). Considering classifications for categories I, II and III using excitations in the wavelength band 360–420, their results were $62.1\% < Se < 69.0\%$ and $82.2\% < Sp < 95.6\%$. In our work we focused our analysis on a refined classification within corresponding categories II and III and obtained higher Se and Sp, while only using NUV-UV excitations wavelengths higher than 360 nm (i.e. wavelengths with lowest or no mutagenic potential, in perspective of clinical implementation). Chang et al. [6] discriminated healthy (Squamous Normal, SN) vs. Low and High Grades of Squamous Intraepithelial cervical Lesions (LGSIL, HGSIL), using AF multi-excitation in the range 330–480 nm and DR spectroscopies, in combination with PCA and Mahalanobis distance algorithm. Several pairs of discrimination were defined (SN vs. CN, SN vs. LGSIL, SN vs. HGSIL, CN vs. LGSIL and CN vs. HGSIL). Considering classification of discrimination pairs with SN and LHSIL using AF multi-excitation and DR, their results were $53\% < Se < 95\%$ and $69\% < Sp < 91\%$. Although our work concerns another type of epithelium, we proposed here a refined classification of normal and low grades lesions into 4 subclasses (H, CH) and (AH, D). Our results are globally higher with Se and $Sp > 95\%$ and a lowest discriminating capability for AH vs. D with $Sp \approx 74\%$ and $Se \approx 63\%$.

Our results (Se and $Sp \approx 100\%$ for CH vs. others; $Sp \approx 100\%$ and $Se > 95\%$ for H vs. AH or D; $Sp \approx 74\%$ and $Se \approx 63\%$ for AH vs. D are also in good agreement with various works that have used classification techniques like SVM or Artificial Neural Networks (ANN). Lin et al. [26] developed an algorithm based on SVM (linear and non linear), using AF excitations at 405 and 436 nm for discriminating normal and cancerous nasopharyngeal tissues. They achieved $Se = 94\%$ and $Sp = 97\%$ using linear SVM and $Se = 95\%$ and $Sp = 99\%$ with non linear SVM. PCA can substantially reduce the complexity of an SVM algorithm without sacrificing the performance of the algorithm. But when they combined PCA and SVM methods, these algorithms produced the same results. Nayak et al. [34] developed algorithms based on PCA and ANN, using pulsed laser-induced autofluorescence at 325 nm excitation for discriminating normal, premalignant and malignant human oral tissues. They achieved $Se = 100\%$ and $Sp = 92.9\%$ using linear PCA and $Se = 100\%$ and $Sp = 96.5\%$ with ANN. Majunder et al. [35] developed an algorithm based on SVM, using AF excitation at 337 nm for discriminating healthy squamous vs. early SCC human oral tissues. They achieved $Se = 91\%$ and $Sp = 96\%$.

Finally, in order to improve the discrimination efficiency of AH vs. D (lowest discriminating capability with $Sp \approx 74\%$ and $Se \approx 63\%$), we carried out classification by adding more characteristics which exclusively discriminate AH vs. D to the set of spectral characteristics selected. This approach did not improve significantly the previous results achieved. New methods of nonlinear spectral characteristics selection and nonlinear classification algorithms are to be tested to further investigate increased performance for AH vs. D classification.

5 Conclusion

A simple and tunable instrumentation was developed to acquire both AF and DR spectra in a bimodal approach at several CEFS and applied to monitor healthy to precancerous evolution in vivo of skin mice due to chronic UV-irradiation. Bimodal spectroscopy's accuracy in discriminating four classes of mouse skin histological stages was evaluated. Various sets of spectral characteristics (extracted from the spectral intensity curves) were selected based on statistical discrimination of the pair-wise classes. After data reduction by PCA results obtained with three classification algorithms were compared. Since both sensitivity and specificity are very high when discriminating healthy from any type of hyperplastic tissue on one hand and CH from AH and D on the other hand, bimodal spectroscopy seems a promising tool to help dermatologists and histopathologists to increase diagnostic accuracy of skin lesions. However lowest diagnostic accuracy was achieved when discriminating AH from D using any of the three linear classification algorithm we tested. It is to be noticed that for these 5 pairs of histological classes, spatial resolution improves classification accuracy and SVM and LDA give better results than the k-NN algorithm. Further studies need to be done to confirm these results on human patients.

This work was supported by the French association *Ligue Contre le Cancer* (CD 52, 54), Nancy-University, the Region Lorraine and the Programme Alβan, the European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America, scholarship No. E05D057651MX.

References

1. M. Takata, Int. J. Clin. **10**, 391 (2005)
2. M. Rajeswari, Lab. Invest. **83**, 1279 (2003)
3. J. Oh, J. Biomed. Opt. **11**, 032034 (2006)
4. I. Bigio, Phys. Med. Biol. **42**, 803 (1997)
5. V. Tuchin, *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics* (SPIE, Bellingham, USA, 2002), pp. 675–724
6. S. Chang, J. Biomed. Opt. **10**, 024031 (2005)
7. D. Veld, Lasers Surg. Med. **36**, 356 (2005)
8. I. Georgakoudi, Gastroenterology **120**, 1620 (2001)
9. U. Utzinger, J. Biomed. Opt. **8**, 121 (2003)
10. C. Zhu, J. Biomed. Opt. **10**, 024032 (2005)
11. J. Tunnell, Technol. Cancer Res. Treat. **2**, 505 (2003)
12. R. Zangaro, Appl. Opt. **35**, 5211 (1996)
13. A. Zuluaga, Appl. Spectrosc. **53**, 302 (1999)
14. K. Katika, Appl. Opt. **45**, 4174 (2006)
15. D. Veld, J. Biomed. Opt. **9**, 940 (2004)
16. N. Marín, J. Biomed. Opt. **11**, 014010 (2006)
17. E. Péry, Ph.D. thesis, Institut National Polytechnique of Lorraine, 2007
18. V. Wallace, Phys. Med. Biol. **45**, 735 (2000)
19. P. Diagardjane, Lasers Surg. Med. **37**, 382 (2005)
20. S. Balasubramanian, Carcinogenesis **16**, 2461 (1995)
21. B. Murphy, J. Biomed. Opt. **10**, 064020 (2005)
22. N. Marín, Gyneco. Oncol. **99**, S116 (2005)
23. S. Kamath, J. Biomed. Opt. **12**, 014028 (2007)
24. D. Peña, *Análsis de datos multivariantes* (McGraw-Hill, Madrid, 2002)
25. N.H. Timm, *Applied multivariate analysis* (Springer, New York, 2002)
26. W. Lin, J. Biomed. Opt. **9**, 180 (2004)
27. C. Burges, Data Min. Knowl. Discov. **2**, 121 (1998)
28. V.N. Vapnik, *The nature of statistical learning theory*, 2nd. edn. (Springer-Verlag, New York, Inc., 2000)
29. I. Georgakoudi, Am. J. Obstet. Gynecol. **186**, 374 (2002)
30. M. Inaguma, Cancer **86**, 32201 (1999)
31. Y. Yang, Lasers Surg. Med. **7**, 528 (1987)
32. Z. Malik, Cell Differentiation **8**, 223 (1979)
33. T. Nishisaka, J. Jpn Soc. Laser Med. **16**, 11 (1995)
34. G. Nayak, Biopolumers **82**, 152 (2006)
35. S. Majumder, Lasers Surg. Med. **36**, 323 (2005)

To access this journal online:
www.edpsciences.org

B

Article publié en revue JBO

Cette annexe contient l'article publié en revue international : "Journal of Biomedical Optics", JBO. "La version originale est disponible sur www.spie.org"

Journal of Biomedical Optics 14(1), 014011 (January/February 2009)

Classification of ultraviolet irradiated mouse skin histological stages by bimodal spectroscopy: multiple excitation autofluorescence and diffuse reflectance

Marine Amouroux
Gilberto Díaz-Ayil
Walter C. P. M. Blondel
Nancy-University
Centre de Recherche en Automatique de Nancy
CRAN UMR 7039 CNRS
2 avenue de la Forêt de Haye
54516 Vandoeuvre-les-Nancy cedex
France

Geneviève Bourg-Heckly
Université Pierre et Marie Curie Paris 6
Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Cellulaire et Tissulaire
BioMoCeTi UMR 7033 CNRS
Genopole Campus 1, 5 rue Henri Desbruères
91030 Evry cedex
France

Agnès Leroux
Alexis Vautrin Cancer Center
Avenue de Bourgogne
54511 Vandoeuvre-les-Nancy, cedex
France

François Guillemin
Nancy-University
Centre de Recherche en Automatique de Nancy
and
Alexis Vautrin Cancer Center
Avenue de Bourgogne
54511 Vandoeuvre-les-Nancy, cedex
France

Abstract. Histopathological analysis and *in vivo* optical spectroscopy were used to discriminate several histological stages of UV-irradiated mouse skin. At different times throughout the 30-week irradiation, autofluorescence (AF) and diffuse reflectance (DR) spectra were acquired in a bimodal approach. Then skin was sampled and processed to be classified, according to morphological criteria, into four histological categories: normal, and three types of hyperplasia (compensatory, atypical, and dysplastic). After extracting spectral characteristics, principal component analysis (data reduction) and the *k*-nearest neighbor classifying method were applied to compare diagnostic performances of monoexcitation AF (based on each of the seven excitation wavelengths: 360, 368, 390, 400, 410, 420, and 430 nm), multiexcitation AF (combining the seven excitation wavelengths), DR, and bimodal spectroscopies. Visible wavelengths are the most sensitive ones to discriminate compensatory from precancerous (atypical and dysplastic) states. Multiexcitation AF provides an average 6-percentage-point increased sensitivity compared to the best scores obtained with monoexcitation AF for all pairs of tissue categories. Bimodality results in a 4-percentage-point increase of specificity when discriminating the three types of hyperplasia. Thus, bimodal spectroscopy appears to be a promising tool to discriminate benign from precancerous stages; clinical investigations should be carried out to confirm these results. © *2009 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers.* [DOI: 10.1117/1.3077194]

Keywords: autofluorescence spectroscopy; diffuse reflectance; photocarcinogenesis; squamous cell carcinoma; skin cancer; *in vivo* diagnosis.

Paper 08157RR received May 13, 2008; revised manuscript received Nov. 25, 2008; accepted for publication Nov. 25, 2008; published online Feb. 12, 2009.

1 Introduction

Skin cancer is the most prevalent cancer among fair-skinned populations.[1] Two main types of skin cancerous lesions originate from cells found in the epidermis (the skin epithelium): keratinocytic tumors and melanocytic tumors.[2] The former type of lesion is the most common one, and among this type, squamous cell carcinoma (SCC) is the most dangerous cancer because it metastasizes in up to 7.4% of cases.[3] The best chance to fully cure SCC is to excise the tumor during its first stages of development before dermis invasion, where the vascularization network starts. The so-called "first stages" include precancerous (e.g., actinic keratosis) and *in situ* (e.g., Bowen's disease) stages. Thus, detecting these early stages is of paramount interest for clinical diagnosis. Ideally, this detection would be as specific and sensitive as possible. A survey of general practioners found that 30% had no confidence in correctly triaging skin lesions; 22% of cancers would not have been biopsied or referred, while benign lesions would have been wrongly biopsied or referred 34% of the time.[4] False-negative diagnoses may result in further growth of a lesion, making it too extensive for surgical resection. A delayed diagnosis may even allow for metastasis to occur, possibly with fatal consequences. False-positive diagnoses result in unnecessary procedures, patient inconvenience and stress, increased morbidity, and substantial additional costs.[4]

Several diagnostic techniques are currently under study (biopsy techniques, molecular markers, ultrasonography, confocal microscopy, spectroscopy, fluorescence imaging, electrical impedance, etc.), but the noninvasive techniques are particularly well adapted to everyday clinical practice since they give the clinician a chance to follow the evolution of lesions and give immediate information. Among them, dermoscopy is

Address all correspondence to: Walter C. P. M. Blondel, PhD, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, CRAN UMR 7039 CNRS-Nancy University, 2 avenue de la Forêt de Haye, 54516 Vandoeuvre-les-Nancy, France. Tel: +33383595638; Fax: +33383595644; E-mail: walter.blondel@ensem.inpl-nancy.fr.

1083-3668/2009/14(1)/014011/14/$25.00 © 2009 SPIE

the most widespread technique in everyday practice. In dermoscopy, the lesion is examined with a 10× to 100× magnification lens placed directly against skin to which immersion oil has been applied for index matching. However, dermoscopy of keratinocytic lesions is still in its infancy, because no consensus regarding diagnostic criteria has been established.[1] Furthermore, such a technique is still based on visual appreciation, and therefore depends on the physician's personnal experience. That is why *in vivo* optical spectroscopy (also called "optical biopsy") is a potentially helpful technique because it may provide physicians with quantitative, i.e., more objective, criteria. To assess spectroscopy's ability to detect *in vivo* precancerous skin stages, the entire carcinogenesis in an animal model must be followed because it is the only way to obtain tissue sampling from each carcinogenesis stage. Two ways of inducing carcinogenesis have been widely described: chemically induced (using dimethyl benz(a)anthracene–tetradecanoylphorbol-13-acetate DMBA-TPA application)[5] and UV-induced[6] carcinogenesis of mouse skin. However, Pentland et al. showed that models to test chemoprevention strategies must specifically consider cancer etiology in their design.[7] The main etiological factor for SCC is UV solar (often referred to as "actinic") radiation.[8] Therefore, we chose to study skin neoplastic changes of UV-irradiated SKH1 (hairless and albinos) mice throughout the entire carcinogenesis.

UV radiation is a complete carcinogen, i.e., it is responsible for cancer induction, promotion, and progression. The typical UV-induced DNA damage is the generation of dimeric photoproducts between adjacent pyrimidine bases. Tumor suppressor gene p53 is a common target of UV-induced mutations. A proliferative advantage of p53 mutant keratinocytes over normal keratinocytes results in neoplastic transformation.[9] DNA damage also arises spontaneously from endogenous chemicals produced during metabolism, oxidative stress, and chronic inflammation.[10] In preclinical studies, exposure of murine skin to UV radiation for 30 weeks aimed to first induce an acute inflammation, followed by an unresolved or "chronic" inflammation that resulted in continuous exposure of tissue to activated immune cells. Such cells secrete soluble mediators that result in excessive tissue remodeling, loss of tissue architecture, and enhanced risk for development of neoplastic tissue states.[11] Most importantly, the recognition that a given tissue abnormality is associated with cancer development does not necessarily imply that all cancers at that site will develop from such lesions. Indeed, validation of cancer precursors as intermediate endpoints for cancer development is challenging, since tissue sampling necessarily interrupts or alters the natural course of the neoplastic process. In such cases, spectroscopy also can be a useful tool of investigation.

