



HAL
open science

Spectroscopie tissulaire in vivo de l'autofluorescence et de la fluorescence induite: instrumentation, analyse et modélisation, applications au diagnostic des cancers précoces et à l'optimisation de la thérapie photodynamique

Ousama A'Amar

► To cite this version:

Ousama A'Amar. Spectroscopie tissulaire in vivo de l'autofluorescence et de la fluorescence induite: instrumentation, analyse et modélisation, applications au diagnostic des cancers précoces et à l'optimisation de la thérapie photodynamique. Médecine humaine et pathologie. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1997. Français. NNT : 1997INPL093N . tel-01750911

HAL Id: tel-01750911

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750911>

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.



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>

93 INPL 03 N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE
D'ELECTRICITE ET DE MECANIQUE
ECOLE DOCTORALE IAE+M
DFD AUTOMATIQUE



THESE

Présentée à l'INPL pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'INPL

Formation Automatique et Traitement du Signal

Par

Ousama A'AMAR

Sujet :

**SPECTROSCOPIE TISSULAIRE *IN VIVO* DE L'AUTOFLUORESCENCE ET DE LA
FLUORESCENCE INDUITE : INSTRUMENTATION, ANALYSE ET MODELISATION**
**Applications au diagnostic des cancers précoces et à l'optimisation de la thérapie
photodynamique**

Soutenue publiquement le 26 septembre 1997 devant la commission d'examen

Membres du jury

Président :	M. E. YVROUD	DR Emérite CNRS - INPL
Rapporteurs :	Mme G. BOURG-HECKLY	MCU Univ. Paris VI
	M. G. SCHULTZ	Professeur Univ. Haute Alsace
Examineurs :	M. H. BEGORRE	Professeur Univ. Nancy I
		Professeur Univ. Nancy I
		HDR Univ. Nancy I
		Docteur EPF Lausanne



1360032391

97INPL033N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE
D'ELECTRICITE ET DE MECANIQUE
ECOLE DOCTORALE IAE+M
DFD AUTOMATIQUE

[M] 1997 A'AMAR, O.



THESE

Présentée à l'INPL pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'INPL

Formation Automatique et Traitement du Signal

Par

Ousama A'AMAR

Sujet :

**SPECTROSCOPIE TISSULAIRE *IN VIVO* DE L'AUTOFLUORESCENCE ET DE LA
FLUORESCENCE INDUITE : INSTRUMENTATION, ANALYSE ET MODELISATION
Applications au diagnostic des cancers précoces et à l'optimisation de la thérapie
photodynamique**

Soutenue publiquement le 26 septembre 1997 devant la commission d'examen

Membres du jury

Président :	M. E. YVROUD	DR Emérite CNRS - INPL
Rapporteurs :	Mme G. BOURG-HECKLY	MCU Univ. Paris VI
	M. G. SCHULTZ	Professeur Univ. Haute Alsace
Examineurs :	M. H. BEGORRE	Professeur Univ. Nancy I
	M. F. GUILLEMIN	Professeur Univ. Nancy I
	M. J.-L. MERLIN	HDR Univ. Nancy I
	M. G. WAGNIERES	Docteur EPF Lausanne

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

AVANT PROPOS

Les progrès considérables de la spectroscopie électronique et des détecteurs matriciels à transfert de charges (CCD) ont récemment marqué l'avancée des méthodes de photodétection du cancer *in vivo*. La spectroscopie de fluorescence est actuellement capable de mesurer de faibles signaux optiques sur une large étendue spectrale en temps réel. De plus, grâce à l'utilisation des détecteurs matriciels électroniquement obturables et des lasers pulsés, la spectroscopie résolue dans le temps a atteint l'échelle de la femtoseconde. Elle permet ainsi l'identification des fluorophores ayant des émissions adjacentes, dans un milieu complexe, en se basant sur la différence de leur durée de vie de fluorescence. Parallèlement, la spectroscopie Raman associée au filtrage temporel et holographique se présente aujourd'hui comme un outil de diagnostic médical.

Le travail qui est présenté ici repose sur le développement d'un matériel spectroscopique adapté à l'étude clinique humaine. Il doit permettre de mesurer la fluorescence des tissus biologiques et de les caractériser par leur spectre d'émission. Il a pour objectifs le diagnostic des cancers infracliniques et des états précancéreux non détectables par les moyens conventionnels, et l'étude *in vivo* de la pharmacocinétique des photosensibilisants employés en thérapie photodynamique.

La pluridisciplinarité de cette recherche nous a amené à rappeler quelques notions sur l'anatomopathologie des cancers, sur la biochimie et sur les phénomènes optiques dans les tissus. Ceci nous a permis de définir un cahier des charges pour contribuer à résoudre certains problèmes liés au photodiagnostic *in vivo*. Ainsi, nous avons consacré la première partie de ce mémoire à la présentation des cancers accessibles par voie endoscopique et aux diverses techniques employées pour leur diagnostic. Ensuite, nous présentons les méthodes de diagnostic basées sur la détection de l'autofluorescence et de la fluorescence induite. Enfin, nous présentons le principe de la thérapie photodynamique.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous proposons une étude pratique sur les sources de lumière, l'optique des tissus, les fibres optiques et l'instrumentation spectroscopique. Ainsi, nous déterminons les critères du choix de matériel pour la réalisation du système expérimental.

Les applications sur fantômes, sur modèles animaux et en clinique feront l'objet de la troisième partie. Nous développons un modèle gaussien permettant l'analyse des spectres de l'autofluorescence, et par conséquent l'identification des fluorophores qui sont à l'origine du signal global de l'autofluorescence.

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Le présent travail, dirigé par les Professeurs H. BEGORRE et F. GUILLEMIN, a été réalisé au Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN) dans l'Equipe de Recherche en Imagerie et Signaux Biomédicaux et au Centre Alexis Vautrin au Laboratoire Instrumentation Médicale Automatisée en Cancérologie.

Je tiens tout d'abord à remercier :

Monsieur le Directeur de Recherche CNRS Emérite Edouard YVROUD pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire au cours de mon D.E.A. et de la confiance qu'il m'a accordée, ainsi que pour sa disponibilité, ses encouragements et ses qualités humaines. Vous me faites une grande joie en acceptant de participer à ce jury.

Monsieur le Professeur François GUILLEMIN d'une part pour avoir co-dirigé le présent travail, et d'autre part pour sa disponibilité, les discussions éclairées que nous eues et sa rigueur scientifique. Qu'il trouve dans ce travail l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur Henri BEGORRE pour avoir dirigé ce travail, pour son soutien constant et pour avoir accompagné l'évolution de cette recherche.

Monsieur le Professeur Guy SCHULTZ pour l'intérêt qu'il a montré pour ce travail en acceptant de participer à ce jury et d'être rapporteur de cette thèse.

Madame le Docteur Geneviève BOURG-HECKLY pour l'honneur qu'elle m'a fait d'être rapporteur de cette thèse et pour les nombreuses discussions que nous avons eues, toujours très enrichissantes et constructives.

Monsieur le Docteur Jean-Louis MERLIN pour sa contribution par l'intérêt qu'il a suscité pour ce travail, et pour avoir accepté de participer à ce jury.

Monsieur le Docteur Georges WAGNIERES pour avoir accepté de participer à ce jury, compte tenu de sa grande compétence dans le domaine de la fluorescence.

Monsieur le Docteur P. KOSMINSKI et Monsieur le Docteur Olivier MENARD pour l'intérêt qu'ils ont montré pour cette recherche et pour leur contribution au travail clinique expérimental.

Remerciements

Monsieur le Professeur Alain RICHARD pour m'avoir conseillé sur la modélisation.

Monsieur Dominique LIGNON pour ses conseils et pour avoir contribué à la réalisation de notre matériel.

Madame le Professeur Lina BEZDETAYA, Madame le Docteur Anne MEUNIER et Madame le Docteur Muriel Barberi-Heyob pour leur collaboration.

Mademoiselle le Docteur Marie-Luce DILLER pour m'avoir prodigué les bons conseils quant à la rédaction de la thèse.

Madame le Docteur Valérie LOUIS pour ses encouragements et sa gentillesse.

Monsieur Alain TERRIER pour sa disponibilité constante et les nombreux services qu'il m'a rendus.

Monsieur Pierre ROUILLION pour sa disponibilité constante et pour ses conseils techniques.

Madame Sophie MARCHAL pour son efficace collaboration.

Mesdemoiselles Hadjira REZZOUG, Nadia ZEGHARI, Edwige BOSSU et Monsieur Dominique NOTTER pour les collaborations fructueuses que nous avons eues, les expérimentations mises en commun et les modèles animaux sur lesquels nous avons pu travailler.

Je tiens également à remercier tous mes collègues du Centre Alexis Vautrin et de l'ISB, ainsi que le personnel pour la bonne ambiance de travail qui ont su faire régner. Je pense tout particulièrement à Mlles Kamila KHEMIS, Claudine NIEDERST, Gisèle HILT, Marie-Pierre GRAMAIN et Irina BELICHENKO ; Ms Juan-José PADILLA, Frédéric JAFFRY, Arturo VERA et Emmanuel LAIDELLI ; Mmes Bernadette REYNIER, Dominique CHANEL, Vlada MELNIKOVA et Soria MALEM.

Enfin, je remercie le comité 54 de la Ligue Nationale Contre le Cancer, le Ministère Français des Affaires Etrangères et la Délégation Générale de la Palestine à Paris pour le soutien financier qu'ils ont apporté à ce travail.