In the current study, autofluorescence (AF) spectroscopy and diffuse reflectance (DR) spectroscopy, alone and in combination, were investigated as noninvasive techniques to discriminate different stages of UV-irradiated mouse skin. The diagnostic efficiency of each technique has been studied separately on a wide variety of organs, but Chang et al.,[12] Breslin et al.,[13] and Georgakoudi et al.[14] showed that combining the two techniques in a "bimodal" approach improved the diagnostic accuracy of cervical, breast, and esophagus cancer, respectively. To the best of our knowledge, only one study has been published on both spectroscopic and histological evaluations of mouse skin carcinogenesis; the main result of this study was that AF spectroscopy using several excitation wavelengths discriminated early stages of chemically induced SCC with improved classification accuracy compared to single-wavelength excitation.

The aim of our study was twofold: (1) establish histopathological criteria to classify different stages of UV-irradiated murine skin: compensatory, atypical, and dysplastic hyperplasia; and (2) compare the accuracy (sensitivity and specificity) of monoexcitation AF, multiexcitation AF, DR, and bimodal spectroscopies in discriminating pairs of histological classes thanks to a reduced set of selected spectral characteristics.

2 Materials and Methods

2.1 *Tumor Model*

This experiment was approved by the French Ethical Commitee on Animal Experimentation. Twelve-week-old SKH1 female mice (Charles River Laboratories, France) were divided into two groups. The first group included 8 sham-irradiated mice (control group), and the second group included 20 UV-irradiated mice. UV irradiation was provided by a bank of eight fluorescent tubes (TL/12, Philips, The Netherlands) set into a UV research unit (Daavlin, Belgium) emitting mainly in the UVB range (50% of the emission in the 290 to 320-nm spectral range). Mice were irradiated with a fluence of 3 mW/cm^2, 23 cm away from the lamps, for 20 seconds each time. The dose was controlled using an integrated dosimeter. The mice were kept in a small cage placed each time at the same place underneath the UV research unit in order to deliver as homogenous a dose as possible to all the mice.

Irradiation was performed once a week during the first 15 weeks, then twice a week during the last 15 weeks. Irradiation was always performed at least two days before spectroscopic measurements to avoid an acute reaction bias of spectroscopic measurements. Ten mice were euthanized after one month of irradiation and ten others after six months of irradiation to sample acute and chronic UV-induced skin modifications, respectively.

2.2 *Experimental Protocol*

The mice were anesthesized with a mix of ketamine (110 mg/kg, Panpharma, France) and xylazine (11 mg/kg, Rompun, Bayer, France) for a 75-minute immobilization. They were placed on a 35 °C heated blanket underneath the optical fiber probe that was fixed on a motorized stage to control the probe's angle (90 deg) and pressure repeatability on the skin [Fig. 1(a)]. The probe was put in gentle contact with the skin. An experimental protocol was developed to ensure that spectroscopic measurements and histological evaluations were obtained from the same tissue site. Since tattoo ink is a light absorber and the needles used to tattoo the skin could modify the skin's microscopic morphology, a plastic pattern was used to localize the measurement sites. As shown in Figs. 1(a) and 1(b), two rows of six holes each were perforated into the pattern; then the pattern was adhered to each mouse's back to ensure that spectroscopic measurements were performed every 5 mm in a row. Once spectroscopic measurements were done, the beginning of each six-point row was tattooed to mark the beginning of length measurements on histological slides [Figs. 1(b) and 1(c)]. Within six hours of

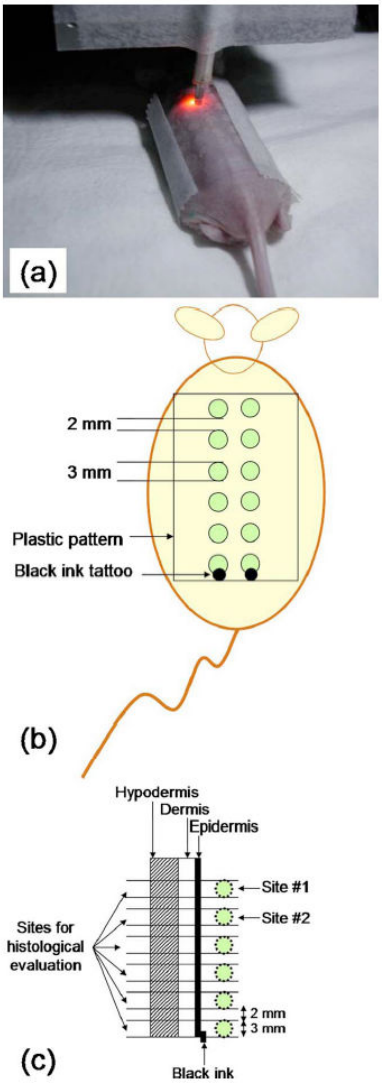

Fig. 1 (a) An anesthesized mouse on the heated blanket during spectroscopic measurement. The optical fiber probe was put in gentle contact with the skin through a plastic pattern stuck on the mouse's back to localize spectroscopic evaluation spots. (b) Schematic of the plastic pattern dimensions and black ink tattoo used to localize each 6-spot row along the backbone. (c) Schematic showing the method used to localize histological evaluation sites.

spectroscopic measurements, the mice were euthanized by performing cervical dislocation. Within 10 minutes of death, the back skin was excised. To prevent the skin from shrinking, each piece of skin was held on a polystyrene lump with needles. The skin was further fixed in a formaldehyde solution before embedding in paraffin. Then 5-μm slices were stained with standard hematoxylin and eosin (H&E) for histological classification based on epidermis morphological features. Dermal elastic fibers were also stained using Weigert specific staining.

2.3 *Histological Classification*

Hyperplasia is defined as an increase in the size of a tissue or organ due to an increase in the number of cells. It may be physiologic, compensatory, or pathologic.[10] We performed a two-step classification. The first step to discriminate a hyperplastic from a nonhyperplastic skin epidermis. To do so, we needed to first determine a normal (N) epidermis thickness range. Since skin does not display the same thickness on the whole body surface, we determined a normal thickness range for each spot number, i.e., for each anatomical location from a mouse's neck to tail along the backbone. The epidermis thickness of spot #y (y=1, 2, 3, 4, 5, or 6) on UV-irradiated mice was then compared to the epidermis thickness of the corresponding spot #y on sham-irradiated mice, thus taking into account physiological variations. Thickness measurements were performed on 10×- to 100×-magnified images acquired via a microscope (Axioskop, Zeiss, Germany) equipped with a CCD camera (DXC-390P, Sony, Japan). Image acquisition software (Tribvn ICS, Tribvn, France) and data processing software (Osiris, Digital Imaging Unit of the Geneva Hospital, Switzerland) were used. A Gaussian distribution of the data set was checked, then the normal range was defined according to what is commonly recommended for data having a Gaussian distribution: mean $\pm 2\times$ standard deviation (SD).[15] The epidermis of a specific spot was classified as hyperplastic if its thickness was above the "mean$+2\times$SD" cutoff value.

Since atypical and dysplastic hyperplasias (AH and D) are true cancer precursors, whereas compensatory hyperplasia (CH) is not,[10] discriminating CH from AH and D is of utmost medical value. That is why the second step of our classification method aimed at classifying hyperplastic skin samples into the CH, AH, and D histological classes. Atypia is defined as an abnormal cellular proliferation in which there is a loss of normal architecture and orientation.[10] Histological features of skin dysplasia are given by Kumar et al.:[16] because skin dysplasia is usually the result of chronic exposure to sunlight and is associated with the buildup of excess keratin, these lesions are called actinic keratoses. The dermis contains thickened blue-gray elastic fibers (elastosis), a probable result of abnormal dermal elastic fiber synthesis by sun-damaged fibroblasts within the superficial dermis. The stratum corneum is thickened and, unlike normal skin, nuclei in the cells are often retained (a pattern called "parakeratosis"). Table 1 displays the morphological features on which we based our classification of hyperplastic samples in one of the three classes. All the criteria were evaluated by a pathologist. Three fields of view (FOV) were examined from each sample. A sample was assigned to a class only if classifications of the three FOV were consistent with one another. If they were not consistent, then the sample was discarded from histological classification.

2.4 *Spectroscopy and Statistical Analysis Methods*

Figure 2 shows the spectroscopy instrumentation developed to acquire spatially colocalized AF and DR spectra. A fiber probe made of 200-μm core diameter optical fibers was used. One of these fibers was chosen as the excitation fiber and another was chosen to collect AF and backscattered light at a 271-μm collecting to excitation fiber separation (CEFS). The spectrometer was an iHR320 spectrograph (Horiba Jobin Yvon,

Table 1 Morphological features used to classify skin samples into the three different classes of hyperplasia (CH, AH, and D). ⊕: feature that must be found to classify the sample into the corresponding histological class, ⊗: additional features that may be found as well. Sham-irradiated mice were considered normal (N) and used as negative cortrols. Histological features displayed by SCC were used as positive controls.

	Normal (N)	Compensatory hyperplasia (CH)	Atypical hyperplasia (AH)	Dysplasia (D)	Bowen's disease/SCC
Thickened epidermis		⊕	⊕	⊕	⊕
Mitosis in upper layers		⊗	⊗	⊗	⊗
Hyperkeratosis		⊗			
Nucleoted upper layers			⊕	⊕	⊕
Heterogenous chromatin			⊕	⊕	⊕
Cell layer disorganization			⊕	⊕	⊕
Parakeratosis				⊗	⊕
Dyskeratosis				⊗	⊕
Elastosis				⊗	⊕

France) including a back-illuminated CCD detector that could attain a spectral resolution better than 5 nm in the 350- to 800-nm spectral range.

Our goal was to construct a tunable multiexcitation source based on a short-arc 300 W xenon lamp, remotely software-controlled. The source also needed to be capable of generating adjustable center wavelengths and bandwidths and of automatically switching from one excitation wavelength to the other [for AF spectroscopy: seven excitation wavelengths at 360, 368, 390, 400, 410, 420, and 430 nm, with a full width at half maximum (FWHM) of 15 nm] and from one illumination band to the other (for DR spectroscopy: 365 to 545, 450 to 640, and 550 to 740 nm to cover the UV-visible range) in a series of sequential steps. For this purpose, we used bandpass linear filters (LVF series, Ocean Optics) composed of a long-pass filter and a short-pass filter (respectively referred to as FL1 and FL2 in Fig. 2). Both filters were fixed on motorized translation stages, and wavelength tuning was achieved by sliding the filters with respect to each other using a programmable motorized micropositioning system. The motorized stages slid on a 45-mm-long bench that limited their excursion, resulting in a maximal transmitted bandwidth of 190 nm. The three illumination bands resulted from this mechanical limitation: 3×45 mm were needed to cover the UV-

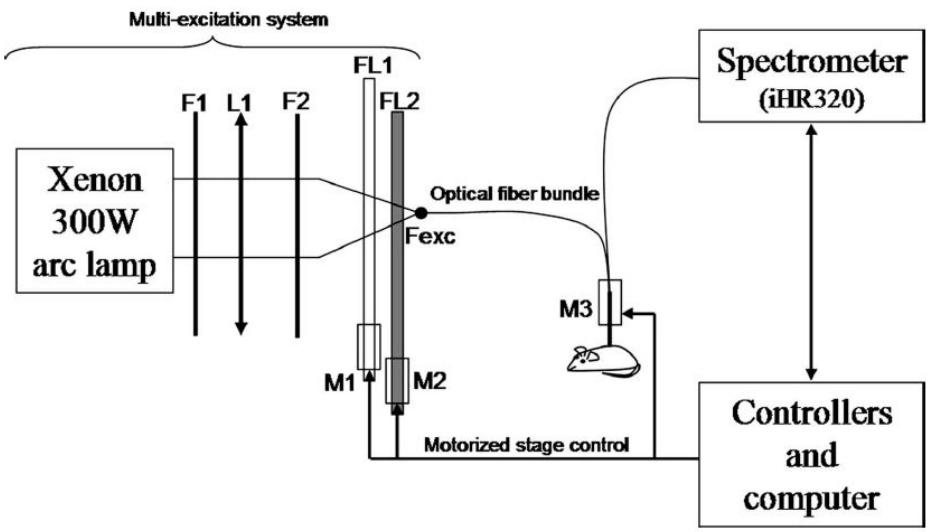

Fig. 2 Schematic diagram of the bimodal spectroscopy system used to acquire mouse skin spectra *in vivo* using a short arc lamp (300-W xenon). F1: anticaloric filter; L1: convex lens; FL1 and FL2: high-pass and low-pass linearly variable filters; Fexc: excitation optical fiber; M1, M2, and M3: motorized micrometric translation stages.

Table 2 Spectral features (19 for AF and 4 for DR) used for spectra classification. Total energy is the sum of all spectra intensities in the (λ_i-λ_j) bandwidth. Area ratio is the ratio between the sum of intensities in the (λ_i-λ_j) bandwidth and the sum of intensities in the (λ_j-λ_k) bandwidth. Peak ratio is the ratio of intensities at λ_m and λ_n. Slope is the slope between the intensities at λ_p and λ_q.