A mes parents

A mon frère et mes sœurs

A mes amis

*Sans votre amour, votre patience et vos encouragements,
je n'aurais pas pu mener à bien ce travail.*

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS 1
REMERCIEMENTS 3
INTRODUCTION GENERALE 13

Première Partie

CONTEXTE BIOMEDICAL DE LA PHOTODETECTION DES CANCERS

INTRODUCTION 20

I. GENERALITES SUR LES CANCERS 21

I.1. LES CANCERS DE LA VESSIE 22
I.2. LES CANCERS DE LA VOIE AERO-DIGESTIVE SUPERIEURE 22
I.3. LES CANCERS BRONCHIQUES 23
I.4. DEFINITION DES CANCERS PRECOCES 24

II. METHODES CONVENTIONNELLES DE DIAGNOSTIC EN CANCEROLOGIE 26

II.1. EXAMEN ENDOSCOPIQUE 26
II.2. RADIOGRAPHIE 26
II.3. IMAGERIE PAR ECHOGRAPHIE 27
II.4. IMAGERIE PAR SCINTIGRAPHIE 28
II.5. IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE 29

III. PHOTODETECTION DES ETATS PATHOLOGIQUES TISSULAIRES 31

III.1. PHOTODETECTION PAR FLUORESCENCE 31

 III.1.1. *Phénomène de fluorescence - diagramme de Jablonsky* 32
 III.1.2. *Rendement quantique de fluorescence* 34
 III.1.3. *Principe de la photodétection par fluorescence* 35

 III.1.3.1. *Photodétection des cancers par fluorescence induite* 35
 III.1.3.2. *Photodétection des cancers par autofluorescence* 39
 III.1.4. *Techniques de détection et d'analyse de la fluorescence* 43

 III.1.4.1. *Spectroscopie de fluorescence* 45
 III.1.4.2. *Imagerie de fluorescence* 56
 III.1.5. *Revue de l'application clinique de la fluorescence induite en diagnostic* 60
 III.1.6. *Revue de l'application clinique de l'autofluorescence en diagnostic* 63

III.2. PHOTODETECTION PAR SPECTROSCOPIE RAMAN 69

 III.2.1. *L'effet Raman* 70
 III.2.2. *Potentiel diagnostique* 71

IV. LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE	74
IV.1. PRINCIPE DE LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE.....	74
IV.2. LA REACTION PHOTOCHEMIQUE (CONVERSION INTERSYSTEME DE JABLONSKI).....	76
IV.3. LE PHOTOSENSIBILISANT.....	78
IV.3.1. Spectres d'excitation et d'émission.....	80
IV.3.2. Propriétés pharmacocinétiques.....	81
IV.3.2.1. Biodistribution du photosensibilisant.....	81
IV.3.2.2. Sélectivité.....	82
IV.4. LA DOSIMETRIE EN PDT.....	83
CONCLUSION	87

Deuxième Partie

OPTIQUE ET INSTRUMENTATION ASSOCIEES A LA PHOTODETECTION

INTRODUCTION	90
I. SCHEMA DE PRINCIPE	91
II. SOURCES DE LUMIERE	93
II.1. LES LAMPES.....	93
II.2. LES LASERS.....	95
II.2.1. Principe de l'émission laser.....	95
II.2.2. Caractéristiques du rayonnement laser.....	96
II.2.2.1. Monochromaticité.....	96
II.2.2.2. Cohérence du faisceau.....	97
II.2.2.3. Puissance du faisceau.....	97
II.2.3. Classification des lasers.....	98
II.3. LES DIODES LASERS.....	100
II.3.1. Principe de fonctionnement des diodes lasers.....	100
II.3.2. Courant de seuil.....	102
II.3.3. Structure des diodes lasers.....	103
III. OPTIQUE DES TISSUS	105
III.1. DIFFUSION ET ABSORPTION DE LA LUMIERE.....	105
III.2. PARAMETRES OPTIQUES DES TISSUS.....	107
III.3. MODELES THEORIQUES DE PROPAGATION DE LA LUMIERE DANS LES TISSUS VIVANTS.....	109
III.3.1. Modèle à deux flux - modèle de Kubelka et Munk.....	109
III.3.2. La loi de Beer-Lambert.....	111
III.4. INFLUENCE DES PARAMETRES OPTIQUES SUR LE SIGNAL DE FLUORESCENCE.....	113

IV. FIBRES OPTIQUES	120
IV.1. PROPAGATION DE LA LUMIERE DANS UNE FIBRE OPTIQUE.....	120
IV.1.1. Réflexion totale.....	120
IV.1.2. Propagation en milieu inhomogène.....	121
IV.1.3. Types de fibres optiques.....	123
IV.1.3.1. Fibre multimode à saut d'indice.....	123
IV.1.3.2. Fibre multimode à indice variable.....	125
IV.1.3.3. Fibre monomode.....	126
IV.1.4. Connecteurs.....	127
IV.1.5. Coupleurs.....	129
IV.1.6. Pertes dans les fibres optiques.....	130
V. INSTRUMENTATION SPECTROSCOPIQUE	133
V.1.1. Spectrographe à réseau dispersif.....	133
V.1.1.1. Dispersion angulaire.....	134
V.1.1.2. Dispersion linéaire.....	134
V.1.1.3. Résolution spectrale et bande passante.....	135
V.1.1.4. Puissance ou pouvoir de résolution.....	138
V.1.1.5. Efficacité spectrale.....	139
V.1.1.6. Etendue géométrique.....	139
V.1.1.7. Flux lumineux.....	140
V.2. FILTRES INTERFERENTIELS.....	141
V.3. PHOTODETECTEURS.....	142
V.3.1. Paramètres des détecteurs optiques.....	143
V.3.1.1. L'efficacité quantique.....	144
V.3.1.2. Sensibilité.....	144
V.3.1.3. Réponse spectrale.....	144
V.3.1.4. Le rapport signal-bruit.....	145
V.3.1.5. Champ dynamique.....	146
V.3.1.6. Rapidité.....	146
V.3.2. Détecteurs monocanaux.....	146
V.3.2.1. Photodiode à avalanche (APD).....	146
V.3.2.2. Tube photomultiplicateur (PMT).....	148
V.3.3. Détecteurs multicanaux.....	149
V.3.3.1. Barrette de photodiodes « PDA ».....	150
V.3.3.2. Batterie de détecteurs à transferts des charges « CCD ».....	151
V.3.3.3. Intensificateur à galette de microcanaux « CCD Intensifiée ».....	153
VI. SYSTEME EXPERIMENTAL	154
VI.1. SCHEMA DU SYSTEME EXPERIMENTAL.....	154
VI.2. SOURCES D'EXCITATION LUMINEUSE.....	156
VI.2.1. choix de la longueur d'onde d'excitation.....	157
VI.2.2. Laser Krypton.....	161
VI.2.3. Laser Argon.....	161
VI.2.4. Lampe Xénon filtrée.....	161

VI.3. DETECTION	163
VI.3.1. Capteur à fibres optiques	163
VI.3.1.1. Conception.....	164
VI.3.1.2. Choix des fibres optiques.....	166
VI.3.1.2.1. Capteur à trois fibres optiques	168
VI.3.1.2.2. Capteur monofibre à couplage 50/50	169
VI.3.1.3. Influence de la géométrie du capteur sur l'intensité spectrale.....	170
VI.3.2. Analyseur optique multicanal "spectromètre"	176
VI.3.2.1. Efficacité de transmission spectrale du réseau de diffraction	179
VI.3.2.2. Efficacité quantique de la CCD.....	179
VI.3.2.3. Linéarisation de la Réponse globale du spectroscopie	180
VI.3.2.4. Calibration du spectromètre en longueur d'onde.....	184
VI.3.3. Couplage optique capteur - spectrographe	185
VI.4. PUISSANCEMETRE	189
VI.5. NORMALISATION DES SPECTRES.....	189
VI.6. SYNCHRONISATION ENTRE L'EXCITATION ET L'ACQUISITION DES SPECTRES.....	192
CONCLUSION	194

Troisième Partie

APPLICATIONS DE LA SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE A LA PHOTODETECTION

INTRODUCTION	197
I. APPLICATIONS CLINIQUES DE LA SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE EN DIAGNOSTIC	198
I.1. O.R.L. : AUTOFLUORESCENCE DES TISSUS SAINS ET DES LESIONS TUMORALES DE LA VOIE AERO-DIGESTIVE SUPERIEURE IN VIVO	198
I.1.1. Matériels et Méthodes.....	199
I.1.2. Résultats et discussion.....	199
I.2. UROLOGIE : AUTOFLUORESCENCE DES TISSUS SAINS ET DES TISSUS PATHOLOGIQUES DE LA VESSIE.....	208
I.2.1. Matériels et Méthodes.....	208
I.2.2. Résultats et discussion.....	209
I.3. PNEUMOLOGIE : AUTOFLUORESCENCE DES TISSUS SAINS ET DES LESIONS TUMORALES DES BRONCHES EX VIVO	219
I.3.1. Matériels et Méthodes.....	219
I.3.2. Résultats et discussion.....	219
I.4. ANALYSE GLOBALE DES RESULTATS	223
II. ETUDE EXPERIMENTALE DE L'INFLUENCE DES PARAMETRES OPTIQUES DES TISSUS SUR LE SIGNAL DE FLUORESCENCE.....	225
II.1.1. Matériels et méthodes.....	225
II.1.2. Résultats et discussion.....	227

II.1.2.1. Dépendance du coefficient d'absorption	228
II.1.2.2. Dépendance du coefficient de diffusion	229
II.1.2.3. Dépendance de l'absorption et de la diffusion réunies	230
III. PHARMACOCINETIQUE DES PHOTOSENSIBILISANTS EMPLOYES EN THERAPIE PHOTODYNAMIQUE	232
III.1. CINETIQUES DE L'HPD ET DE LA MTHPC SUR SOURIS "HAIRLESS" PORTEUSES DE PAPILOMES CUTANES INDUITS PAR VOIE CHIMIQUE	232
III.1.1. <i>Matériels et Méthodes</i>	232
III.1.2. <i>Résultats et discussion</i>	233
III.2. CINETIQUES DE LA MTHPC SUR SOURIS NUDES PORTEUSES DE TUMEURS HT29	240
III.2.1. <i>Matériels et Méthodes</i>	240
III.2.2. <i>Résultats et discussion</i>	241
III.3. EVALUATION DU TAUX DE PHOTOBLANCHIMENT DE L'HPD SUR TUMEURS PHOTOIRRADIEES	249
III.3.1. <i>Matériels et Méthodes</i>	249
III.3.2. <i>Résultats et discussion</i>	250
IV. MODELISATION DE LA FLUORESCENCE TISSULAIRE	253
IV.1. OBJECTIF DE LA MODELISATION	253
IV.2. ANALYSE SPECTRALE DE L'AUTOFLUORESCENCE	253
IV.3. SPECTRES DE FLUORESCENCE DES FLUOROPHORES ENDOGENE EN SOLUTION	254
IV.4. CHOIX DU MODELE	255
IV.4.1. <i>Spectre de fluorescence à bande unique</i>	255
IV.4.2. <i>Spectre de fluorescence à bandes multiples</i>	255
IV.5. INTERPRETATION DES PARAMETRES	256
IV.6. METHODE D'OPTIMISATION	258
IV.7. MODELISATION DES SPECTRES DE FLUORESCENCE DES FLUOROPHORES	261
IV.8. VALIDATION GRAPHIQUE DU MODELE SUR FANTOME	265
IV.9. APPLICATION DU MODELE GAUSSIEN A L'AUTOFLUORESCENCE TISSULAIRE	268
IV.9.1. <i>Modélisation du spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine</i>	269
IV.9.2. <i>Modélisation des spectres d'autofluorescence tissulaire</i>	271
IV.10. INTERETS CLINIQUES DU MODELE	277
CONCLUSION	278
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	280
BIBLIOGRAPHIE	283
LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS PERSONNELLES	307
LISTE DES FIGURES	311
LISTE DES TABLEAUX	321

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le cancer est un nom générique donné à un ensemble d'affections aux comportements très disparates et habituellement redoutables. Les signes cliniques, l'évaluation et le pronostic dépendent à la fois de l'organe touché et du type histologique de la maladie. Actuellement, la cause première du ou des cancers, c'est à dire la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse est mal connue et est liée à l'effet de différents facteurs environnementaux et/ou endogènes provoquant une altération du patrimoine génétique [Rosai 1993]. En effet, sont groupées sous le terme cancer les populations cellulaires dont la prolifération n'est plus régulée, qui envahissent les tissus sains et qui diffusent dans l'organisme sous forme de métastases. Tous les cancers (tumeurs malignes) répondent intégralement à cette définition. Certains processus malins forment des tumeurs solides, d'autres développés à partir des cellules du sang donnent les leucémies. Si certaines tumeurs ressemblent à des tissus normaux (très différenciés), d'autres ont perdu tout caractère de différenciation [Chardot 1991].

Il existe peu de procédés biologiques ou chimiques simples qui permettent, par la détection d'une substance anormale ou "marqueur", d'affirmer la malignité de la tumeur. Le diagnostic des cancers repose uniquement sur l'examen anatomopathologique. L'examen microscopique de la tumeur primaire ou de ses métastases est le seul examen qui identifie formellement un cancer et permet de décrire son type histologique.

La radiologie, l'échographie, la scanographie, la scintigraphie, la résonance magnétique nucléaire et l'endoscopie amènent chaque année des progrès permettant un diagnostic plus précoce. Cependant, l'image pathologique n'est détectable qu'à partir d'un certain seuil de dimension et la maladie peut être déjà parfois généralisée même si elle n'a pas encore d'expression clinique [Chardot 1991]. La détection précoce des cancers et des pré-cancers augmente considérablement la probabilité de succès des thérapies anticancéreuses essentiellement parce qu'elles interviennent plus tôt dans l'histoire de la maladie.

Il est donc essentiel de développer des outils diagnostiques ayant une meilleure résolution et explorant d'autres propriétés des tissus afin de détecter encore plus précocement ces états pathologiques.

L'analyse de la fluorescence tissulaire pourrait permettre la caractérisation des tissus pathologiques : c'est la "biopsie optique". Cette méthode consiste à éclairer les tissus à examiner par une lumière monochromatique de longueur d'onde appropriée correspondant, en général, au maximum d'absorption des fluorophores présents naturellement ou administrés dans les tissus. Les molécules ainsi excitées émettent un signal lumineux appelé "autofluorescence" s'il provient des fluorophores endogènes (naturels) des tissus, ou "fluorescence induite" s'il provient d'un fluorophore exogène préalablement administré au patient. L'analyse de ce signal de fluorescence peut être effectuée par deux techniques qui découlent l'une de l'autre : la spectroscopie et l'imagerie. Cette analyse pourrait permettre d'identifier des lésions néoplasiques infracliniques avec une sensibilité supérieure à celle des moyens d'investigation actuellement disponibles. L'avantage principal de cette technique non invasive repose sur son innocuité, car les longueurs d'onde utilisées ont un quantum énergétique inférieur à l'énergie d'ionisation des molécules biologiques.

L'exploitation de la fluorescence induite en sciences biomédicales est en progression permanente. La cytométrie en flux, le tri de cellules, la microscopie de fluorescence sont des techniques récentes basées sur l'utilisation de fluorophores exogènes comme marqueurs des composantes spécifiques des tissus ou des cellules [Tanke 1989, Andersson-Engels 1992, Periasamy 1994, Martin 1994, Mordon 1995]. Par contre, l'utilisation de l'autofluorescence tissulaire comme un outil clinique de diagnostic est moins développée. Néanmoins, son domaine d'application s'étend aux études des métabolismes tissulaires [Andersson-Engels 1992, Scholtz 1995, Cordeiro 1995], aux maladies cardio-vasculaires [Laufer 1989, Keijzer 1989, Chaudhry 1989, Ctruzzola 1989, Richards-Kortum 1991], à l'ophtalmologie [Docchio 1989] et à l'oncologie [Andersson 1986, Alfano 1989, Schomacker 1992, Lam 1995]. Nous nous sommes intéressés aux applications cliniques de la fluorescence tissulaire *in situ*. Cette technique pouvait d'une part apporter une aide au dépistage et au diagnostic des cancers, à la classification des tumeurs, à la localisation et à l'évaluation de l'extension des zones tumorales [Wilson 1986, Profio 1988, Kessel 1993, Deckelbaum 1989, Garrand 1991, Buchelt 1991, Panjehpour 1993].

D'autre part, la localisation et la quantification des fluorophores sont devenues des données importantes pour la dosimétrie de la thérapie photodynamique (PDT). Cette thérapie consiste à administrer au patient un agent chimique exogène, peu ou non toxique à

l'obscurité. Après la rétention préférentielle de cet agent dans les lésions néoplasiques, une irradiation lumineuse appropriée induit des processus photochimiques létaux [Brault 1995]. Cependant, la quantification précise du fluorophore dans les tissus n'est pas réalisée ce qui rend difficile la prévision de l'effet thérapeutique ; la mesure de l'intensité de la fluorescence induite par le photosensibilisant serait une réponse appropriée.

Les applications pour le dépistage, le diagnostic et la classification des tumeurs sont actuellement très limitées. Ainsi, le dépistage ou le diagnostic par autofluorescence semble être fondé sur la distribution des molécules fluorescentes en des proportions différentes entre les tumeurs malignes, les tumeurs bénignes et les tissus sains mais il est fortement tributaire des changements des propriétés optiques des tissus pathologiques [Andersson 1986, Qu 1995, Richards-Kortum 1989, Lam 1993, Mahadevan 1993]. En effet, le processus pathologique altère le micro-environnement tissulaire, ce qui cause des modifications dans les caractéristiques d'autofluorescence [Gomer 1991]. Par contre, la distinction entre les tissus pathologiques et les tissus sains par fluorescence induite est essentiellement basée sur la différence de rétention du fluorophore exogène ou de sa molécule porteuse.

Le fluorophore, dans un environnement donné, a des spectres caractéristiques d'excitation et d'émission. Ainsi, la détection de fluorescence peut être effectuée à une seule longueur d'onde d'excitation et une seule longueur d'onde d'émission. Cependant, pour obtenir un maximum d'information sur les caractéristiques du fluorophore, la mesure de fluorescence à plusieurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission est nécessaire. La matrice d'excitation et d'émission bidimensionnelle (2D-EEM) et la mesure de la durée de vie de la fluorescence par la détection à filtrage temporel peuvent apporter des informations complémentaires sur les milieux étudiés, comme la composition biochimique [Wolfbeis 1985, Richards-Kortum 1991, Ramanujam 1994, Sterenborg 1994, Schneckenburger 1987, Kohl 1993]. Le développement de ces méthodes fait appel aux progrès réalisés dans la technologie des sources lumineuses, en particulier les lasers, des fibres optiques et des détecteurs (CCD, PDA & Cameras intensifiées). Par exemple, l'analyseur optique multicanaux (OMA) a l'avantage de détecter des signaux de faible puissance sur une large étendue spectrale en temps réel.

L'acquisition de fluorescence en continu ou à filtrage temporel peut être réalisée par mesure spectroscopique ponctuelle (point par point) en utilisant un capteur à fibres optiques placé à l'intérieur ou à la surface du tissu examiné. Elle peut également être réalisée par imagerie de fluorescence permettant ainsi de visualiser la surface tissulaire. Les deux techniques peuvent être utilisées directement sur le site ou par voie endoscopique. Cependant, le signal de fluorescence est formé de la combinaison des émissions de plusieurs fluorophores qui peuvent se chevaucher pour une même longueur d'onde d'excitation. Ainsi, les deux approches nécessitent un traitement spécifique du signal de fluorescence après acquisition. Ce traitement peut être réalisé par la suppression du bruit de fond en imagerie ou par le calcul des ratios en spectroscopie après normalisation des signaux par rapport à un standard.

Le signal de fluorescence mesuré dépend de plusieurs facteurs :

- de la distribution spatiale de la lumière d'excitation qui dépend elle même des coefficients optiques des tissus et du coefficient d'extinction du fluorophore à cette longueur d'onde ;
- du rendement quantique de fluorescence à la longueur d'onde d'excitation ;
- de la concentration du fluorophore et de sa distribution spatiale dans le volume de détection ;
- de la fonction d'échappement de fluorescence qui détermine la probabilité que les photons émis se propagent dans la direction du capteur, qui dépend des coefficients optiques des tissus aux longueurs d'onde d'émission ;
- des paramètres instrumentaux tels que l'efficacité, la sensibilité et la géométrie des détecteurs qui sont déterminants dans la quantification du signal de fluorescence ;
- du bruit de fond composé d'autres fluorophores excitables à la même longueur d'onde.

Pour déterminer l'influence de chacun de ces facteurs sur le signal de fluorescence, plusieurs modèles numériques de simulation basés sur la méthode Monte-Carlo ont été développés [Van der Putten 1983, Richards-Kortum 1989, Keijzer 1989, Avrilier 1990, Baraga 1990, Cui 1992, Alexander 1992, Beuthan 1994, Etori 1996]. Ces modèles permettent d'étudier la distribution des fluorophores dans des milieux homogènes ou hétérogènes et tiennent compte de toute source d'excitation et toute géométrie d'excitation et d'acquisition. Cependant, des modèles analytiques de la propagation de la lumière permettent d'avoir des

approximations ou des solutions pour des cas restreints. La théorie de la diffusion a été utilisée pour étudier l'influence de l'addition d'un absorbant à la longueur d'onde d'excitation ou d'émission de fluorescence [Wilson 1986]. En utilisant le principe de l'excitation biphotonique, des longueurs d'onde supérieures à 600 nm ont été proposées pour éviter l'absorption par l'hémoglobine et s'affranchir de l'hétérogénéité des coefficients optiques des tissus [Denk 1990, Loschenov 1992]. La détection à filtrage temporel ou résolu dans le temps a été proposée pour supprimer le bruit de fond composé d'autres fluorophores excitables à la même longueur d'onde que le fluorophore étudié.

Comme nous avons pu le constater, de nombreuses difficultés liées au photodiagnostic des cancers font que son utilisation clinique est encore peu fréquente. Mais, vu les avantages que pourrait apporter la détection des états pathologiques par spectroscopie de fluorescence tissulaire, nous avons tenté de contribuer au développement de cette technique. Bien que le dépistage des cancers avec cette technique ne soit pas encore utilisable à grande échelle, son utilisation clinique pour la caractérisation des tumeurs précoces ou dans d'autres domaines de la pathologie reste intéressante pour cumuler les informations et en déduire les critères d'intérêt.

La spectroscopie de fluorescence tissulaire qui est basée sur l'analyse comparative des structures et des intensités spectrales mesurées sur des zones saines et des zones suspectes nécessite une normalisation des données spectrales par rapport à un standard. Le standard de normalisation idéal prendrait en compte toutes les variations instrumentales qui surviennent au moment de l'acquisition des spectres. La normalisation par rapport à la puissance d'excitation lumineuse rétrodiffusée peut aider à la validation de l'analyse comparative, car cette puissance peut être mesurée dans la même structure spectrale et par un moyen externe indépendant.