Autofluorescence (AF)			
λ_{exc} (nm)	Total energy (a.u.)	Area ratio	Peak ratio
360	$A_{410-700}$	$A_{410-459}/A_{459-700}$	
368	$A_{410-700}$	$A_{410-470}/A_{470-700}$	
390	$A_{460-700}$	$A_{460-545}/A_{545-700}$	$R_{740/634}$
400	$A_{461-700}$	$A_{461-550}/A_{550-700}$	$R_{485/633.5}$
410	$A_{460-700}$	$A_{460-542.5}/A_{542.5-700}$	$R_{492/633}$
420	$A_{462.5-700}$	$A_{462.5-550}/A_{550-700}$	$R_{505/633}$
430	$A_{476-700}$	$A_{476-585}/A_{585-700}$	$R_{507/633}$
Diffuse reflectance (DR)	Total energy	Slope	Peak ratio
	$A_{390-720}$	$S_{580-600}$	$R_{423/577}$
		$S_{615-720}$	

visible spectral range. The reflectance signal was extracted from the spectral ranges for which filter transmission was at maximum, resulting in the following three partly overlapping selected bands: 390 to 490 nm (illumination band #1), 490 to 590 nm (illumination band #2), and 590 to 720 nm (illumination band #3). Then these three bands were simply concatenated. The DR signal in each band was obtained by dividing the raw signal acquired *in vivo* on mouse skin by the signal acquired on a Lambertian surface (WS-1 diffuse reflection standard, Ocean Optics). Such reference spectra were collected every day before starting the experiment. This normalization accounted for the nonuniform spectral response of the acquisition system and for variations of the light-source intensity over the 30-week period.

For AF spectroscopy, spectra were recorded as a whole over the entire acquisition spectral range. In order to reject skin backscattered excitation light, three different long-pass filters were used with the following cutoff wavelengths: 400 nm for 360- and 368-nm excitation wavelengths; 435 nm for 390- and 400-nm excitation wavelengths; and 455 nm for 410-; 420-, and 430-nm excitation wavelengths. AF spectra were corrected for the nonuniform spectral response of the acquisition system using a radiometric calibration source (HL-2000, Ocean Optics). A correction factor was calculated by dividing the HL-2000 experimentally acquired spectrum by the calibration spectrum, then used to correct spectra measured on mouse skin. Variations of the light source intensity were taken into account by measuring excitation intensity at the probe tip using a calibrated photodiode (818-UV, Newport Research Corp.) prior to each experiment. Raw acquired AF spectra were divided by the excitation light power. Fluorescence data from a single measurement spot are represented as an excitation-emission matrix (EEM). Columns of the matrix spectra correspond to emission spectra at each excitation wavelength.

Our spectroscopic statistical analysis was a three-step process: (1) spectral features extraction, (2) data reduction, and (3) classification. As shown in Table 2, 19 spectral features and 4 spectral features, respectively, were extracted from AF and DR spectra that were acquired on each skin sample (resulting in 23 spectral features when the two modalities were combined for the bimodal approach). The spectral parameters were selected to be sensitive to the intensity and spectral shape modifications induced by neoplastic transformation. The total area under the spectrum between λ_i and λ_j ($A_{\lambda i\text{-}\lambda j}$) was related to the global backscattered intensity (DR) and emission intensity (AF). Area ratios were $A_{\lambda i\text{-}\lambda j}/A_{\lambda j\text{-}\lambda k}$. Slopes were between λ_p and λ_q ($S_{\lambda p\text{-}\lambda q}$), and peak ratios λ_m and λ_n ($R_{\lambda m/\lambda n}$) were related to the spectral shape. For the case of area ratios ($A_{\lambda i\text{-}\lambda j}/A_{\lambda j\text{-}\lambda k}$) extracted from AF emission intensity spectra: (1) λ_i was chosen as the shortest wavelength from which the emission signal recorded was considered to be no longer affected by any residual backscattered excitation light; (2) λ_j was the wavelength at which spectra from two different histological classes "naturally" crossed when normalized to unitary surface under the curve; and (3) λ_k was chosen as the longest wavelength that still provided significant AF signal from the fluorescence spectrum tail.

The large number of features was reduced by applying principal component analysis (PCA). This linear transformation technique employed for the dimensionality reduction of the parameter space allowed us to represent most of the information from the original data set in the first few uncorrelated principal components (PCs).[17] When data reduction was done, a *k*-nearest neighbor (*k*-NN) method was used to build the

Table 3 Number of PCs and nearest neighbors (k) tested for each of the four spectroscopic modalities: monoexcitation AF, multiexcitation AF, DR, and bimodality (DR+multiexcitation AF).

Monoexcitation AF				
360, 368 nm	390, 400, 410, 420, 430 nm	Multiexcitation AF	DR	DR+multiexcitation AF
PCs=1,2.	PCs=1,2,3.	PCs=1,2...,7.	PCs=1,2,3,4.	PCs=1,2...,10.
k=1,2,...15.	k=1,2,...,15.	k=1,2,...,15.	k=1,2,...,15.	k=1,2,...,15.

algorithm for classification of spectra in one of the following classes: N, CH, AH, and D. The k-NN method classifies an unknown sample into the class that has the most similar or "nearest" sample points in the training set of data. Euclidean distance was used to measure the distance between points. In this case, we randomly chose 66% of spectra in each histological class as the training set of data. Then any new sample from the validation data set was classified as N, CH, AH, or D by comparing it with the standard models fore each of the four classes.

The algorithm accuracy to classify samples was expressed through two parameters: sensitivity (Se) and specificity (Sp). Sensitivity was defined as the number of samples classified as pathological by statistical analysis divided by the number of pathological samples determined as such by histology. Specificity was defined as the number of samples classified as normal by statistical analysis divided by the number of normal samples determined as such by histology. When the two histological classes to be discriminated were two pathological classes, the less advanced state in the carcinogenic process was used as the "normal" sample. For instance, when discriminating between AH and D, AH was chosen as "normal" and D as "pathological" in the definitions above. To obtain an optimal value of the (Se, Sp) couple, we studied the influence of the number of neighbors ($1<k<15$) and of PCs on Se and Sp for each modality (Table 3) when discriminating the six pairs of histological classes. Since the first few PCs usually accounted for most of the total variance of the original data set, and the goal was to obtain optimum classification results with as few PCs as possible, the classification algorithm was performed using only 7 and 10 PCs for multiexcitation AF and bimodality, respectively, accounting for 99% of the variance of the original data set. In the case of monoexcitation AF and DR used alone, since at most four or fewer spectral features were extracted, 100% of the PCs were used.

3 Results and Discussion

3.1 *Histology*

Because of inter-individual variable response to UV radiation, we decided to classify skin samples exclusively according to histological evaluation and not according to irradiation dose or exposure duration. Figure 3 and Table 4 show the cutoff values (maximum normal epidermis thickness) used to define hyperplasia. Any UV-irradiated epidermis displaying a thickness value above such "normal" thresholds was considered hyperplastic. A Student's t-test was performed to compare mean thickness values between anatomical spots #1 [mouse head, Fig. 4(a)] and #6 [mouse tail, Fig. 4(b)] and showed that the difference in mean epidermal thickness was significantly different with a level of significance $p=0.0006<0.05$. This emphasizes how important it is to base histological comparison of normal and irradiated skin on corresponding anatomical locations, especially in our case, where epidermis thickness was one of the criteria used to define hyperplasia.

Each class of hyperplasia was characterized by qualitative features relative to the epidermis and dermis observed in stained histological sections. At the beginning of UV exposure (the first three to six weeks of exposure), skin displayed cell proliferation that attempted to regenerate the tissue, leading to a compensatory type of hyperplasia (CH). A thickened epidermis as well as a thickened keratin layer (hyperkeratosis) could be observed [Fig. 4(c)], but neither cytological (cell nuclei and layer organization still look normal) nor structural (normal dermal elastic fibers) carcinogenic features were displayed [Fig. 5(a)]. After six months of UV exposure, skin not only became hyperplastic, but it also displayed cancerous characteristics. We distinguished two types of cancerous characteristics relative to nuclei and keratin maturation, respectively. The first type (heterogenous chromatin, mitosis, cell layer disorganization) were related to the AH class. The second type [parakeratosis, Fig. 5(b); dyskeratosis, Fig. 5(c), and elastosis, Fig. 5(d)], appearing in addition to nuclei modifications, were related to the D class. Using the classification criteria defined in Table 1, the 224 mice skin samples were classified as follows: 84 N, 47 CH, 37 AH, and 56 D.

We used SCC that developed on a few mice to check that the sampling protocol allowed a precise match of spectroscopic measurements and histological evaluations. As shown in Fig. 6, SCC appears as a macroscopic abnormal growth on

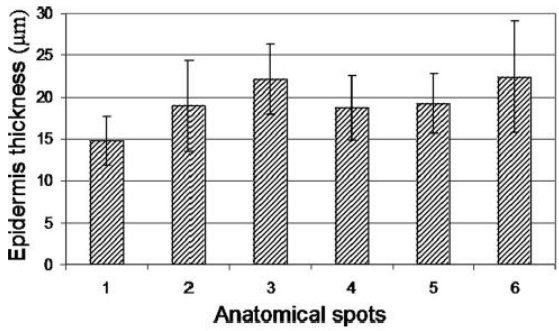

Fig. 3 Histogram showing mean (n=160) normal epidermis thicknesses of sham-irradiated mice for the six anatomical spots. Error bars represent ±1SD.

Table 4 Normal epidermis cutoff values [defined as mean (n=160)+2 SD] used to define hyperplasia for each anatomical spot (spot #1 is toward the mouse's neck and spot #6 is towards the mouse's tail) to account for physiological variations of epidermis thickness along the backbone.

Anatomical spot number	1	2	3	4	5	6
Mean epidermis thickness+2SD (μm)	21	29	30	27	27	40

mouse's skin [Fig. 6(a)] on spot #5 of spectroscopic measurement. The abnormal growth shown in Fig. 6(b) and further identified as a SCC by histology can also be located on spot #5 of the histological slide. Thus histological classification was provided for each of the corresponding spot of spectroscopic measurements.

3.2 *Spectroscopy and Statistical Analysis Results*

Figures 7(a)–7(d) show the EEMs (mean values) obtained for each histological class respectively: N, CH, AH, and D. Figure 8 displays 410-nm monoexcitation AF (a) and DR (b) mean spectra for each histological class. As expected, AF emission spectra exhibit characteristic flavins and keratin (410-nm excitation, 510-nm emission) as well as porphyrins (410-nm excitation, double-peak emission at 633 and 672 nm), while DR spectra exhibit characteristic hemoglobin absorption peaks (420, 542, and 577 nm). It should be noted that such spectra are obtained for a 271-μm CEFS.

The aim of our spectroscopic classification was to determine Se and Sp for discrimination of the four histological classes using (1) monoexcitation AF spectroscopy alone based on each of the seven excitation wavelengths, (2) multiexcitation AF spectroscopy based on a combination of the seven excitation wavelengths, (3) DR spectroscopy alone, and (4) a combination of DR and multiexcitation AF spectroscopies (bimodal spectroscopy). We performed a pair-wise comparison: normal versus each type of hyperplasia (N versus CH, N versus AH, and N versus D) and each type of hyperplasia versus

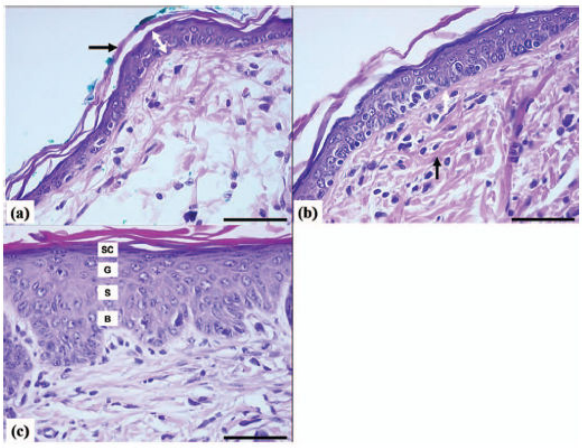

Fig. 4 Representative microscopic images of H&E stained histological sections of mouse skin. (a) Sham-irradiated spot #1 displays the epidermis (delimited by the white arrow) and keratin on top of the epidermis (black arrow). (b) Sham-irradiated spot #6 displays basement membrane (white arrow) and dermal collagen fibers (black arrow). The epidermis is significantly thickened compared to spot #1. (c) Spot #6 after 1 month of UV irradiation: SC: stratum corneum; G: granulous layer; S: spinous layer; B: basal cell layer. The epidermis is significantly thickened compared to sham-irradiated spot #6. Scale bar: 50 μm.

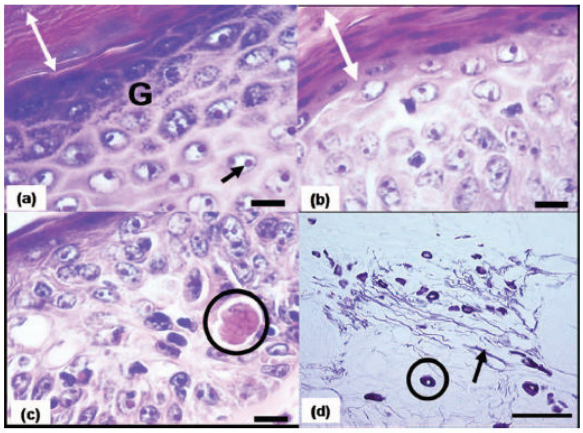

Fig. 5 Representative microscopic images of H&E (a, b, c) and Weigert (d) stained histological sections of mouse skin after (a) 1 month of UV irradiation; and (b, c, d) after 6 months' UV irradiation. Images display the morphological epidermis and dermis features used to classify skin samples in each of the three histological classes (CH, AH, D). (a) Compensatory hyperplastic epidermis featuring thickened epidermis (above normal cutoff values), hyperkeratosis (white arrow), normal keratin maturation (G, granulous layer), organized cell layers, and chromatin confined within nuclei (black arrow). (b) Dysplastic epidermis featuring keratin dysmaturation (parakeratosis: white arrow, and no visible granulous layer), cell layer disorganization, and heterogenous nuclei chromatin. (c) Dysplastic epidermis featuring dyskeratosis (black circle). (d) Dermis displaying elastosis (black arrow: short and thick elastic fibers) and chronic inflammation (circle: mast cell). Scale bars: 10 μm (a, b, c) and 50 μm (d).

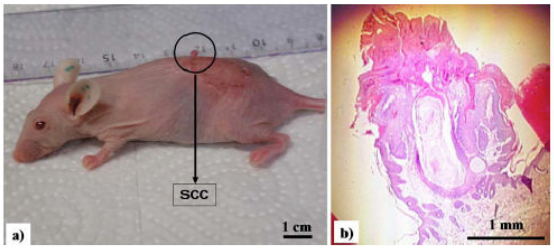

Fig. 6 Matching of (a) anatomical spectroscopic measurement spots, and (b) histological evaluation sites.