Dans ce travail, nous décrivons la méthodologie qui nous a amené à concevoir et à réaliser un capteur à trois fibres optiques intégré dans un système de détection de la fluorescence. Nous développons également certaines applications cliniques *in vivo* et *ex vivo* : l'autofluorescence des tissus sains et pathologiques de la cavité buccale, de la vessie et des poumons chez l'homme, l'étude pharmacocinétique des photosensibilisants employés en

thérapie photodynamique (l'Hématoporphyrine Dérivée "HpD" et la Méta-tétra (hydroxyphenyl)-chlorine "mTHPC") sur souris "nudes" et "hairless".

Un autre volet de notre travail a été consacré à la modélisation de la fluorescence tissulaire. Cette démarche a été motivée par le besoin d'identifier les fluorophores responsables de l'allure du spectre global de l'autofluorescence et de mettre en évidence l'influence de la réabsorption due aux chromophores tissulaires. L'identification de ces fluorophores a été réalisée à l'aide d'un modèle gaussien permettant de reconstruire toutes les composantes d'un spectre de fluorescence. Ce modèle qui a été établi à partir de données mesurées sur des fantômes simulant l'absorption, la diffusion et l'autofluorescence tissulaire a été appliqué à l'analyse des spectres mesurés *in vivo*.

PREMIERE PARTIE

**CONTEXTE BIOMEDICAL
DE LA PHOTODETECTION DU CANCER**

INTRODUCTION

Le diagnostic du cancer est plus ou moins aisé, suivant son siège anatomique, suivant la symptomatologie. L'examen clinique complet oriente le choix des examens complémentaires nécessaires qui permettent de localiser la lésion et d'en faire la biopsie [Chardot 1991]. Le diagnostic est affirmé par l'examen anatomopathologique du prélèvement.

Dans ce contexte, nous proposons d'étudier la photodétection des cancers, par autofluorescence ou par fluorescence induite associée à la thérapie photodynamique. Nous analysons son potentiel dans le dépistage et la possibilité de réaliser une "biopsie optique" pouvant remplacer les procédés ordinaires d'un examen anatomopathologique qui décrivent les deux signes du processus cancéreux :

- l'anarchie destructive des tissus (caractère architectural) ;
- les anomalies cellulaires (caractère cytologique).

Le premier chapitre de cette partie donne une présentation générale sur la maladie cancéreuse et sur la classification anatomopathologique des cancers des organes creux où les lésions sont endoscopiquement accessibles. La classification clinique TNM est également donnée pour chaque localisation tumorale afin de pouvoir corréler le stade de la lésion avec sa signature spectrale. Cette corrélation sera abordée dans les investigations expérimentales.

Les méthodes conventionnelles de diagnostic sont présentées dans le deuxième chapitre, leur principe physique, leur mise en œuvre ainsi que leur résolution y sont détaillés.

Le troisième chapitre traite le principe physique du phénomène de fluorescence et de l'effet Raman. Leur potentiel dans des applications diagnostiques en cancérologie est présenté grâce à une revue bibliographique des travaux menés par les divers groupes de recherche. Les techniques employées, l'origine biochimique des phénomènes et les résultats obtenus sont résumés dans cette étude.

Enfin, le quatrième chapitre présente le principe physique de la thérapie photodynamique anticancéreuse, l'importance de la dosimétrie et l'intérêt de la détection de fluorescence dans l'optimisation de cette thérapie.

I. GENERALITES SUR LES CANCERS

Un néoplasie est une altération de la croissance cellulaire. Il existe des néoplasmes bénins, qui sont caractérisés par l'absence d'invasion des structures anatomiques voisines et par l'absence de métastase. Les tumeurs malignes possèdent des cellules qui migrent par les systèmes vasculaires et lymphatiques et qui produisent des métastases. Elles détruisent l'organe sain dont elles sont issues et les organes voisins, et l'évolution naturelle se fait vers la mort par l'altération d'une fonction vitale ou par cachexie [Rosai 1993].

Ainsi, le terme "cancer" se rapporte à l'ensemble des néoplasmes malins dont plus de cent types décrits peuvent affecter l'homme. La classification de ces néoplasmes repose sur les caractères microscopiques des tissus tumoraux. Cette classification histo-pathologique distingue ainsi les carcinomes, les sarcomes, les leucémies et les lymphomes, les tumeurs embryonnaires malignes et les cancers du système nerveux central :

- les carcinomes sont les plus fréquents des cancers, ils se développent à partir des différents épithéliums de l'organisme (épithélium de revêtement malpighien ou paramalpighien, épithélium de revêtement cylindrique, épithélium des parenchymes) ;
- les sarcomes sont des tumeurs malignes de différents tissus mésenchymateux (muscles, os, tissus fibreux, cartilage, tissus adipeux, ...) ;
- les leucémies et les lymphomes affectent les processus hématopoïétiques (formation des cellules sanguines) et le système réticulo-endothélial (ganglions lymphatiques, rate) incluant les composants du système immunitaire ;
- les cancers embryonnaires sont constitués par des tissus et des cellules présents au cours de l'embryogenèse ;
- les tumeurs du tissu mélano-génétique (pigmentaire), ou mélanomes ;
- les cancers du système nerveux central forment un groupe très particulier, essentiellement du fait de leur localisation.

Nous détaillons tout particulièrement les épithéliomas malpighiens car la détection précoce de ce type de cancer, accessible directement ou par voie endoscopique, fait l'objet de notre investigation. Ces cancers sont ceux de la peau et des différentes muqueuses : voie aéro-digestive, appareil respiratoire, appareil digestif, appareil uro-génital, etc. ...

La classification anatomopathologique ainsi que la classification clinique TNM des tumeurs cancéreuses primitives de la vessie, de la voie aéro-digestive supérieure et des bronches sont données, ci-après, pour chaque localisation tumorale [Chardot 1991, Rosai 1993].

I.1. LES CANCERS DE LA VESSIE

Le carcinome urothélial à cellules transitionnelles représente 90% des tumeurs de la vessie et se manifeste par des lésions papillaires ou solides, unique ou multiples, superficielles ou infiltrantes.

Classification TNM pour les tumeurs primitives de la vessie

Tis : carcinome *in situ* ;

T1 : tumeur envahissant le tissu conjonctif sous épithélial ;

T2 : tumeur envahissant la musculature superficielle ;

T3 : tumeur envahissant la musculature profonde ou la graisse périvésicale;

T4 : tumeur envahissant l'une ou l'autre des structures suivantes : prostate, utérus, vagin, paroi pelvienne et paroi abdominale.

I.2. LES CANCERS DE LA VOIE AERO-DIGESTIVE SUPERIEURE

En très grande majorité, les cancers de la voie aéro-digestive supérieure sont des carcinomes épidermoïdes.

- Les carcinomes épidermoïdes sont précédés et généralement accompagnés par des lésions précancéreuses qui peuvent être étendues et plurifocales ;
- Les autres carcinomes :

- * Carcinome indifférencié surtout rencontré au niveau amygdalien ou rhinopharyngé ;
- * Carcinome glandulaire ou adénocarcinome développé à partir de l'épithélium cylindrique de la muqueuse respiratoire ;
- * Carcinome neuro-endocrine, tumeur agressive s'étendant précocement aux ganglions et à distance.

Classification TNM pour les tumeurs primitives de la voie aéro-digestive supérieure

Tis : carcinome *in situ* ;

T1 : tumeur de 2 cm ou moins dans sa plus grande dimension ;

T2 : tumeur de plus de 2 cm mais ne dépassant pas 4 cm dans sa plus grande dimension ;

T3 : tumeur de plus de 4 cm dans sa plus grande dimension ;

T4 : tumeur s'étendant aux structures voisines.

I.3. LES CANCERS BRONCHIQUES

Ce sont essentiellement les carcinomes nés du revêtement épithélial de l'arbre aérien trachéo-bronchique. La classification anatomopathologique des cancers bronchiques attribue 80% des tumeurs à quatre groupes principaux :

- Carcinome épidermoïde : la variété la plus fréquente a un aspect bourgeonnant ;
- Carcinome à petites cellules : ce sont des tumeurs très agressives qui donnent des métastases précoces et diffuses ;
- Carcinome à grandes cellules : ces tumeurs sont caractérisées par l'absence de différenciation glandulaire ou épidermoïde ;
- Adénocarcinome : tumeur à développement soit proximal, soit périphérique, intra-parenchymateuse suite à une prolifération de cellules glandulaires.

Classification TNM pour les tumeurs primitives des bronches

Tis : carcinome *in situ* ;

T1 : tumeur ne dépassant pas 3 cm dans sa plus grande dimension, entourée par le poumon ou la plèvre viscérale et sans signe endoscopique d'envahissement au-delà de la bronche lobaire ;

T2 : tumeur de plus de 3 cm ou envahissant la bronche souche à une distance d'au moins 2 cm de la carène ou envahissant la plèvre viscérale ou associée à une atélectasie qui ne s'étend pas au poumon tout entier ;

T3 : tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique, au diaphragme, à la plèvre médiastinale, au péricarde ou tumeur qui est à moins de 2 cm de la carène ou tumeur associée à une atélectasie du poumon entier ;

T4 : tumeur de toute taille envahissant le médiastin, ou le cœur, ou les gros vaisseaux ou la trachée, ou la carène, ou l'œsophage ou les corps vertébraux ou tumeur avec épanchement pleural malin.

I.4. DEFINITION DES CANCERS PRECOCES

Le terme cancer précoce englobe [Chardot 1991, Wagnières 1992, Rosai 1993] :

- les dysplasies épithéliales (légères, intermédiaires ou sévères) qui sont caractérisées par un processus de transformation partielle ou superficielle de l'épithélium.
- le carcinome *in situ* qui se manifeste par une perturbation complète de la différenciation cellulaire de l'épithélium sans infiltration dans la membrane basale. L'épaisseur d'une telle lésion est de l'ordre de quelques centaines de micromètres avec une extension en surface de quelques millimètres ;
- le carcinome intra-muqueux correspondant à un carcinome ne dépassant pas la muscularis mucosae ; c'est une variante de carcinome *in situ* lorsque l'épithélium n'est pas limité par une membrane basale ;

Ces formes, dysplasies et carcinomes *in situ*, sont des états précancéreux. La transformation est limitée à l'épithélium et de ce fait il n'y a pas de risque de dissémination métastatique.

- le carcinome micro-invasif qui présente de minimes effractions de la membrane basale et dont l'infiltration tumorale ne doit pas atteindre les premières couches musculaires ou ne doit pas dépasser la muscularis mucosae, selon la localisation anatomique ;
- le carcinome sous-muqueux dépassant la muscularis mucosae mais n'infiltrant pas la musculuse.

Selon la classification TNM, ces cancers précoces appartiennent aux groupes Tis et T1.