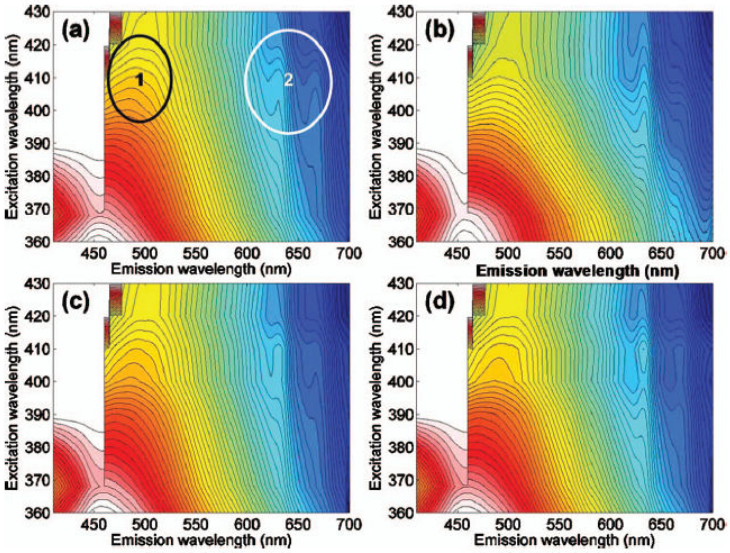

Fig. 7 Mean EEMs from multiexcitation AF spectroscopy of (a) normal, (b) compensatory hyperplastic, (c) atypical hyperplastic, and (d) dysplastic mouse skin. Areas attributable to flavins and keratin (1) as well as porphyrins (2) are circled.

one another (CH versus AH, CH versus D, and AH versus D).

3.2.1 *Monoexcitation AF spectroscopy*

Focusing of AF spectroscopy, results concerning Se and Sp are summarized in Figs. 9(a) and 9(b), respectively. When discriminating CH from each of the other three histological classes (N, AH, and D), the longer wavelengths (visible wavelengths, i.e., all wavelengths except for 360 and 368 nm) reach higher sensitivity values than the shorter ones (360 and 368 nm). Compensatory states are at low risk to evolve into SCC; therefore, the use of visible wavelengths should help to reduce the number of unnecessary procedures. Such visible wavelengths achieve their lowest sensitivity level (around 50%) when discriminating between N and AH. It can be hypothesized that the keratin layer plays an important role in AF spectral discrimination. Indeed, N and AH are the only two classes that usually display no abnormally thick keratin layer, whereas CH may display hyperkeratosis and D often displays parakeratosis. The keratinized layer absorbs and scatters the excitation light, thus reducing its penetration into deeper layers. This effect can be seen in Fig. 8, where CH, characterized by the thickest keratin layer (hyperkeratosis), exhibits a much lower average fluorescence intensity than all other classes.

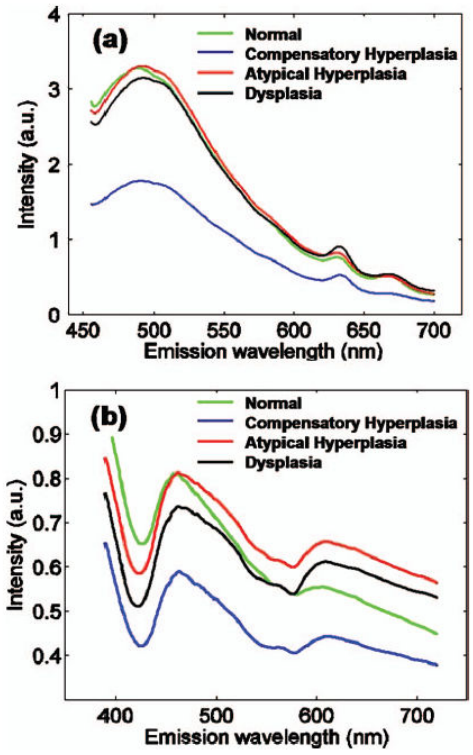

Fig. 8 Mean (a) AF spectra at 410-nm excitation, and (b) DR spectra obtained for each histological class (N, CH, AH, and D).

Based on information from several studies that investigated fluorescence of keratin and keratinizing layers from various tissues,[18–21] it is most likely that keratin fluorescence is involved in our results concerning AF spectral discrimination. However, its precise role is difficult to determine, because the AF signal results from the overlap of various fluorophores located at different depths. A tentative explanation that accounts for the better sensitivity achieved using visible rather than UV wavelengths (360 and 368 nm) when discriminating CH from each of the other three histological classes (N, AH, and D) would be as follows: the keratin layer plays a shielding role, most pronounced in UV, reducing the excitation of other fluorophores in the epidermis (NADH) and dermis (collagen, elastin), which are spectral markers of neoplastic transformation. Under UV excitation, the observed AF signal is a mixture of NADH, collagen, and keratin emissions with a high contribution of keratin possibly blurring the differences in spectral signatures due to other fluorophores.

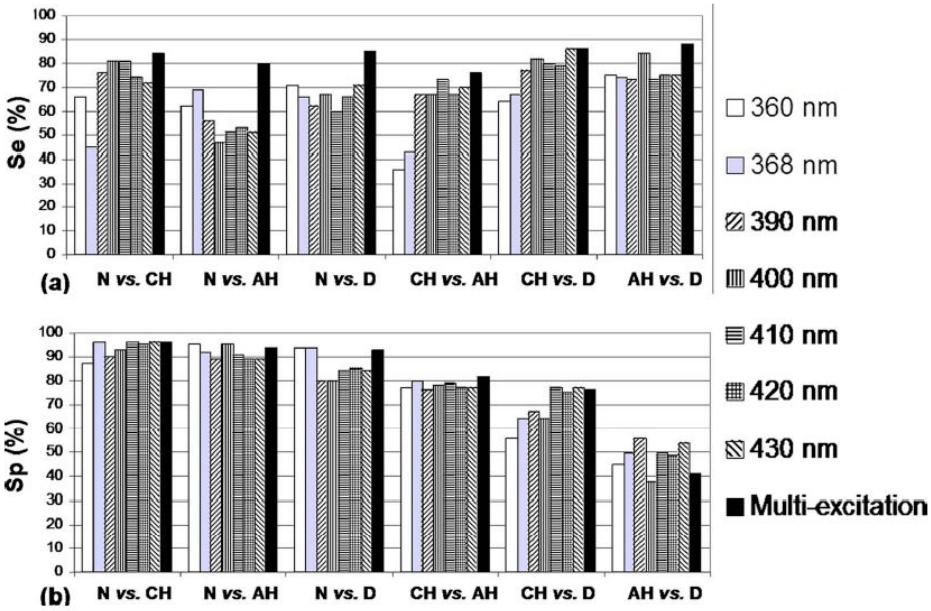

Fig. 9 Average (a) Se and (b) Sp achieved by monoexcitation (for each of the seven excitation wavelengths) and multiexcitation AF spectroscopy for the discrimination of the six pairs of histological classes.

Using either monoexcitation or multiexcitation AF, a drastic decrease in Sp can be observed in Fig. 9(b) when discriminating between AH and D compared to all other pair-wise comparisons. Such a low Sp might be explained by the close histological characteristics of these two classes (see Table 1).

3.2.2 *Multiexcitation AF spectroscopy*

As shown in Fig. 9(a), multiexcitation AF always provides higher Se compared to any single excitation wavelength, resulting in an average 6 percentage points increased Se over all pairs of histological classes. Conversely, Sp [Fig. 9(b)] is not improved by multiexcitation (except for CH versus AH: +2 percentage points): Sp remains higher than 92% when discriminating between normal skin and the three types of hyperplasia (CH, AH, and D) but drastically decreases when discriminating the three types of hyperplasia from one another (82%, 76%, and 41%, respectively, for each pair of histological classes).

3.2.3 *DR spectroscopy*

As shown in Fig. 10, DR spectroscopy is somewhat more sensitive (+5.6 percentage points) when discriminating the three types of hyperplastic tissues from one another (75.3% average sensitivity over the three pairs of histological classes: CH versus AH, CH versus D, and AH versus D) than when discriminating normal skin from any type of hyperplasia (69.7% over the three pairs of histological classes: N versus CH, AH, and D, respectively). Due mainly to the low Sp achieved when discriminating AH from D (46%), a drastic fall of Sp (−24 percentage points) is observed when discriminat-

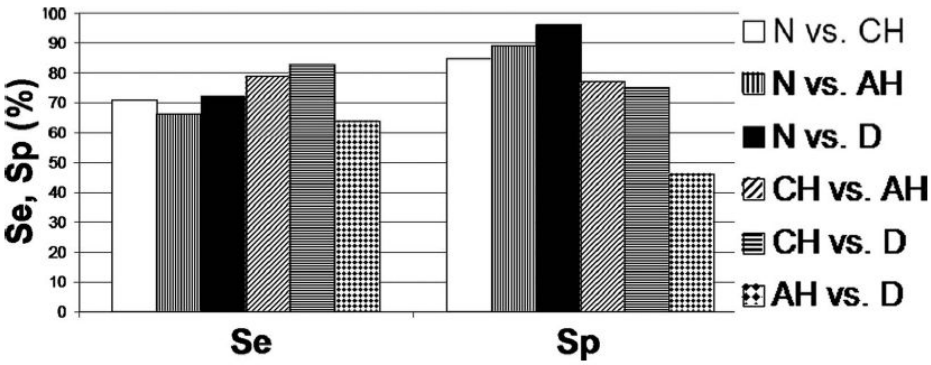

Fig. 10 Average Se and Sp achieved by DR for each pair of histological classes.

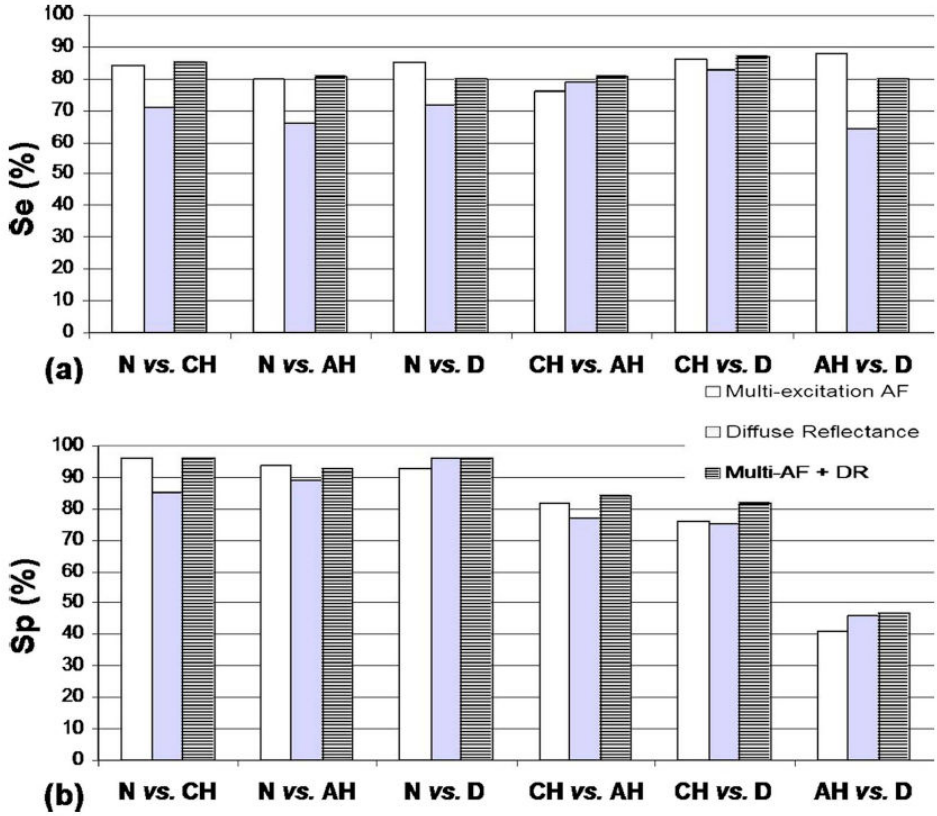

Fig. 11 Average (a) Se and (b) Sp of multiexcitation AF (white), DR (grey), and bimodal spectroscopy (multiexcitation AF+DR: dash) when discriminating each pair of histological classes.

ing the three types of hyperplasia from one another (average Sp of 66% over the three pairs of histological classes). Indeed, the Sp achieved when discriminating normal tissue from each type of hyperplasia is as high as 90% (average Sp over the three histological classes).

3.2.4 *Multiexcitation AF, DR, and bimodality*

A comparative analysis between the diagnostic performances of multiexcitation AF alone, DR alone, and bimodal spectroscopies can be seen in Fig. 11. If we were to select only one modality on the basis of sensitivity results, multiexcitation AF would be selected. Indeed, on average, over the six pairs of histological classes to discriminate, multiexcitation AF was the most sensitive modality with an average sensitivity of 82%, which is +1 and +10 percentage points compared to bimodality and DR used alone, respectively. Bimodality is most interesting when considering Sp. It is either as specific or more specific than multiexcitation AF and DR used alone over all pairs of histological classes (except for N versus AH: 94% and 93% for multiexcitation AF and bimodality, respectively). Even though Sp remains low, bimodality slightly improves Sp (+4 percentage points) when discriminating the three types of hyperplasia from one another, and achieves a 71% Sp compared to 66% for both multiexcitation AF and DR used alone (average over the three pairs of histological classes).

To evaluate the global diagnostic performance and taking into account both Se and Sp as a function of the numbers of k and PCs, we used a receiver operating characteristic (ROC)

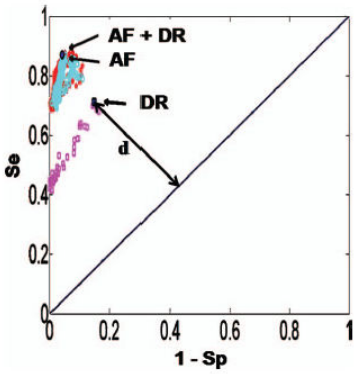

Fig. 12 ROC plot showing how the optimum classification accuracy couple (Se and Sp) is determined for each spectroscopic modality: blue data cluster, AF; pink, DR; and red, bimodality (DR+AF). The current plot illustrates the determination of the optimum (Se, Sp) couple for the discrimination of N and AH using DR; the data point that is the farthest away at distance d is kept as the optimum classification result.