II. METHODES CONVENTIONNELLES DE DIAGNOSTIC EN CANCEROLOGIE

Les radiations électromagnétiques X, γ , radiofréquences et ultrasonores agissent sur les tissus de diverses façons. Basées sur différentes interactions avec le tissu, plusieurs techniques d'imagerie médicale ont été développées au cours de ce siècle. Nous présentons dans ce chapitre un rappel sur les principes des techniques de diagnostic fréquemment utilisées en cancérologie en montrant leurs avantages et leurs inconvénients. Nous rappelons également que la résolution de ces techniques est un facteur déterminant pour la détection des anomalies tissulaires ; elle est, en général, fonction du moyen d'investigation et de l'organe supposé malade.

II.1. EXAMEN ENDOSCOPIQUE

L'endoscopie consiste à introduire dans les différents organes creux accessibles (œsophage, rectum, bronches, vessie, etc.), ou parfois même dans des cavités closes (plèvre, péritoine) des tubes munis d'optiques, permettant de voir la forme, la couleur et l'état des tissus et de faire si nécessaire des biopsies. Ces investigations chez un malade bien préparé sont peu douloureuses. C'est à de telles endoscopies, faites précocement, que l'on doit la découverte de petits cancers du rectum guérissables, du cancer du col utérin (colposcopie) ou de tumeurs ovariennes (coelioscopie) [Kurtz 1993]. Dans certains endoscopes la partie optique de l'extrémité distale et le faisceau de fibres optiques du canal d'observation ont été remplacés par une matrice de capteurs CCD, le transport de l'information se fait ainsi sous forme d'un signal électrique ce qui permet d'améliorer la qualité de l'image observée sur un moniteur en temps réel [Falcoz-Vigne 1992]. L'utilisation de colorants vitaux comme le Lugol, le Patent Blue V ou le bleu de Toluidine associée à l'endoscopie permet une meilleure détection de cancers en phase précoce [Wagnières 1992].

II.2. RADIOGRAPHIE

Les rayons-X sont les radiations utilisées pour produire la majorité des images médicales. Les photons transmis à travers le corps du patient ou des tranches minces du site faisant l'objet de l'observation sont enregistrés sur un film radiographique, un écran cathodique ou

par des détecteurs d'images intensifiés. Les variations d'intensité lumineuse observées sur l'image radiographique reflètent la variation du nombre atomique des différentes molécules qui composent les structures anatomiques. Les structures ayant un coefficient d'atténuation important, comme les os, absorbent plus que les tissus mous (parenchymes, sang) plus que la graisse et plus que l'air. En scanographie ou tomodensitométrie, un système informatique transforme les variations du coefficient d'atténuation d'un faisceau de rayons-X en variations d'intensité lumineuse sur un écran cathodique, reconstituant ainsi l'image du site par déplacement [Castallino 1993].

Les examens radiographiques sont multiples, sans préparation ou avec opacification du tractus digestif, des voies excrétrices urinaires, des vaisseaux, etc... L'image radiographique réalisée par ces techniques permet de détecter des anomalies tissulaires avec une résolution d'environ 1 cm³ si l'examen est bien orienté [Chardot 1991, Falcoz-Vigne 1992]. Elle donne d'excellents résultats dans la localisation des tumeurs intrathoraciques et abdominales, ainsi que dans la recherche de lésions cérébrales.

L'avènement du scanner 2D multiplan et 3D volumique a permis d'ouvrir d'autres perspectives pour le diagnostic, pour le bilan d'extension et pour améliorer le domaine de la radiothérapie. Les scanners à rotation continue et à balayage hélicoïdal volumique permettent la détection de nodules d'une taille inférieure à 5 mm [Buthiau 1994]. Ils détectent 30% de lésions en plus qu'avec un scanner standard. Ce dernier, détecte entre 12 et 20 fois plus de lésions nodulaires qu'avec la radiologie standard. Dans certains mammographies, la résolution peut atteindre 2 mm [Amiel 1982].

II.3. IMAGERIE PAR ECHOGRAPHIE

Les ondes ultrasonores interagissent avec le tissu de diverses façons : transmission, réflexion, réfraction, diffraction, diffusion et absorption. La nature précise de ces interactions est déterminée par les caractéristiques du tissu cible, la fréquence, la longueur d'onde relative à la taille de la cible, l'orientation du rayon ultrasonore vers l'interface acoustique et l'impédance acoustique du tissu. Cette dernière dépend de l'élasticité et de la densité du tissu, elle est plus grande dans les tissus solides que dans les liquides ou la graisse. La réflexion est le paramètre le plus influencé par la variation de l'impédance

[Castellino 1993]. Ainsi, le principe de l'échographie repose sur l'analyse de l'écho du faisceau des ondes ultrasonores réfléchi à partir des structures anatomiques. L'échographie bidimensionnelle, pratiquée avec une sonde rectangulaire à éléments multiples ou avec une sonde à un seul élément qui effectue un balayage angulaire, donne l'image statique ou dynamique de l'organe exploré. Elle permet d'en faire l'étude dans l'espace quand ces coupes sont répétées suivant plusieurs plans parallèles. Cette technique tient une place de choix parmi les méthodes de diagnostic grâce à son innocuité et à la facilité de mise en œuvre d'un examen. Les fréquences utilisées en échographie sont comprises entre 2,5 et 20 MHz. Dans certaines localisations tissulaires et à une fréquence de transducteur de 7,5 MHz, la résolution axiale de cette technique peut atteindre 0,6 mm [Castellino 1993]. Mais, à cette fréquence la profondeur de pénétration des ondes ultrasonores est relativement faible. L'échoendoscopie permet l'exploration de la paroi d'organes creux (œsophage, estomac, rectum, vessie, voies biliaires).

Cette méthode présente parfois des difficultés d'interprétation de l'image obtenue, surtout si des différences importantes dues à la présence de zones aréiques font écran avec l'organe observé. La possibilité de coupler la sonde avec un trocard pour une cytoponction donne à cette méthode une importance grandissante dans l'exploration de certains organes, foie et prostate en particulier [Falcoz-Vigne 1992].

II.4. IMAGERIE PAR SCINTIGRAPHIE

La scintigraphie est un procédé de diagnostic consistant à suivre le cheminement dans l'organisme d'un isotope radioactif émetteur de rayons γ (gammagraphie). L'isotope radioactif dont on veut suivre le cheminement dans l'organisme est introduit par voie buccale, intraveineuse ou sous-cutanée. Le rayonnement qu'émet cet isotope donne des renseignements topographiques sur la fonction de l'organe observé, sur son intégrité, sur ses modifications tissulaires [Giron 1992]. La scintigraphie fait appel à des marqueurs radioactifs. Les marqueurs fonctionnels ont la propriété de se concentrer dans un organe ou un tissu normal. Les zones hypoactives (tumeurs thyroïdiennes, hépatiques, ...) traduisent des fonctions cellulaires altérées ou la présence de cellules étrangères, alors que des zones néoplasiques ou inflammatoires se traduisent par la présence d'un foyer hyperactif (scintigraphie osseuse). Les marqueurs directs indiquent la vascularisation et la perméabilité

anormale d'un tissu (scintigraphie cérébrale). Certains anticorps monoclonaux sont utilisés comme vecteurs d'un élément radioactif, révélant l'existence de foyers porteurs antigéniques sous forme de zones hyperactives (on citera le CA 125 pour la détection de tumeurs ovariennes et l'ACE ou le CA 19,9 pour le cancer du côlon).

Cette technique de détection a des limites, la principale étant le gradient de concentration du marqueur dans la tumeur par rapport aux tissus sains, de l'ordre de 1,5 à 3 (scintigraphie conventionnelle) rarement supérieur à 5 (Gamma tomographie). La scintigraphie pulmonaire a sa place dans le cadre du bilan de l'état pulmonaire qui précède la décision d'opérabilité : bilan de l'état fonctionnel de la sténose, bilan de l'état fonctionnel du reste du parenchyme pulmonaire, évaluation prévisionnelle de l'état après exérèse La résolution spatiale de la gamma-tomographie (tomographie par émission) est définie par la largeur à mi-hauteur d'une raie ou par la distance minimale d'espacement entre deux raies. Pour des fantômes simulant les milieux tissulaires, elle est de l'ordre de 15,5 mm. Cependant, la plus petite lésion détectée avec de telles techniques a un diamètre de 10 mm [Giron 1992]

II.5. IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) consiste à employer le principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui est basée sur le comportement de certains noyaux atomiques formés d'un nombre impair de protons et neutrons. Quand ces noyaux sont soumis à un champ magnétique intense, leur rotation autour de leur axe interne (spin) provoque leur oscillation autour de l'axe du champ magnétique externe. Cette fréquence d'oscillation ou fréquence de Larmor est spécifique à chaque espèce de spin nucléaire. Ainsi, l'IRM consiste à chercher la fréquence qui fait entrer en résonance des noyaux atomiques identiques. La fréquence de Larmor étant proportionnelle à l'intensité du champ magnétique appliqué, on place la zone à étudier dans un champ magnétique extrêmement intense (de l'ordre du Tesla). Par conséquent, un plus grand nombre de noyaux est entraîné dans l'oscillation ce qui permet d'améliorer la qualité de l'image reconstruite par cette méthode.[Castallino 1993]. Les atomes possédant un moment magnétique s'alignent soit dans le sens du champ, soit dans le sens contraire, créant ainsi deux populations à alignement direct ou inverse. En appliquant un champ supplémentaire alternatif à la fréquence de résonance, on fait passer les atomes d'une population à l'autre. Cette fréquence

dépend des caractéristiques liées à la structure moléculaire du milieu. Elle dépend en particulier de la présence d'isotopes d'éléments chimiques (hydrogène, carbone, phosphore) dont la réaction au champ magnétique varie avec les déplacements de densités électriques autour du noyau (présence de groupes polaires dans la molécule), mais aussi avec les couplages avec des noyaux identiques voisins. Les zones saines sont différenciées des zones malades par des temps de relaxation différents.

En cancérologie, l'imagerie par résonance magnétique du système nerveux central, des os et des "parties molles" donne des informations anatomiques très précises, avec une bonne délimitation des zones tumorales et une définition précise de leur structure interne [Falcoz-Vigne 1992]. Pour une coupe de 7 mm d'épaisseur, la résolution d'une image IRM peut atteindre 2 mm [Amiel 1982]. Les nouveaux systèmes permettent de réaliser des coupes très fines de l'ordre d'un millimètre en 2D et 0.4 mm en 3D. De tels systèmes permettent d'avoir de très hautes résolutions [Langevin 1994].