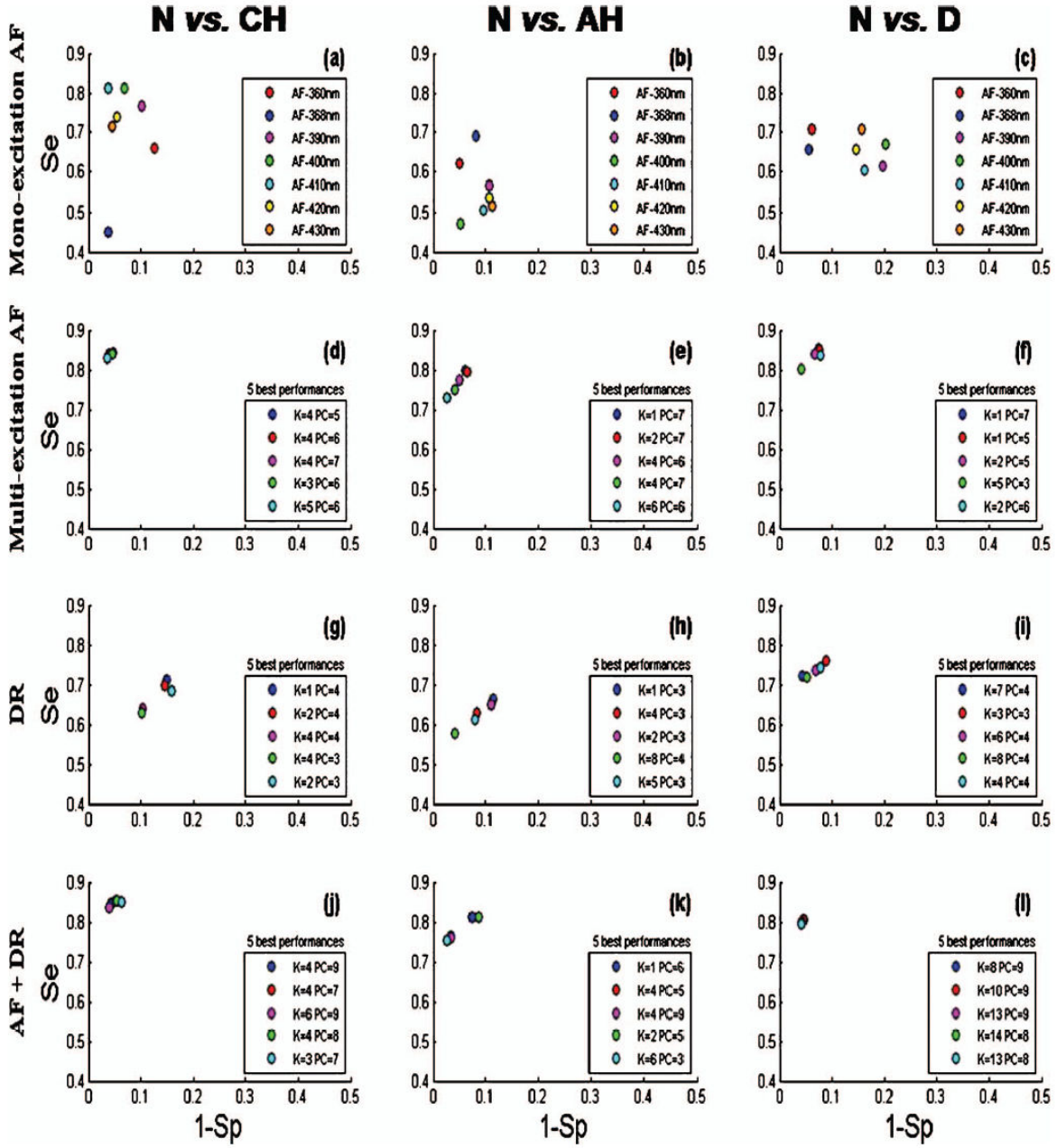

Fig. 13 ROC curves for the discrimination between N mouse skin and the three types of hyperplasia (CH, AH, D). First row (a, b, and c) shows monoexcitation AF spectroscopy with the optimum (Se, Sp) couple displayed for each excitation wavelength (red, 360 nm; dark blue, 368 nm; pink, 390 nm; green, 400 nm; light blue, 410 nm; yellow, 420 nm; and orange, 430 nm). Second row (d, e, and f) shows multiexcitation AF with the best five classification performances displayed with corresponding numbers of neighbors (*k*) and PCs (dark blue, red, pink, green, and light blue). Third row (g, h, and i) shows DR with the same color coding as above. Fourth row (j, k, and l) shows bimodality, i.e., multiexcitation AF +DR, with the same color coding as above. In (1), the points are very close and nearly superposed.

representation.[22] We evaluated the best combination of Se and Sp corresponding to the data point that was the furthest away from the median line, as shown with distance *d* in Fig. 12. Figures 13 and 14 display ROC representations for each of the four spectroscopic modalities (corresponding to each row of Figs. 13 and 14) and for each pair of histological classes (corresponding to each column of Figs. 13 and 14). For every case, all the combinations of numbers of PCs and nearest neighbors were tested to determine which ones achieved the best diagnostic accuracy, i.e., the optimum [Se, Sp] couple. The best five performances are indicated for each pair-wise analysis in Figs. 13 and 14.

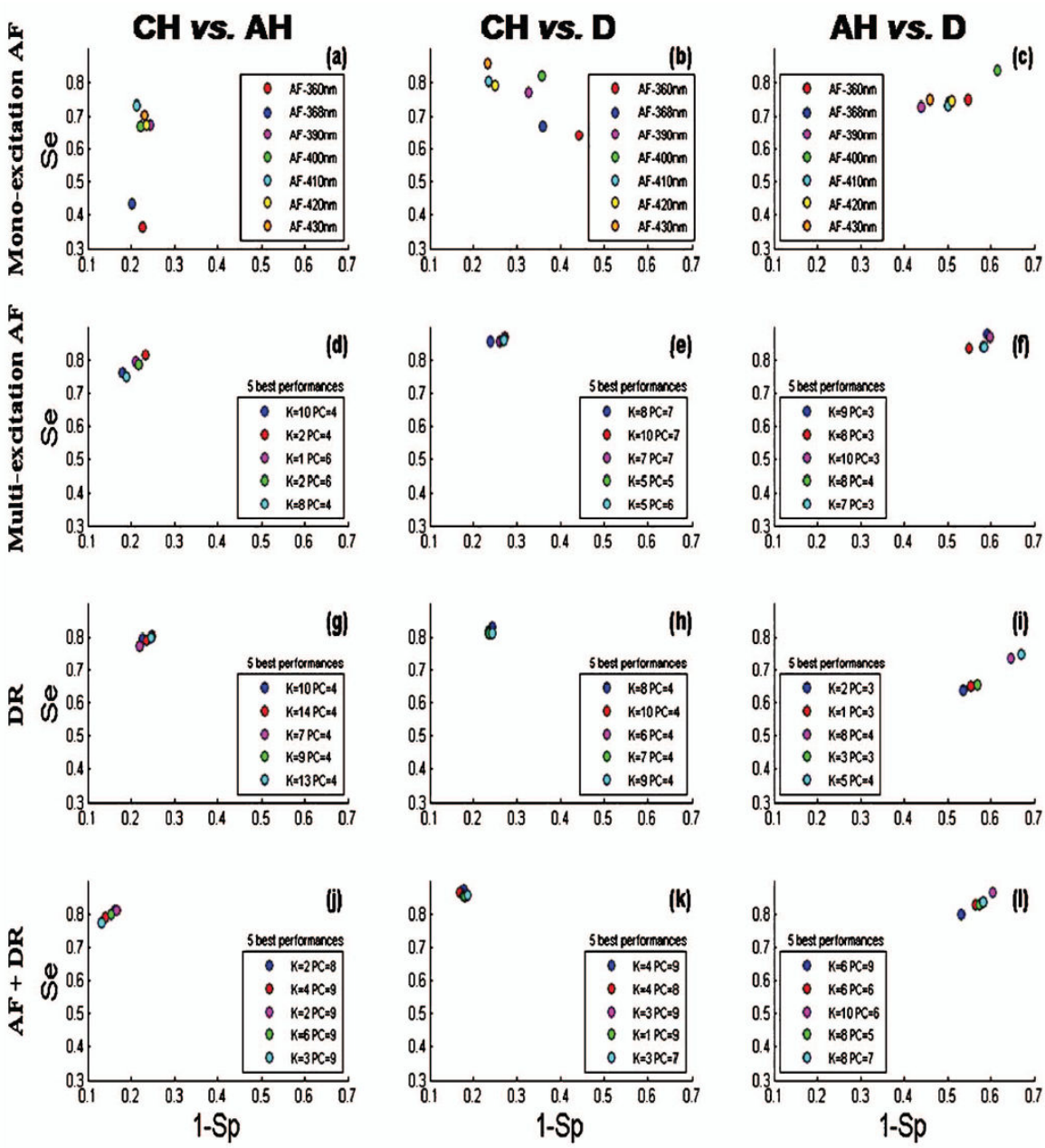

Fig. 14 ROC curves for the discrimination between the three types of hyperplasia from one another (CH, AH, D). First row (a, b, and c) shows monoexcitation AF spectroscopy with the optimum (Se, Sp) couple displayed for each excitation wavelength (red, 360 nm; dark blue, 368 nm; pink, 390 nm; green, 400 nm; light blue, 410 nm; yellow, 420 nm; and orange, 430 nm). Second row (d, e, and f) shows multiexcitation AF with the best five classification performances displayed with corresponding numbers of neighbors (*k*) and PCs (dark blue, red, pink, green, and light blue). Third row (g, h, and i) shows DR with the same color coding as above. Fourth row (j, k, and l) shows bimodality, i.e., multiexcitation AF +DR with the same color coding as above.

Our results are consistent with those reported by Diagaradjane et al. in a study that characterized early neoplastic changes in a DMBA/TPA-induced mouse skin tumor model.[5] They used multiexcitation AF in conjunction with a multivariate statistical method. Out of the 19 excitation wavelengths (ranging from 280 to 460 nm) used by the authors, the best classification accuracy was obtained for 280 and 410 nm (74.3% and 73.1%, respectively). We did not test wavelengths as short as 280 nm because their use

might be questionable in a clinical trial due to the risk of genetic mutations. But in the spectral range (360 to 430 nm) used by both our teams, Diagaradjane et al. also reported that visible wavelengths (410 nm) achieved better classification accuracy than shorter ones (e.g., 360 nm: 63.9% accuracy).[5] When comparing AF spectroscopy's classification ability using either one excitation wavelength or a combination of the five most discriminating excitation wavelengths (out of the 19 they tested), they showed that statistical analysis of the combination wavelengths resulted in an 11.6% increase in the overall classification accuracy when compared to the highest classification accuracy obtained with single-wavelength analysis. On UV-irradiated mouse skin, our results showed an average 9.3 percentage points increased sensitivity when considering the discrimination of normal skin from each of the three classes of UV-irradiated skin.

Chang et al. evaluated the diagnostic potential of multiexcitation AF alone, DR alone, and bimodality to discriminate human (columnar and squamous) normal cervical tissue from different types of precancerous tissues.[12] Their algorithms were tested to discriminate pairs of histological classes as well: normal (columnar or squamous) versus low-or high-grade intraepithelial lesions (columnar or squamous). They showed that fluorescence alone gave a superior performance compared to reflectance alone, and that the combination of reflectance spectra and fluorescence spectra provided a modest improvement in diagnostic performance. Similarly, in our case we showed that multiexcitation AF yielded higher Se than DR and that Sp was only slightly improved by bimodality compared to multiexcitation AF or DR used alone when discriminating the different types of hyperplasia from one another. This is precisely the use for which bimodality is of particular value: increasing the diagnostic Sp when discriminating benign (i.e., CH) from precancerous stages (i.e., AH and D) would be of great medical interest to reduce unnecessary biopsies.

4 Conclusion

To our knowledge, the current study is the first one to show bimodal spectroscopic evaluation of different stages of UV-irradiated mouse skin. We used an animal model to study changes in tissue throughout the carcinogenesis sequence because such information is not available with human patients. Based on epidermis and dermis morphological characteristics, a classification of UV-irradiated mouse skin stages was performed. With this classification, compensatory hyperplastic (CH) states were distinguished from atypical hyperplastic and dysplastic ones (AH and D). The former types are considered to be benign and the second types to be precancerous. Our results showed that visible wavelengths tended to achieve better classification performance than the shorter ones (360 and 368 nm) in discriminating benign from precancerous skin samples. These are encouraging results for clinical application since such visible wavelengths are harmless. Combining several excitation wavelengths improved diagnostic sensitivity and combining modalities (DR and multiexcitation AF) improved diagnostic specificity, especially when discriminating the three types of hyperplasia from one another. These results suggest that bimodal spectroscopy could be an accurate technique to discriminate normal and benign states (H and CH) from precancerous ones (AH and D). We believe the sens ity and specificity of the method could be improved u several collection optical fibers instead of a single one. deed, combining information from a number of points loc at variable distances from the excitation optical fiber probe the tissue at several depths,[23] resulting in a potenti better discrimination between the different histolog classes. This work is still in progress: data from collec fibers set at 536 and 834 μm from the excitation fiber being combined with those collected at 271 μm (presente the current paper) to investigate whether this combination proves the classification accuracy. To confirm the diagnc potential of the method, a further step will be needed to as it in a clinical trial.

Acknowledgments

This work was supported by the French association L Contre le Cancer (CD 52, 54), Nancy-University, and the gion Lorraine. The authors would like to acknowledge European Union high-level program for Latin Ame (AlBan program), scholarship # E05D057651MX, as wel Fiacre Rougieux.

References

1. M. Mogensen and B. E. Gregor, "Diagnosis of nonmelanoma cancer/keratinocyte carcinoma: a review of diagnostic accurac nonmelanoma skin cancer diagnostic tests and technologies," *De tol. Surg.* **33**(10), 1158–1174 (2007).
2. E. LeBoit, G. Burg, D. Weedon, and A. Sarasin, *Pathology ana netics of Skin Tumours*, IARC Press, Lyon, France (2006).
3. R. Lewis Kelso, M. I. Colome-Grimmer, T. Uchida, H. Q. Wang R. F. Wagner Jr., "p75(NGFR) immunostaining for the detection of perineural invasion by cutaneous squamous cell carcinoma," *Dermatol. Surg.* **32**(2), 177–183 (2006).
4. H. Tehrani, J. Walls, S. Cotton, E. Sassoon, and P. Hall, "Spectrophotometric intracutaneous analysis in the diagnosis of basal cell carcinoma: a pilot study," *Int. J. Dermatol.* **46**(4), 371–375 (2007).
5. P. Diagaradjane, M. A. Yaseen, J. Yu, M. S. Wong, and B. Anvari, "Autofluorescence characterization for the early diagnosis of neoplastic changes in DMBA/TPA-induced mouse skin carcinogenesis," *Lasers Surg. Med.* **37**, 382–395 (2005).
6. V. E. Reeve, S. Widyarini, D. Domanski, E. Chew, and K. Barnes, "Protection against photoaging in the hairless mouse by the isoflavone equol," *Photochem. Photobiol.* **81**(6), 1548–1553 (2005).
7. A. P. Pentland, G. Scott, J. A. Vanbuskirk, C. Tanck, G. LaRossa, and S. Brouxhon, "Cyclooxygenase-1 deletion enhances apoptosis but does not protect against ultraviolet light-induced tumors," *Cancer Res.* **64**, 5587–5591 (2004).
8. F. R. de Gruijl and J. C. van der Leun, "Physical variables in experimental photocarcinogenesis and quantitative relationships between stages of tumor development," *Front. Biosci.* **7**, 1525–1530 (2002).
9. V. Molho-Pessach and M. Lotem, "Ultraviolet radiation and cutaneous carcinogenesis," *Curr. Probl Dermatol.* **35**, 14–27 (2007).
10. E. L. Franco and T. E. Rohan, *Cancer Precursors, Epidemiology, Detection, and Prevention*, Springer-Verlag, New York (2002).
11. K. E. de Visser, L. M. Coussens, T. Dittmar, K. S. Zaenker, and A. Schmidt, *The Inflammatory Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Development. Infection and Inflammation: Impacts on Oncogenesis*, Karger, Basel, Switzerland (2006).
12. S. K. Chang, Y. N. Mirabal, E. N. Atkinson, D. Cox, A. Malpica, M. Follen, and R. Richards-Kortum, "Combined reflectance and fluorescence spectroscopy for in vivo detection of cervical pre-cancer," *J. Biomed. Opt.* **10**(2), 024031 (2005).
13. T. M. Breslin, F. Xu, G. M. Palmer, C. Zhu, K. W. Gilchrist, and N. Ramanujam, "Autofluorescence and diffuse reflectance properties of malignant and benign breast tissue,"*Ann. Surg. Oncol.* **11**, 65–70 (2004).
14. I. Georgakoudi, B. C. Jacobson, J. Van Dam, V. Backman, M. B. Wallace, M. G. Müller, Q. Zhang, K. Badizadegan, D. Sun, G. A.

Thomas, L. T. Perelman, and M. S. Feld, "Fluorescence, reflectance, and light-scattering spectroscopy for evaluating dysplasia in patients with Barrett's esophagus," *Gastroenterology* **120**, 1620–1629 (2001).
15. W. J. Marshall and S. K. Bangert, *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*, Churchill Livingston, Edinburgh (2008).
16. V. Kumar, R. S. Cotran, and S. L. Robbins, *Robbins Basic Pathology*, Saunders, Philadelphia (2007).
17. S. D. Kamath and K. K. Mahato, "Optical pathology using oral tissue fluorescence spectra: classification by principal component analysis and k-means nearest neighbor analysis," *J. Biomed. Opt.* **12**(1), 014028 (2007).
18. Y. Wu, P. Xi, J. Y. Qu, T.-H. Cheung, and M.-Y. Yu, "Depth-resolved fluorescence spectroscopy reveals layered structure of tissue," *Opt. Express* **12**(14), 3218–3223 (2004).
19. Y. Wu, P. Xi, J. Y. Qu, T.-H. Cheung, and M.-Y. Yu, "Depth-resolved fluorescence spectroscopy of normal and dysplastic cervical tissue," *Opt. Express* **13**(2), 382–388 (2005).
20. A.-M. Pena, M. Strupler, T. Boulesteix, G. Godeau, and M.-C. Schanne-Klein, "Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy," *Opt. Express* **13**(16), 6268–6274 (2005).
21. M. C. Skala, J. M. Squirrell, K. M. Vrotsos, J. C. Eichkhoff, A. Gendron-Fitzparrick, K. W. Eliceiri, and N. Ramanujam, "Multiphoton microscopy of endogenous fluorescence differenciates normal, precancerous, and cancerous squamous epithelial tissues," *Cancer Res.* **65**(4), 1180–1186 (2005).
22. D. C. de Veld, M. Skurichina, M. J. Witjes, R. P. Duin, H. J. Sterenborg, and J. L. Roodenburg, "Clinical study for classification of benign, dysplastic, and malignant oral lesions using autofluorescence spectroscopy," *J. Biomed. Opt.* **9**(5), 940–950 (2004).
23. Q. Liu and N. Ramanujam, "Sequential estimation of optical properties of a two-layered epithelial tissue model from depth-resolved ultraviolet-visible diffuse reflectance spectra," *Appl. Opt.* **45**, 4776–4790 (2006).

Bibliographie

[Amouroux, 2008] M. Amouroux. *Caractérisation de la transformation néoplasique de la peau par spectroscopies optiques sur fantôme de mélanome et carcinome épidermoïde murin photo-induit.* PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, 2008.

[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.

[Argauer and White, 1964] RJ Argauer and CE White. Fluorescent Compounds for Calibration of Excitation and Emission Units of Spectrofluorometer. *Analytical Chemistry*, 36(2) :368–371, 1964.

[Arranz *et al.*, 2004] F.R. Arranz, J.F. Rubio, M. Salvado, and V. del Villar Sordo. Descriptive epidemiology of basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma in soria (north-eastern spain) 1998-2000 : a hospital-based survey. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 18(2) :137–141, 2004.

[Athar *et al.*, 2006] M. Athar, X. Tang, J.L. Lee, L. Kopelovich, and A.L. Kim. Hedgehog signaling in skin development and cancer. *Experimental dermatology*, 15(9) :667–677, 2006.

[Azfar *et al.*, 2004] R.S. Azfar, R.A. Schwartz, and M. Berwick. Primary melanoma prevention in children. *Italiano di Dermatologia e Venereologia*, 139(44) :267–272, 2004.

[Balasubramanian *et al.*, 1995] S. Balasubramanian, V. Elangovan, and S. Govindasamy. Fluorescence spectroscopic identification of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 16(10) :2461–2465, Oct 1995.

[Basset-Seguin *et al.*, 2002] N. Basset-Seguin, B. Dreno, and J.J. Grob. Epithelial and melanotic skin tumors. Epithelial carcinoma. In *Annales de dermatologie et de vénéréologie*, volume 129, page S132, 2002.

[Bauer and Mackenzie, 1995] W. Bauer and C.D. Mackenzie. Cancer detection via determination of fractal cell dimension. *Arxiv preprint patt-sol/9506003*, 1995.

[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.

[Biswal *et al.*, 2003] N.C. Biswal, S. Gupta, N. Ghosh, and A. Pradhan. Recovery of turbidity free fluorescence from measured fluorescence : an experimental approach. *Optics Express*, 11 :3320–3331, 2003.

[Bourg-Heckly *et al.*, 2000] G. Bourg-Heckly, J. Blais, J. J. Padilla, O. Bourdon, J. Etienne, F. Guillemin, and L. Lafay. Endoscopic ultraviolet-induced autofluorescence spectroscopy of the esophagus : tissue chracterization and potential for early cancer diagnosis. *Endoscopy*, 32 :756–765, 2000.

[Brancaleon *et al.*, 2001] L. Brancaleon, A. J. Durkin, J. H. Tu, G. Menaker, J. D. Fallon, and N. Kollias. In vivo fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer. *Photochem Photobiol*, 73(2) :178–183, Feb 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.

[Burges, 1998] Christopher J. C. Burges. A tutorial on support vector machines for pattern recognition. *Data Mining and Knowledge Discovery*, 2 :121–167, 1998.

[Carmeliet and Jain, 2000] P. Carmeliet and R.K. Jain. Angiogenesis in cancer and other diseases. *NATURE-LONDON-*, pages 249–257, 2000.

[Caspers *et al.*, 1998] PJ Caspers, GW Lucassen, R. Wolthuis, HA Bruining, and GJ Puppels. In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin. *Biospectroscopy*, 4(5 Suppl) :S31–S39, 1998.

[Chalau, 2004] V. Chalau. *Spectroscopie in vivo de diffusion élastique résolue dans l espace en combinaison avec la spectroscopie de fluorescence : applications en cancérologie.* PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, 2004.

[Chang *et al.*, 2002a] 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.*, 2002b] S. K. Chang, M. Y. Dawood, G. Staerkel, U. Utzinger, E. N. Atkinson, R. R. Richards-Kortum, and M. Follen. Fluorescence spectroscopy for cervical precancer detection : Is there variance across the menstrual cycle ? *Journal of Biomedical Optics*, 7(4) :595–602, October 2002.

[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.

[Cleary and Trigg, 1995] John G. Cleary and Leonard E. Trigg. K* : An instance-based learner using an entropic distance measure. In *In Proceedings of the 12th International Conference on Machine Learning*, pages 108–114. Morgan Kaufmann, 1995.

[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.

[Cross, 1997] S.S. Cross. Fractals in pathology. *Journal of Pathology*, 182(1) :1–8, 1997.

[Czarnecki *et al.*, 2002] D. Czarnecki, C.J. Meehan, F. Bruce, and G. Culjak. The majority of cutaneous squamous cell carcinomas arise in actinic keratoses. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 6(3) :207–209, 2002.

[Dandurand, 2008] M. Dandurand. Carcinomes basocellulaires. *Manifestations dermatologiques des maladies du système hématopo*
"ıétique et oncologie dermatologique, pages 123–136, 2008.

[Dash and Liu, 1997] M. Dash and H. Liu. Feature selection for classification. *Intelligent Data Analysis*, 1 :131–156, 1997.

[de Gruijl and van der Leun, 2002] F.R. de Gruijl and J.C. van der Leun. Physical variables in experimental photocarcinogenesis and quantitative relationships between stages of tumor development. *Front Biosci*, 7 :d1525–d1530, 2002.

[de Veld *et al.*, 2003] Diana C G de Veld, Marina Skurichina, Max J H Witjes, Robert P W Duin, Dick J C M Sterenborg, Willem M Star, and Jan L N Roodenburg. Autofluorescence characteristics of healthy oral mucosa at different anatomical sites. *Lasers Surg Med*, 32(5) :367–376, 2003.

[de Veld *et al.*, 2004] Diana C G de Veld, Marina Skurichina, Max J H Witjes, Robert P W Duin, Henricus J C M Sterenborg, and Jan L N Roodenburg. Clinical study for classification of benign, dysplastic, and malignant oral lesions using autofluorescence spectroscopy. *J Biomed Opt*, 9(5) :940–950, 2004.

[de Veld *et al.*, 2005] Diana C G de Veld, Marina Skurichina, Max J H Witjes, Robert P W Duin, Henricus J C M Sterenborg, and Jan L N Roodenburg. Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy for oral oncology. *Lasers Surg Med*, 36(5) :356–364, Jun 2005.

[de Visser and Coussens, 2006] K. de Visser and L. Coussens. The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. *Contributions to microbiology*, 13(R) :118, 2006.

[de Vries *et al.*, 2006] E. de Vries, J.W. Coebergh, and H. van der Rhee. Trends, causes, approach and consequences related to the skin-cancer epidemic in the netherlands and europe. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, 150(20) :1108–15, 2006.

[Demir and Yener, 2005] C. Demir and B. Yener. Automated cancer diagnosis based on histopathological images : a systematic survey. *Rensselaer Polytechnic Institute, Tech. Rep*, 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.

[Domingos, 1999] P. Domingos. The role of occam's razor in knowledge discovery. *Data Mining and Knowledge Discovery*, 3(4) :409–425, 1999.

[DRENO and BERNIER, 2000] B. DRENO and C. BERNIER. Cancers cutanés épithéliaux : Epidémiologie, étiologie, anatomie pathologique, diagnostic, principes du traitement. *La Revue du praticien(Paris)*, 50(19) :2157–2162, 2000.

[Duda and Hart, 2001] R. Duda and P. Hart. *Pattern Classification*, chapter 4. Nonparametric Techniques, pages 161–214. Wiley-Interscience, 2001.

[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.

[Fears and Scotto, 1983] T.R. Fears and J. Scotto. Estimating increases in skin cancer morbidity due to increases in ultraviolet radiation exposure. *Cancer Investigation*, 1(2) :119–26, 1983.

[Foraker, 1954] A.G. Foraker. An analysis of nuclear size and nuclear : cytoplasmic ratio in the histological diagnosis of intraepithelial carcinoma of the cervix uteri. *CA A Cancer Journal for Clinicians*, 7(5) :884–892, 1954.

[Forsyth, 1989] R. Forsyth. *Machine Learning. Principles and Techniques*, chapter The logic of induction, pages –. Chapman and Hall Computing Series, 1989.

[Franco and Rohan, 2002] E.L. Franco and T.E. Rohan. *Cancer precursors : epidemiology, detection, and prevention.* Springer Verlag, 2002.

[Friedman *et al.*, 1985] H.I. Friedman, P.H. Cooper, and H.J. Wanebo. Prognostic and therapeutic use of microstaging of cutaneous squamous cell carcinoma of the trunk and extremities. *Cancer*, 56(5) :1099–1105, 1985.

[Gaigalas *et al.*, 2001] A. K. Gaigalas, L. Li, O. Henderson, R.Vogt, J. Barr, G. Marti, J. Weaver, and A. Schwartz. The development of fluorescence intensity standards. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 106(2) :381–389, 2001.