III. PHOTODETECTION DES ETATS PATHOLOGIQUES TISSULAIRES

Malgré tous les progrès réalisés sur les moyens de diagnostic en cancérologie, il reste difficile de dépister les cancers en phase précoce. Par conséquent, de nouvelles méthodes de dépistage qui visent à raccourcir le délai entre l'émergence d'une tumeur et sa détection sont en cours de développement. L'une des plus prometteuses est la photodétection. C'est une discipline qui englobe toutes les méthodes ayant pour objet d'étudier l'interaction des photons non ionisants avec les biomolécules à des fins diagnostiques. Il s'agit d'analyser tout changement de propriétés optiques des tissus, des caractéristiques de fluorescence ou de micro-environnement physico-chimique dus au processus de transformation des cellules saines en cellules cancéreuses.

L'étude des propriétés physiques et physico-chimiques des tissus se fonde principalement sur l'analyse de la fluorescence, de la diffusion Raman et de la réflectance lumineuse diffuse. Cette dernière, peut être destinée à la quantification des fluorophores exogènes dans les tissus [Bigio 1994, Bigio 1996, Yang 1996, Zhadin 1996]. Dans ce chapitre nous analysons la photodétection des cancers par fluorescence en s'appuyant sur l'origine physico-chimique et biochimique de ce phénomène. Nous introduisons également la spectroscopie Raman comme une technique différente de photodiagnostic qui peut utiliser les mêmes longueurs d'onde d'excitation que la fluorescence.

III.1. PHOTODETECTION PAR FLUORESCENCE

L'analyse des états excités électroniques constitue la base fondamentale du photodiagnostic par fluorescence. L'énergie électronique acquise par la molécule étant caractéristique, les fréquences et les intensités émises durant le processus de désactivation moléculaire reflètent son "empreinte spécifique". La fluorescence étant une grandeur physique mesurable, elle permet de caractériser les molécules simples et complexes et de donner une interprétation tangible des structures biochimiques des tissus.

Le principe de la méthode de dépistage des lésions très superficielles, cancers précoces et états précancéreux, repose sur l'analyse de la fluorescence naturelle ou de la fluorescence de colorants "sélectifs". En ce qui concerne la photodétection des états pathologiques par fluorescence induite, les recherches portent sur des marqueurs, non ou peu toxiques, ayant une sélectivité tumorale élevée et un rendement quantique de fluorescence important. En autofluorescence tissulaire, les recherches ont pour objets d'une part l'identification des fluorophores responsables de l'émission de l'autofluorescence, l'optimisation du choix de la longueur d'onde d'excitation et l'analyse des changements du micro-environnement biochimique. D'autre part, elles consistent à définir les critères et les seuils de discrimination entre les tissus sains et les cancers par l'analyse multivariable des données spectrales. Peut-on ou non différencier les tissus sains des tissus tumoraux et ainsi valider la méthode ? Le perfectionnement des systèmes optiques, l'amélioration de la sensibilité de détection et l'optimisation du traitement du signal s'avèrent primordiaux dans cette application. Le développement des modèles numériques et analytiques permettant de prendre en compte l'influence de la géométrie d'excitation et de détection, et de mettre en évidence la migration des photons dans les tissus aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission doivent assurer l'appui théorique de la photodétection.

III.1.1. Phénomène de fluorescence - diagramme de Jablonsky

Les photons qui ont des longueurs d'onde situées dans l'ultraviolet et le visible ont une énergie suffisante pour générer une excitation électronique spécifique des molécules. Deux types de processus photophysiques permettent à la molécule excitée de dissiper son énergie excédentaire : les processus de désactivation non radiative et les processus de désactivation radiative ou luminescence. Selon le spin (mode de rotation de l'électron sur lui-même), on distingue deux états excités caractérisés d'énergie et de nature différente : l'état singulet instable (S) et l'état triplet métastable (T). Si l'émission radiative se produit entre deux états de même multiplicité (singulet excité - singulet fondamental), le phénomène est appelé *fluorescence*. Si l'émission se produit entre deux états de multiplicité différente (triplet - singulet fondamental), le phénomène est appelé *phosphorescence* [Barriol 1970, Courtot 1972].

En effet, à l'état fondamental, une molécule est dite stable. Dans la très grande majorité des cas, les molécules susceptibles de fluorescer dans le visible possèdent un système d'électrons appariés dans cet état. Cependant, le principe de Pauli précise que, au plus, deux électrons peuvent parcourir la même orbitale dans l'état fondamental et sont alors de spins opposés [Forrer 1995]. Par conséquent, le spin global de la molécule $S = \sum s$ est nul, et l'état fondamental est un état "singulet" de repos. Les électrons de la couche périphérique se trouvent alors sur l'orbitale disponible de plus faible énergie, ou orbite "liante". Puisque les échanges d'énergie avec le rayonnement électromagnétique se font par saut d'énergie, les électrons passent d'une orbitale quantique à une autre. Après l'absorption d'un photon de longueur d'onde λ suffisamment énergétique (dans la bande d'absorption des molécules), il se produit un apport d'énergie $E=hc/\lambda$ (où h est la constante de Plank et c est la célérité de la lumière) que les électrons absorbent. Ils accèdent alors à un niveau d'énergie plus élevé et la molécule se trouve dans un état énergétique supérieur : elle est dite "excitée". Les niveaux d'énergie atteints étant par nature instables, la durée de vie d'un électron sur un tel niveau est de l'ordre de quelques nanosecondes. La molécule "excitée" devient alors le siège d'une série de réactions dont les manifestations sont diverses, jusqu'à son retour à l'état stable. Le diagramme de Jablonsky (Figure 1) schématise l'ensemble du processus d'excitation et de désactivation [Courtot 1972, Brault 1995].

Des électrons réintègrent directement leur orbitale initiale par un mécanisme de conversion interne (CI) très rapide (10^{-12} seconde). D'autres atteignent des orbitales intermédiaires par vibration et relaxation internes, entre un état excité et un état d'énergie inférieure de même multiplicité de spin. La durée d'un tel processus est également de l'ordre de 10^{-12} seconde. De ces orbitales, ils rejoignent leur niveau stable, en émettant un photon. Cette transition radiative constitue la fluorescence. Les photons émis par fluorescence ont une énergie plus faible que celle des photons absorbés (loi de Stokes) puisque la transition de fluorescence a lieu entre le niveau le plus bas de S_1 et un niveau élevé de S_0 tandis que la transition d'absorption a lieu entre le niveau le plus bas de S_0 et un niveau quelconque plus élevé de S_1 [Andersson 1987, Forrer 1995]. Le spectre d'émission de fluorescence est décalé vers des longueurs d'onde plus grandes que la longueur d'onde d'excitation.

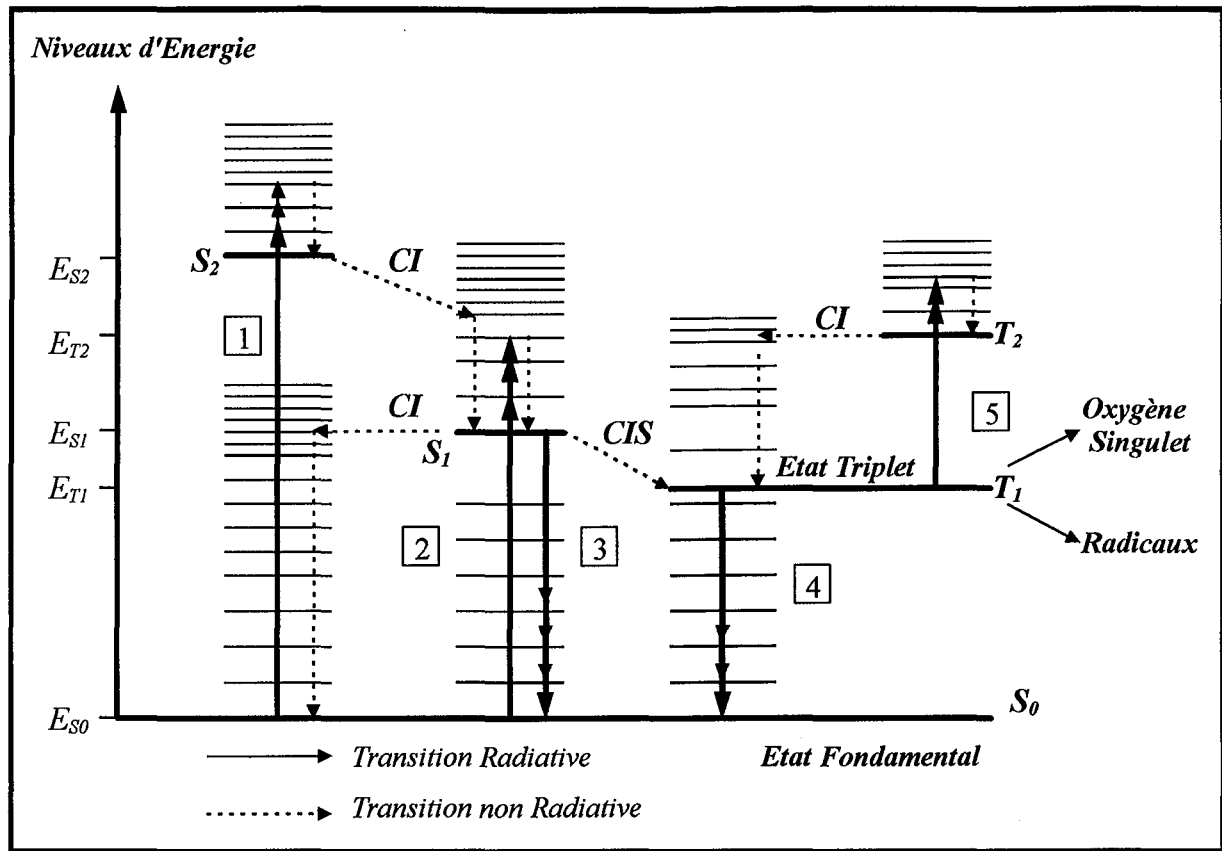


Figure 1 : Diagramme de Jablonsky, 1: absorption $S_0 - S_2$; 2: absorption $S_0 - S_1$; 3: fluorescence ; 4: phosphorescence ; 5: absorption triplet - triplet ($T_1 - T_2$).
 CI: Conversion interne, CIS: Conversion inter-système.

III.1.2. Rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence Φ_F correspond au rapport du nombre de photons de fluorescence émis, quelques soient leurs fréquences, au nombre de photons absorbés pendant le même temps [Profio 1988].

$$\Phi_F = \text{Photons émis} / \text{Photons absorbés}$$

La nature du solvant, sa viscosité, son pH et d'autres paramètres dont la température ont une influence directe sur le rendement quantique. En ce qui concerne le photodiagnostic, on recherche un fluorophore possédant un rendement de fluorescence très élevé car cela peut considérablement augmenter la sensibilité de détection. Puisque la fluorescence et l'état triplet proviennent du même état singulet, un fluorophore ne peut pas posséder à la fois des

caractéristiques optimales pour le photodiagnostic et pour la photothérapie [Wagnières 1992]. Le rendement de transition dans un état triplet Φ_{CIS} (conversion intersystème) sera un peu moindre par rapport à sa valeur théorique, car le rendement de l'ensemble des processus photophysiques de désactivation y compris la désactivation non radiative Φ_{T} (thermique) est égal à 1 :

$$\Phi_{\text{F}} + \Phi_{\text{CIS}} + \Phi_{\text{T}} = 1$$

Par ailleurs, la concentration en molécules fluorescentes dans le solvant revêt une grande importance sur l'intensité de fluorescence émise. On pourrait a priori penser que celle-ci est proportionnelle à la concentration, mais pratiquement, à cause des phénomènes physico-chimiques comme le "quenching", on remarque qu'il existe une concentration optimale pour laquelle l'intensité de fluorescence, à une excitation donnée, est maximale [Tisserand 1987]. Ainsi, le rendement de fluorescence doit être calculé à une concentration optimale car la connaissance exacte de ce paramètre est nécessaire pour l'établissement de toutes simulations et modélisations quantitatives de la fluorescence induite.

III.1.3. Principe de la photodétection par fluorescence

Les fluorophores sur lesquels la photodétection des cancers est basée peuvent être exogènes ou endogènes. Ainsi, il y a deux méthodes de photodétection : la photodétection par fluorescence induite et la photodétection par autofluorescence.

III.1.3.1. Photodétection des cancers par fluorescence induite

La photodétection des cancers par fluorescence induite repose sur la rétention préférentielle, dans les tissus pathologiques, d'un fluorophore exogène. Le développement des fluorophores exogènes comme marqueurs tumoraux a été essentiellement une conséquence de la thérapie photodynamique. Ainsi, les fluorophores exogènes employés en diagnostic sont généralement des photosensibilisants qui possèdent une activité photochimique toxique pour les tissus.

Parmi les fluorophores exogènes ou les photosensibilisants de familles chimiques différentes, les porphyrines sont apparues particulièrement intéressantes depuis les travaux de

Policard : l'observation d'une autofluorescence spontanée des tumeurs animales sous lumière de Wood lui laissait supposer l'existence de composées porphyriniques dans les tumeurs [Policard 1924]. Cette fluorescence sous lumière U.V. était plus intense après injection d'hématoporphyrine à l'animal porteur de tumeur. En 1940, il a été prouvé que les porphyrines et particulièrement l'hématoporphyrine administrée aux patients s'accumule essentiellement dans les tissus malins, les embryons, les tissus traumatisés, la peau, le foie et en général dans les tissus qui ont une croissance accélérée. D'autres marqueurs ont été étudiés pour des applications cliniques, comme l'eosine, la fluorescéine, la tétracycline, l'orange d'acridine et la phenoxazine, soit seuls, soit plus souvent couplés avec un anticorps monoclonal [Kato 1985, Andersson-Engels 1992].

Dans les années 1970, l'HpD a été utilisée comme marqueur "sélectif" fluorescent pour le diagnostic des cancers. Les premiers essais cliniques ont été effectués sur des patients ayant des tumeurs des bronches, de l'œsophage, du col de l'utérus, du vagin et de la vessie [Santus 1991]. Ces essais ont confirmé une certaine sélectivité de l'HpD [Andersson-Engels 1992]. Cependant, beaucoup de questions concernant la rétention et la microlocalisation des composés fluorescents de l'HpD se sont posées. En fait, l'HpD est un mélange de plusieurs formes de porphyrines : monomères, dimères et agrégats. Deux tiers de l'HpD sont des porphyrines monomères qui sont hydrophobes et par suite pénètrent efficacement dans la membrane de la cellule. Cependant, les dimères et les agrégats des porphyrines sont plus hydrophobes que les monomères et forment la fraction principale permettant le traitement des tumeurs. Les propriétés physiques des dimères diffèrent de celles des monomères, elles peuvent être distinguées par spectroscopie de fluorescence résolue dans le temps. Les caractéristiques de fluorescence sont très sensibles au pH, à la force ionique, à la température et à la concentration en molécules [Wilson 1986, Manyak 1988, Santus 1991, Berenbaum 1993].

D'autres photosensibilisants pour le diagnostic des cancers et pour la thérapie photodynamique ont été proposés (Tableau 1). La metalloporphyrine a été proposée pour le diagnostic des cancers car elle fluoresce vers l'infrarouge proche à 900 nm où les propriétés optiques des tissus sont plus homogènes. Une autre approche a été basée sur l'association d'un marqueur non toxique ayant un rendement quantique de fluorescence important à des anticorps monoclonaux sélectifs de certaines lésions tumorales [Andersson-Engels 1992].

Des études récentes ont montré que l'association de la fluorescéine à un anticorps (anti-antigène carcinoembryonnaire) a permis de localiser des tumeurs avec un ratio supérieur de 8 fois à celui de l'HpD pour la même dose injectée [Pélegrin 1991, Andersson-Engels 1992].

Tableau 1 : Données spectrales des fluorophores exogènes employés en diagnostic.

Fluorophore	Pics d'absorption maximale [nm]	Pics d'émission maximale [nm]	Référence
Hématoporphyrine et ses dérivés HpD, Photofrin I & Photofrin II	405, 520, 630	630	Profio 1980-87, Kato 1986, Wagnières 1992
Méta-tétra(hydroxyphényl) chlorine (mTHPC)	420, 520, 652	652	Forrer 1995
Benzoporphyrine dérivée (BPD)	435, 593, 630, 692	692	Andersson-Engels 1992, Vari 1993
Metalloporphyrine	-	900	Andersson-Engels 1992
Zinc Phtalocyanine (ZnPC)	343, 607, 671	671	Panjehpour 92-93
Vert d'Indocyanine couplé à des anticorps monoclonaux (MAB-IC)	652	667	Forrer 1995
Protoporphyrine IX par acide aminolévulinique (ALA-PPIX)	405, 635	635, 700	Forrer 1995
Fluorescéine couplée aux anticorps (anticarcinoembryonnaire antigène (anti-CEA) monoclonal	488	515	Pélegrin 1991 Wagnières 1991

Pour réaliser le diagnostic par fluorescence induite, on administre au patient, par voie intraveineuse ou topique, une dose de l'un de ces fluorophores exogènes.

Après un intervalle de temps caractéristique du fluorophore employé (24-96 heures, si le produit est administré par voie intraveineuse ou 2-4 heures si le produit est administré par instillation), le fluorophore se fixe dans les tissus pathologiques. Après ce laps de temps, on irradie les tissus avec une lumière monochromatique de longueur d'onde correspondant au maximum d'excitation du fluorophore ciblé. Ainsi, la détection d'une forte fluorescence,

dans la bande d'émission du fluorophore, permet de désigner les zones irradiées comme des zones pathologiques [Wagnières 1992, Falcoz-Vigne 1992, Diller 1994]. La figure 2 schématise le principe de la photodétection par fluorescence induite.

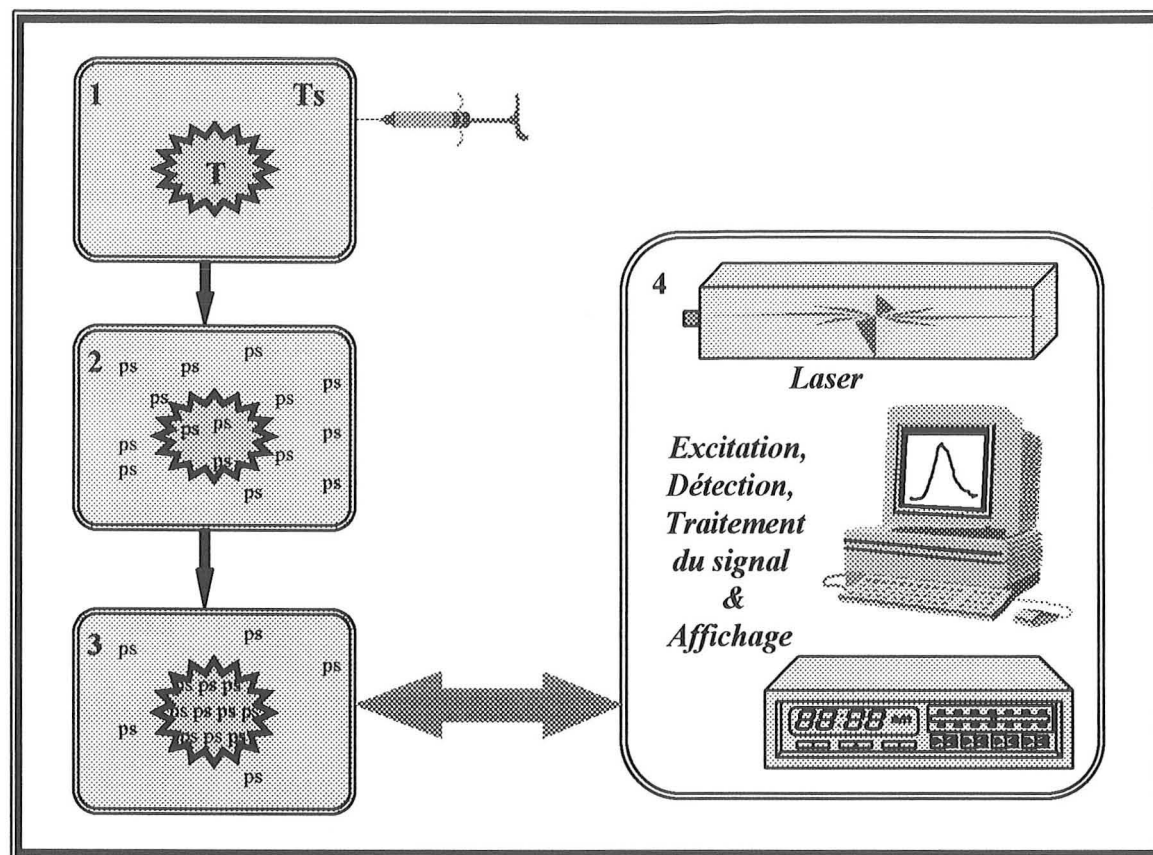


Figure 2 : Principe de la photodétection des lésions tumorales par fluorescence induite. 1-Injection du fluorophore ; 2-Répartition du fluorophore dans l'organisme ; 3-Rétention préférentielle dans les tissus pathologiques, essentiellement cancéreux ; 4-Excitation lumineuse résonante et détection de fluorescence. T: tumeur, Ts : tissu sain.

Cependant, pour que la photodétection soit optimale, le fluorophore choisi doit se fixer sélectivement dans les cellules cancéreuses et avoir un rendement quantique de fluorescence important à une longueur d'onde correspondant à un pic d'excitation pénétrant suffisamment dans les tissus examinés.

III.1.3.2. Photodétection des cancers par autofluorescence

La photodétection des cancers par autofluorescence repose sur la différence structurelle et énergétique de l'émission due aux fluorophores naturellement répartis dans les tissus sains et les tissus pathologiques. Ainsi, aucune administration préalable d'un produit aux patients n'est nécessaire. Cependant, la notion d'une excitation résonante dans cette application est exclue car on ignore l'identité du fluorophore endogène permettant une distinction optimale des tissus pathologiques.