[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] I. Georgakoudi, J. Motz, V. Backman, G. Angheloiu, A. Haka, M. Müller, R. Dasari, and M.S. Feld. *Biomedical Photonics Handbook*, chapter 31. Quantitative characterization of biological tissue using optical spectroscopy, pages 1–33. CRC Press, 2003.

[Ghadially and Neish, 1960] FN Ghadially and WJP Neish. Porphyrin fluorescence of experimentally produced squamous cell carcinoma. 1960.

[Gniadecka *et al.*, 1997] M. Gniadecka, H.C. Wulf, O.F. Nielsen, D.H. Christensen, and J. Hercogova. Distinctive molecular abnormalities in benign and malignant skin lesions : studies by Raman spectroscopy. *Photochemistry and photobiology*, 66(4) :418–423, 1997.

[Gougerot *et al.*, 1939] H. Gougerot, A. Patte, O. Eliascheff, and C. Desgrais. Fluorescence des épithéliomas à la lumière de Wood. *Bull. Soc. franc. Derm*, 46 :288–295, 1939.

[Gouzman *et al.*, 2004] M. Gouzman, N. Lifshitz, S. Luryi, O. Semyonov, D. Gavrilov, and V. Kuzminskiy. Excitation-emission fluorimeter based on linear interference filters. *Applied optics*, 43(15) :3066–3072, 2004.

[Grossman and Leffell, 1997] D. Grossman and D.J. Leffell. The molecular basis of nonmelanoma skin cancer : new understanding. *Archives of Dermatology*, 133(10) :1263–1270, 1997.

[Guillot, 2008] B. Guillot. *Dépistage et cancers cutanés*, chapter 1. Épidémiologie des cancers cutanés en France et 2. Aspects cliniques des cancers cutanés, pages 21–28. Springer-Verlag France, Paris, 2008.

[Gupta *et al.*, 2007] L. Gupta, S.K. Naik, , and S. Balakrishnan. *Medical Biometrics*, chapter 1. A New Feature Selection and Classification Scheme for Screening of Oral Cancer Using Laser Induced Fluorescence, pages 1–8. Springer Berlin / Heidelberg, 2007.

[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.

[Haka *et al.*, 2005] A.S. Haka, K.E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice, J. Crowe, R.R. Dasari, and M.S. Feld. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(35) :12371–12376, 2005.

[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.

[Hanke and Temofeew, 1986] C.W. Hanke and R.K. Temofeew. Basal cell carcinoma with eccrine differentiation (eccrine epithelioma). *Journal of dermatologic surgery and oncology*, 12(8) :820–824, 1986.

[Hanlon *et al.*, 2000] EB Hanlon, R. Manoharan, TW Koo, KE Shafer, JT Motz, M. Fitzmaurice, JR Kramer, I. Itzkan, RR Dasari, and MS Feld. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, 45(2) :1–1, 2000.

[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.

[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.

[Inaguma and Hashimoto, 1999] M. Inaguma and K. Hashimoto. Porphyrin-like fluorescence in oral cancer : In vivo fluorescence spectral characterization of lesions by use of a near-ultraviolet excited autofluorescence diagnosis system and separation of fluorescent extracts by capillary electrophoresis. *Cancer*, 86(11) :2201–2211, Dec 1999.

[Jemal *et al.*, 2006] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, T. Murray, J. Xu, C. Smigal, and M.J. Thun. Cancer statistics, 2006. *CA : A Cancer Journal for Clinicians*, 56(2) :106–130, 2006.

[Jemal *et al.*, 2007] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, T. Murray, J. Xu, and M.J. Thun. Cancer statistics, 2007. *CA : A Cancer Journal for Clinicians*, 57(1) :43–66, 2007.

[Johnson *et al.*, 1992] T.M. Johnson, D.E. Rowe, B.R. Nelson, and N.A. Swanson. Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa). *Journal of the American Academy of Dermatology*, 26(3) :467–484, 1992.

[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. *J Biomed Opt*, 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.

[Katika and Pilon, 2006] K.M. Katika and L. Pilon. Steady-state directional diffuse reflectance and fluorescence of human skin. *Applied optics*, 45(17) :4174–4183, 2006.

[Kelso *et al.*, 2006] R.L. Kelso, M.I. Colome-Grimmer, T. Uchida, H.Q. Wang, and R.F.Jr. Wagner. p75(ngfr) immunostaining for the detection of perineural invasion by cutaneous squamous cell carcinoma. *Dermatologic Surgery*, 32(2) :177–183, 2006.

[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.

[Kortum and Muraca, 1996] R. Richards Kortum and E. Sevick Muraca. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annual review of physical chemistry*, 47 :555–606, 1996.

[Krishna *et al.*, 2006] C.M. Krishna, NB Prathima, R. Malini, BM Vadhiraja, R.A. Bhatt, D.J. Fernandes, P. Kushtagi, MS Vidyasagar, and VB Kartha. Raman spectroscopy studies for diagnosis of cancers in human uterine cervix. *Vibrational Spectroscopy*, 41(1) :136–141, 2006.

[Kwa *et al.*, 1992] R.E. Kwa, K. Campana, and R.L. Moy. Biology of cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 26(1) :1–26, 1992.

[Lacave *et al.*, 2005] R. Lacave, C.-J. Larsen, and J. Robert. *Cancérologie fondamentale*, chapter 18. Histoire naturelle des cancers. Biologie des lesions precancereuses., pages 165–172. John Libbey Eurotext, 2005.

[Lakowicz, 2006] J.R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, pages –. Plenum Press New York, 2006.

[Langley, 1994] Pat Langley. Selection of relevant features in machine learning. In *In Proceedings of the AAAI Fall symposium on relevance*, pages 140–144. AAAI Press, 1994.

[Lau *et al.*, 2003] D.P. Lau, Z. Huang, H. Lui, C.S. Man, K. Berean, M.D. Morrison, and H. Zeng. Raman spectroscopy for optical diagnosis in normal and cancerous tissue of the nasopharynx-preliminary findings. *Lasers in surgery and medicine*, 32(3) :210–214, 2003.

[LeBoit *et al.*, 2006] E. LeBoit, G. Burg, D. Weedon, and A. Sarasin. *Pathology and Genetics of Skin Tumours*, chapter Introduction, pages 5–10. IARC Press, Lyon, 2006.

[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.

[Liang *et al.*, 1999] S.B. Liang, Y. Ohtsuki, M. Furihata, T. Takeuchi, J. Iwata, B.K. Chen, and H. Sonobe. Sun-exposure- and aging-dependent p53 protein accumulation results in growth advantage for tumour cells in carcinogenesis of nonmelanocytic skin cancer. *Virchows Archiv*, 434(3) :193–199, 1999.

[Lin *et al.*, 2004] WuMei Lin, Xin Yuan, Powing Yuen, William I Wei, Jonathan Sham, Peng-Cheng Shi, and Jianan Qu. Classification of in vivo autofluorescence spectra using support vector machines. *J Biomed Opt*, 9(1) :180–186, 2004.

[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.

[MacKie, 2006] R.M. MacKie. Long-term health risk to the skin of ultraviolet radiation. *British Journal of Dermatology*, 92(1) :92–96, 2006.

[Madan *et al.*, 2006] V. Madan, P. Hoban, R.C. Strange, A.A. Fryer, and J.T. Lear. Genetics and risk factors for basal cell carcinoma. *British Journal of Dermatology*, 154(1) :5–7, 2006.

[Mahadevan-Jansen *et al.*, 1998] A. Mahadevan-Jansen, M.F. Mitchell, N. Ramanujamf, A. Malpica, S. Thomsen, U. Utzinger, and R. Richards-Kortumt. Near-infrared Raman spectroscopy for in vitro detection of cervical precancers. *Photochemistry and photobiology*, 68(1) :123–132, 1998.

[Majumder *et al.*, 2005] S. K. Majumder, N. Ghosh, and P. K. Gupta. Support vector machine for optical diagnosis of cancer. *J Biomed Opt*, 10(2) :024034, 2005.

[Maksimovic *et al.*, 2006] N. Maksimovic, M. Raznatovic, J. Marinkovic, and J. Jankovic. Exposure to sun radiation as a risk factor for the occurrence of basal cell carcinoma in the montenegrian population. *Vojnosanitetski pregled. Military-medical and pharmaceutical review*, 63(7) :643–7, 2006.

[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.

[Marieb, 1999] E.N. Marieb. *Anatomie et Physiologie Humaines*, chapter 5. Le Système Tégumentaire, pages 142–163. Editions de Renouveau Pédagogique Inc., 1999.

[Marín *et al.*, 2005] N.M. Marín, 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) :S116–S120, 2005.

[Marín *et al.*, 2006] N.M. Marín, N. MacKinnon, C. MacAulay, S. K. Chang, E. N. Atkinson, D. Cox, D. Serachitopol, B. Pikkula, M. Follen, and R. Richards-Kortum. Calibration standards for multicenter clinical trials of fluorescence spectroscopy for in vivo diagnosis. *Journal of Biomedical Optics*, 11(1) :014010, 2006.

[Maroulakou *et al.*, 1994] I.G. Maroulakou, M. Anver, L. Garrett, and J.E. Green. Prostate and mammary adenocarcinoma in transgenic mice carrying a rat C3 (1) simian virus 40 large tumor antigen fusion gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(23) :11236–11240, 1994.

[Marshall and Bangert, 1995] W.J. Marshall and SK Bangert. *Clinical biochemistry : metabolic and clinical aspects*. Elsevier Health Sciences, 1995.

[Massart *et al.*, 1998] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, and J. Smeyers-Verbeke. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part B*, chapter 33. Supervised Pattern Recognition, pages 207–223. Elsevier, 1998.

[Melhuish, 1960] WH Melhuish. A standard fluorescence spectrum for calibrating spectrofluorophotometers. *The Journal of Physical Chemistry*, 64(6) :762–764, 1960.

[Michaslki and Stepp, 1983] R. S. Michaslki and R. E. Stepp. *Machine Learning : An Artificial Intelligence Approach*, chapter Learning from observation : Conceptual clustering, pages 331–363. Tioga Publishing Co., 1983.

[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.

[Mogensen and Gregor, 2007] M. Mogensen and B. E. Gregor. Diagnosis of nonmelanoma skin cancer/keratinocyte carcinoma : a review of diagnostic accuracy of nonmelanoma skin cancer diagnostic tests and technologies. *Dermatologic Surgery*, 33(10) :1158–1174, 2007.

[Motz *et al.*, 2004] J.T. Motz, M. Hunter, L.H. Galindo, J.A. Gardecki, J.R. Kramer, R.R. Dasari, and M.S. Feld. Optical fiber probe for biomedical Raman spectroscopy. *Applied optics*, 43(3) :542–554, 2004.

[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.

[Mullen *et al.*, 2006] J.T. Mullen, L. Feng, Y. Xing, P.F. Mansfield, J.E. Gershenwald, J.E. Lee, M.I. Ross, and J.N. Cormier. Invasive squamous cell carcinoma of the skin : defining a high-risk group. *Annals of surgical oncology*, 13(7) :902–909, 2006.

[Muller *et al.*, 2003] M.G. Muller, T.A. Valdez, I. Georgakoudi, V. Backman, C. Fuentes, S. Kabani, N. Laver, Z. Wang, C.W. Boone, R.R. Dasari, S.M. Shapshai, and M.S. Feld. Spectroscopic Detection and Evaluation of Morphologic and Biochemical Changes in Early Human Oral Carcinoma. *Cancer*, 97(7) :1681–1692, 2003.

[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. *J Biomed Opt*, 10(6) :064020, 2005.

[Mycek and Pogue, 2003] M.A. Mycek and B.W. Pogue. *Handbook of biomedical fluorescence*. CRC, 2003.

[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.

[Nayak *et al.*, 2006] G. S. Nayak, Sudha Kamath, Keerthilatha M Pai, Arindam Sarkar, Satadru Ray, Jacob Kurien, Lawrence D'Almeida, B. R. Krishnanand, C. Santhosh, V. B. Kartha, and

K. K. Mahato. Principal component analysis and artificial neural network analysis of oral tissue fluorescence spectra : classification of normal premalignant and malignant pathological conditions. *Biopolymers*, 82(2) :152–166, Jun 2006.

[Neale *et al.*, 2007] R. Neale, M. Davis, N. Pandeya, D. Whiteman, and A. Green. Basal cell carcinoma on the trunk is associated with excessive sun exposure. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 56(3) :380–386, 2007.

[Nicol *et al.*, 2006] I. Nicol, C. Gaudy, J. Gouvernet, M.A. Richard, and J.J. Grob. Skin protection by sunscreens is improved by explicit labeling and providing free sunscreen. *Journal of Investigative Dermatology*, 127 :41–48, 2006.

[Nordstrom *et al.*, 2001] R.J. Nordstrom, L. Burke, J.M. Niloff, and J.F. Myrtle. Identification of Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) Using UV-Excited Fluorescence and Diffuse-Reflectance Tissue Spectroscopy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 29(2) :118–127, 2001.

[Obuchowski, 2003] N.A. Obuchowski. Receiver Operating Characteristic Curves and Their Use in Radiology 1, 2003.

[Ono *et al.*, 1985] T. Ono, K. Egawa, J. Higo, and V.H. Fallas. Basal cell epithelioma with giant tumor cells. *Journal of Dermatology*, 12(4) :348–8, 1985.

[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, C.E. 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(5), 2002.

[Parker, 1962] CA Parker. Spectrofluorometer Calibration in the Ultraviolet Region. *Analytical Chemistry*, 34(4) :502–505, 1962.

[Peña, 2002] D. Peña. *Análisis de datos multivariantes*, chapter Discriminación logistica y otros métodos de classificación, pages 429–455. McGraw Hill, Interamericana de España, 2002.

[Pena *et al.*, 2005] A. Pena, M. Strupler, T. Boulesteix, and M. Schanne-Klein. Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy. *Opt Express*, 13(16) :6268–6274, Aug 2005.

[Pentland *et al.*, 2004] A.P. Pentland, G. Scott, J.A. VanBuskirk, C. Tanck, G. LaRossa, and S. Brouxhon. Cyclooxygenase-1 deletion enhances apoptosis but does not protect against ultraviolet light-induced tumors, 2004.

[Policard, 1924] A. Policard. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood. *CR Soc Biol*, 91 :1423–1424, 1924.

[Press *et al.*, 1992] William H. Press, Brian P. Flannery, Saul A. Teukolsky, and William T. Vetterling. *Numerical Recipes : The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, Cambridge (UK) and New York, 2nd edition, 1992.

[Péry, 2007] E. Péry. *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.

[Raman and Krishnan, 1928] CV Raman and KS Krishnan. A new type of secondary radiation. *Nature*, 121(3048) :501, 1928.

[Ramanujam *et al.*, 1994] N. Ramanujam, MF 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.F. Mitchell, A. Mahadevan, S. Thomsen, A. Malpica, T. Wright, N. Atkinson, and R.R. Kortum. Spectroscopic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in vivo using laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavlengths. *Lasers in surgery and medicine*, 19(1), 1996.

[Ramanujam, 2000a] N. Ramanujam. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, chapter Fluorescence Spectroscopy In Vivo, pages 20–56. John Wiley Sons Ltd, Chichester, 2000.

[Ramanujam, 2000b] N. Ramanujam. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia*, 2(1-2) :89–117, 2000.

[Reeve *et al.*, 2005] V.E. Reeve, S. Widyarini, D. Domanski, E. Chew, and K. Barnes. Protection against photoaging in the hairless mouse by the isoflavone equol. *Photochemistry and photobiology*, 81(6) :1548–1553, 2005.

[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.

[Ronchese *et al.*, 1954] F. Ronchese, B.S. Walker, and R.M. Young. The reddish-orange fluorescence of necrotic cancerous surfaces under the Wood light. *Archives of Dermatology*, 69(1) :31, 1954.

[Rudolph *et al.*, 2000] C.M. Rudolph, H.P. Soyer, P. Wolf, and H. Kerl. Squamous epithelial carcinoma in erythema ab igne. *Hautarzt*, 51(4) :260–263, 2000.

[Rundel, 1983] R.D. Rundel. Promotional effects of ultraviolet radiation on human basal and squamous cell carcinoma. *Photochemistry and photobiology*, 38(5) :569–575, 1983.

[Sakamoto *et al.*, 1985] F. Sakamoto, M. Ito, S. Sato, and Y. Sato. Basal cell tumor with apocrine differentiation : apocrine epithelioma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 13(2) :1–26, 1985.

[Schwartz, 2008] R.A. Schwartz. *Skin cancer*, chapter Introduction, 5 and 7. Blackwell Publishing, 2008.

[Scotto and T.R. Fears and, 1983] J. Scotto and J.F. Fraumeni T.R. Fears and. Incidence of nonmelanoma skin cancer in the united states. *National Institutes of Health Publication*, 83(2433) :1–14, 1983.

[Senga and Minami, 1991] Y. Senga and S. Minami. Excitation-emission matrix scanning spectrofluorometer. *Applied Spectroscopy*, 45(10) :1721–1725, 1991.

[Skala *et al.*, 2005] M.C. Skala, J.M. Squirrell, K.M. Vrotsos, J.C. Eickhoff, A. Gendron-Fitzpatrick, K.W. Eliceiri, and N. Ramanujam. Multiphoton microscopy of endogenous fluorescence differentiates normal, precancerous, and cancerous squamous epithelial tissues, 2005.

[Tehrani *et al.*, 2007] H. Tehrani, J. Walls, S. Cotton, E. Sassoon, and P. Hall. Spectrophotometric intracutaneous analysis in the diagnosis of basal cell carcinoma : a pilot study. *International Journal of Dermatology*, 46(4) :371–375, 2007.

[Timm, 2002] N.H. Timm. *Applied Multivariate Analysis*, chapter 7. Discriminant and Classification Analysis, pages 419–429. Springer-Verlag New York, Inc., 2002.

[Tsuchida *et al.*, 1987] M. Tsuchida, T. Miura, and K. Aibara. Lipofuscin and lipofuscin-like substances. *Chemistry and physics of lipids*, 44(2-4) :297, 1987.

[Tunnell *et al.*, 2003] JW Tunnell, AE Desjardins, L. Galindo, I. Georgakoudi, SA McGee, J. Mirkovic, MG Mueller, J. Nazemi, FT Nguyen, A. Wax, et al. Instrumentation for multi-modal spectroscopic diagnosis of epithelial dysplasia. *Technology in cancer research & treatment*, 2(6) :505, 2003.

[Utzinger *et al.*, 2001a] U. Utzinger, M. Brewer, E. Silva, D. Gershenson, R.C. Blast, M. Follen, and R.R. Richards-Kortum. Reflectance Spectroscopy for *In Vivo* Characterization of Ovarian Tissue. *Lasers in Surgery and Medicine*, 28(1) :56–66, 2001.

[Utzinger *et al.*, 2001b] U. Utzinger, D.L. Heintzelman, A. Mahadevan-Jansen, A. Malpica, M. Follen, and R.R. Richards-Kortum. Near-Infrared Raman Spectroscopy for *In Vivo* Detection of Cervical Precancers. *Applied Spectroscopy*, 55(8) :955–959, 2001.

[Valette, 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.

[Vapnik, 1995] V.N. Vapnik. *The nature of statistical learning theory.* Springer-Verlag, New York, Inc., 1995.

[Vo-Dinh, 2003] T. Vo-Dinh. *Biomedical Photonics Handbook*, chapter 28. Fluorescence Spectroscopy for Biomedical Diagnostics, pages –. CRC Press LLC, 2003.

[Wagnieres *et al.*, 1988] 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, 1988.

[Wallace *et al.*, 2000a] 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. *Phys Med Biol*, 45(10) :2859–2871, Oct 2000.

[Wallace *et al.*, 2000b] V. P. Wallace, D. C. Crawford, P. S. Mortimer, R. J. Ott, and J. C. Bamber. Spectrophotometric assessment of pigmented skin lesions : methods and feature selection for evaluation of diagnostic performance. *Phys Med Biol*, 45(3) :735–751, Mar 2000.

[Wang *et al.*, 2003] 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. *Lasers Surg Med*, 32(4) :318–326, 2003.

[Wu and Qu, 2006] Y. Wu and J.Y. Qu. Autofluorescence spectroscopy of epithelial tissues. *Journal of Biomedical Optics*, 11 :054023, 2006.

[Wu *et al.*, 1993] J. Wu, M.S. Feld, and R.P. Rava. Analytical model for extracting intrinsic fluorescence in turbid media. *Applied Optics*, 32(19) :3585–3595, 1993.

[Wu *et al.*, 2004] Yicong Wu, Peng Xi, Jianan Qu, Tak-Hong Cheung, and Mei-Yung Yu. Depth-resolved fluorescence spectroscopy reveals layered structure of tissue. *Opt Express*, 12(14) :3218–3223, Jul 2004.

[Wu *et al.*, 2005] Yicong Wu, Peng Xi, Jianan Qu, Tak-Hong Cheung, and Mei-Yung Yu. Depth-resolved fluorescence spectroscopy of normal and dysplastic cervical tissue. *Opt Express*, 13(2) :382–388, Jan 2005.

[Yamazaki *et al.*, 2003] H. Yamazaki, S. Kaminaka, E. Kohda, M. Mukai, and HO Hamaguchi. The diagnosis of lung cancer using 1064-nm excited near-infrared multichannel Raman spectroscopy. *Radiation Medicine*, 21(1) :1–6, 2003.

[Yang *et al.*, 1987] Y. L. Yang, Y. M. Ye, F. M. Li, Y. F. Li, and P. Z. Ma. Characteristic autofluorescence for cancer diagnosis and its origin. *Lasers Surg Med*, 7(6) :528–532, 1987.

[Ybarra, 1999] J.J.P. Ybarra. *Biopsie optique par spectroscopie de fluorescence des tissus vivants : spectroscopie UV, microspctroscopie, spectroscopie résolue dans le temps.* PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, 1999.

[Zângaro *et al.*, 1996] R.A. Zângaro, L. Silveira, R. Manoharan, G. Zonios, I. Itzkan, R.R. Dasari, J. Van Dam, and M.S. Feld. Rapid multiexcitation fluorescence spectroscopy system for in vivo tissue diagnosis. *Applied optics*, 35(25) :5211–5219, 1996.

[Zellweger *et al.*, 2001] M. Zellweger, D. Goujon, R. Conde, M. Forrer, H. Van Den Bergh, and G. Wagnières. Absolute autofluorescence spectra of human healthy, metaplastic, and early cancerous bronchial tissue *in vivo*. *Applied Optics*, 40(22) :3784–3791, 2001.

[Zeng *et al.*, 1993] H. Zeng, C. MacAulay, B. Palcic, and DI McLean. A computerized autofluorescence and diffuse reflectance spectroanalyser system for in vivo skin studies. *Physics in Medicine and Biology*, 38 :231–240, 1993.

[Zhu *et al.*, 2006] C. Zhu, G. M. Palmer, T.M. Breslin, J. Harter, and N. Ramanujam. Diagnosis of breast cancer using diffuse reflectance spectroscopy : Comparison of a monte carlo versus partial least squares analysis based feature extraction technique. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38 :714–724, 2006.

[Zonios *et al.*, 1996] G. Zonios, R. Cothren, J. Arendt, J. Wu, J. Van Dam, J. Crawford, R. Manoharan, and M.S. Feld. Morphological model of human colon tissue fluorescence. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 43(2) :113–122, 1996.

[Zonios *et al.*, 1999] G. Zonios, L.T. Perelman, V. Backman, R. Manoharan, M. Fitzmaurice, J. Van Dam, and M.S. Feld. Diffuse Reflectance Spectroscopy of Human Adenomatous Colon Polyps *In Vivo*. *Applied Optics*, 38(31) :6628–6637, 1999.

[Zou *et al.*, 2007] K.H. Zou, A.J. O'Malley, and L. Mauri. Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models. *Circulation*, 115(5) :654, 2007.

[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.

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Madame Anne HUMEAU, Professeur, Université d'Angers, Angers

Monsieur Pierre GOUTON, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur Gilberto DIAZ-AYIL

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Spectroscopie optique multi-modalités appliquée au diagnostic de pré-cancers cutanés *in vivo* : instrumentation, extraction et classification de données"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **« Automatique et Traitement du Signal »**

Fait à Vandoeuvre, le 09 novembre 2009

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Spectroscopie optique multi-modalités in vivo : instrumentation, extraction et classification diagnostique de tissus sains et hyperplasiques cutanés

Résumé

L'incidence des cancers cutanés est en constante progression. Leur diagnostic précoce et leur caractérisation in vivo constituent donc un enjeu important. Une approche multimodale et non invasive en spectroscopie fibrée résolue spatialement a été implémentée. L'instrumentation développée permet des mesures co-localisées en multiple excitation d'AutoFluorescence (AF, 7 pics entre 360 et 430 nm) et en Réflectance Diffuse (RD, 390 à 720 nm) résolues spatialement à 5 distances inter-fibres (entre 271 et 1341 μm). Le protocole expérimental a porté sur les stades précoces de cancers cutanés UV-induits sur un modèle pré-clinique. L'analyse histopathologique a permis de définir 4 classes de référence de tissus cutanés : Sain (S), Hyperplasie Compensatoire (HC), Hyperplasie Atypique (HA) et Dysplasie (D), menant à 6 combinaisons de paires histologiques à discriminer. Suite au prétraitement des spectres bruts acquis, puis à l'extraction, la sélection et la réduction de jeux de caractéristiques spectroscopiques, les performances de trois algorithmes de classification supervisée ont été comparées : k-Plus Proches Voisins, Analyse Discriminante Linéaire et Machine à Vecteur de Support. Différentes modalités ont également été évaluées : mono-excitation d'AF seule, Matrices d'Excitation-Emission en AF seules (EEMs), RD seule, couplage EEMs - RD et couplage EEMs - RD résolue spatialement. L'efficacité finale de notre méthode diagnostique a été évaluée en termes de sensibilité (Se) et de spécificité (Sp). Les meilleures résultats obtenus sont : Se et Sp $\approx$ 100% pour discriminer HC vs autres ; Sp $\approx$ 100% et Se $>$ 95% pour discriminer S vs HA ou D ; Sp $\approx$ 74% et Se $\approx$ 63% pour HA vs D.

Mots-clés: cancer, peau, spectroscopie in vivo, autofluorescence, diffusion élastique, instrumentation, classification supervisée.

Multi-modality optical spectroscopy in vivo : instrumentation, extraction and classification diagnosis of normal and hyperplastic cutaneous tissue

Abstract

The incidence of skin cancers is steadily increasing. Their in vivo early diagnosis and characterization is an important issue. An approach noninvasive : the spatially resolved multi-modality spectroscopy has been implemented. The instrumentation developed allows to co-localized measures in multiple AutoFluorescence excitation (AF, 7 peaks between 360 and 430 nm) and Diffuse Reflectance (DR, 390 to 720 nm) spatially resolved at 5 inter-fiber distances (between 271 and 1341 μm). The experimental protocol was focused on the early stages of skin cancer UV-induced in a preclinical model. Four reference classes were defined based on the histopathological analysis of the skin samples : Healthy (H), Compensatory Hyperplasia (CH), Atypical Hyperplasia (AH) and Dysplasia (D), leading to 6 combinations of class pairs to be discriminated. After preprocessing of the raw spectra, extraction, selection and reduction of the most discriminative spectroscopic data set were performed. Then, the efficacy of three supervised classification algorithms was compared : k-Nearest Neighbors, Linear Discriminant Analysis and Support Vector Machine. The contribution of the different modalities was also evaluated : single AF excitation alone, Excitation-Emission Matrices AF (EEMs) alone, DR alone, coupling of EEMs and RD, coupling of EEMs and DR with spatial resolution. The final efficiency of our diagnostic method was evaluated in terms of sensitivity (Se) and specificity (Sp). The best results obtained are : Se and Sp $\approx$ 100% for discriminating CH vs others ; Sp $\approx$ 100% and Se$>$ 95% for discriminating AH or D vs H ; Sp $\approx$ 74% and Se $\approx$ 63% to discriminate AH vs D.

Keywords: cancer, skin, in vivo spectroscopy, autofluorescence, elastic scattering, supervised classification.