L'origine biochimique de la fluorescence tissulaire est généralement déterminée par des matrices d'excitation et d'émission bidimensionnelles ou par spectroscopie à filtrage temporel. Ces méthodes utilisent la différence de durée de vie de la fluorescence produite par chaque fluorophore [Höhne 1995, Pfeifer 1995, Wolfbeis 1985, Richards-Kortum 1991, Sterenborg 1994]. L'origine biochimique peut également être déterminée par l'étude microscopique ou microspectrométrie de fluorescence. Ces techniques permettent de mettre en évidence la localisation intracellulaire ou extracellulaire ainsi que la distribution des fluorophores dans les tissus [Zeng 1995, Fiarman 1995, Römer 1995, Anidjar 1996, Zoinios 1996]. Une autre approche qui permet l'identification des fluorophores dans les tissus consiste à analyser séparément les caractéristiques des extraits tissulaires fluorescents en solution et ensuite les comparer avec l'autofluorescence tissulaire [Baraga 1990, Schomaker 1992]. Pour valider cette comparaison, on tient compte de l'influence de la réabsorption des chromophores tissulaires comme l'oxyhémoglobine et la mélanine.

Par ces moyens, la majorité des fluorophores endogènes qui peuvent être utilisés en oncologie et qui sont à l'origine de l'autofluorescence ont été identifiés (Tableau 2). Les propriétés d'excitation et d'émission de ces fluorophores ont été employées pour la caractérisation des tissus pathologiques [Richards-Kortum 1989, Schomaker 1992].

En réalité, du fait que les spectres d'absorption de différents fluorophores naturels ont une grande largeur spectrale, ils se recouvrent dans une bande d'absorption donnée mais avec des absorbances différentes [Andersson-Engels 1992]. L'absorption de la plupart de ces fluorophores est plus importante dans le bleu et l'ultraviolet que dans le visible. Ainsi, l'autofluorescence induite dans l'ultraviolet est plus structurée et intense que celle induite

dans le visible mais les spectres d'émission se chevauchent et sont donc plus difficiles à interpréter.

Tableau 2 : Données spectrales des fluorophores endogènes mesurés en solution.

Fluorophore	Solvant	Pic d'excitation maximale [nm]	Pic d'émission maximale [nm]	Durée de vie [ns]	Référence
Phénylalanine	-	260	282	-	Ettori 96
Tyrosine	-	275	303	-	Ettori 96
Tryptophane	PBS	275	350	2,8 1,5	Andersson-Engels 92 Richards-Kortum 91 Andersson 86
Collagène	état fibreux	270	310	9,9	Andersson-Engels 92
		285	395	5,0	Richards-Kortum 91
		340	395-410	0,8	
Elastine	-	260	410	6,7	Andersson-Engels 92
		360-370	410-415	1,4	Richards-Kortum 91
		425	490	7,8	
		460	520	2,6 0,5	
Nicotinamide adénine dinucleotide, forme réduite (NADH) et sa forme Phosphate NADPH	PBS	350	460	0,6-0,66 0,2-0,25	Andersson-Engels 92 Richards-Kortum 91 Pfeifer 95
Flavine mononucleotide "riboflavine-5" (FMN)	PBS	440-450	520	2,2 4,6-4,7	Pfeifer 95 Andersson-Engels 92 Andersson 86 Alfano 89
Beta-carotène	-	-	520	9,6 2,0 0,3	Andersson-Engels 92
Porphyries endogènes	-	400	610, 635, 675	-	Andersson 86 Alfano 89

Il est nécessaire de sélectionner une longueur d'onde d'excitation optimale pour laquelle l'émission de fluorescence est maximale pour certains fluorophores d'importance diagnostique. Ce choix de longueur d'onde d'excitation doit permettre d'améliorer la qualité

de détection de certains fluorophores endogènes afin de mieux distinguer les lésions tumorales (la NADH, la flavine et les porphyrines) [Loschenov 1992, Pfeifer 1995, A'Amar 97]. Une excitation de l'ensemble de ces fluorophores, plutôt qu'un seul, pourrait conduire à une détection plus efficace des lésions pathologiques.

Les caractéristiques d'autofluorescence observées pour les tissus sains et pour les tissus cancéreux dans la gamme des longueurs d'onde d'excitation allant de l'ultraviolet au proche infrarouge permettent la différenciation de ces tissus [Hung 1991, Andersson 1986, Alfano 1989, Lam 1993].

En effet, par rapport aux tissus sains, les tissus pathologiques présentent des intensités d'autofluorescence plus faibles et des modifications de structures spectrales. L'origine exacte de ces modifications n'est pas encore définie. Les différentes hypothèses avancées pour expliquer la modification des caractéristiques de l'autofluorescence tissulaire sont résumées ci-après :

- La concentration des fluorophores endogènes dans les tissus est différente suivant la nature saine ou pathologique de ceux-ci (ex: riboflavine) [Alfano 1989, Hung 1991, Lam 1995]. Cette hypothèse ne tient pas compte du changement de l'allure spectrale. Si la différence concernait seulement la concentration en molécules fluorescentes, on obtiendrait la même allure spectrale pour les deux types de tissus mais avec des intensités différentes.
- L'épithélium s'épaissit dans certaines localisations tumorales [Schomacker 1991, Kolli 1995]. Une simulation de Monte Carlo qui tient compte des propriétés optiques des structures épithéliales des bronches pour une excitation lumineuse à 442 nm a montré qu'une diminution de 2,5 fois de l'intensité de l'autofluorescence peut être traduite par un épaississement épithélial de 50 à 200 μm [Qu 1995]. L'expérimentation effectuée *in vivo*, pour une lésion épaisse de 200 μm , a montré que l'intensité de l'autofluorescence diminue d'un facteur de 10 par rapport au tissu sain de 50 μm d'épaisseur. L'épaississement de l'épithélium est un facteur influent mais n'est pas la cause première [Kolli 1995, Lam 1995]. D'ailleurs, dans les tumeurs se développant sans la présence d'une structure

épithéliale (cancer du sein, par exemple) on observe également des différences dans l'intensité de l'autofluorescence entre ces cancers et les tissus sains [Tang 1989].

- Certaines des caractéristiques optiques des tissus pathologiques sont différentes [Andersson 1986, Alfano 1989, Richards-Kortum 1989, Mahadevan 1993]. La modification de la structure tissulaire des cancers implique un changement de propriétés optiques par rapport aux tissus sains et cela se traduit souvent par une augmentation de l'absorption due à l'hémoglobine. Cette hypothèse a été prouvée par l'analyse de l'autofluorescence mais aussi par spectrophotométrie de réflectance diffuse (diffusion élastique). Cette technique traduit la modification des propriétés optiques due à la différence d'absorption photonique entre la tumeur et les tissus sains environnant [Bigio 1996]. Dans de tels systèmes, une lampe xénon (350 et 800 nm) est utilisée pour l'irradiation des tissus. Le profil du spectre de réflectance mesuré sur la tumeur a été différencié par la présence de zones d'absorption dues à l'oxyhémoglobine (400-440 et 540-580). Ainsi, pour éviter l'absorption de l'hémoglobine et l'hétérogénéité des coefficients optiques des tissus, des longueurs d'onde d'excitation supérieures à 600 nm ont été proposées [Loschenov 1992]. Mais, à ces longueurs d'onde le signal de l'autofluorescence est très faible. Par exemple, l'intensité de l'autofluorescence mesurée sur les bronches avec une excitation à 405 nm est 200 fois plus forte que celle mesurée avec une excitation à 615 nm [Braichotte 1992].
- La synthèse microbienne ou l'accumulation des porphyrines endogènes dans certaines lésions tumorales modifient des caractéristiques de l'autofluorescence [Harris 1987, Andersson-Engels 1992, König 1993, Sterenborg 1994-95, Wang 1995, Dhingra 1996]. Ganesan *et al.* supposent que du fait de la transformation cancéreuse des cellules, les flavines et les autres protéines peuvent se décomposer et générer des porphyrines [Ganesan 1996]. En fait, cette synthèse de porphyrines caractérise les lésions tumorales par des émissions spécifiques dans le rouge (635 et 670 nm), ce qui leur donne une allure spectrale d'autofluorescence différente de celle des tissus sains. En réalité, cette émission d'autofluorescence n'est pas vraiment caractéristique des lésions tumorales. Nous avons montré que cette même émission peut être détectée dans certains tissus sains de la cavité buccale [A'Amar 1996].

- La modification des caractéristiques de l'autofluorescence dans les lésions tumorales peut également être attribuée au changement de l'équilibre entre les formes oxydées et les formes réduites de certains fluorophores (Flavine, riboflavine et NADH) [Hung, 1991, Alfano 1989, Andersson-Engels 92]. Les formes réduites des fluorophores sont présumées non fluorescentes [Hung 1991, Anidjar 1996].
- Enfin, le changement du microenvironnement physico-chimique des cellules cancéreuses, comme le pH, peut agir sur le rendement quantique de la fluorescence et sur la biodistribution des fluorophores [Gomer 1991]. Il serait possible que la lumière d'excitation soit plus absorbée par les lésions tumorales, et que l'autofluorescence ne soit plus proportionnelle à l'énergie lumineuse absorbée [Lam 1995].

Quelque soit l'origine du changement des caractéristiques de l'autofluorescence entre les tissus sains et les tissus pathologiques, les différents points de vue s'accordent pour admettre que l'autofluorescence tissulaire peut potentiellement aider au dépistage précoce des cancers.

III.1.4. Techniques de détection et d'analyse de la fluorescence

La technique de détection la plus simple consiste à observer la fluorescence tissulaire visible à l'œil nu après élimination de la lumière d'excitation [Profio 1988]. Théoriquement, cette technique qui ressemble plus ou moins aux examens endoscopiques avec des colorants vitaux, peut être applicable pour la localisation des fluorophores exogènes sélectifs (photosensibilisants) qui possèdent un rendement quantique de fluorescence élevé [Forrer 1995]. Mais, en pratique, le rendement et la sélectivité des fluorophores employés en diagnostic sont très médiocres. De plus, la dose du photosensibilisant et la fluence de la lumière d'excitation ne doivent pas dépasser un certain seuil à cause de la toxicité propre du photosensibilisant et du photoblanchiment. Le signal de fluorescence observé est très faible et le manque de sensibilité constitue le principal inconvénient de cette technique.

L'utilisation de détecteurs photoélectroniques permet de résoudre ce problème. En effet, les détecteurs électroniques intensifiés ou matriciels sont généralement assez sensibles pour permettre de diminuer l'intensité lumineuse d'excitation et le temps d'exposition des tissus et, par conséquent, réduire le photoblanchiment. Les procédés informatiques associés

permettent de réaliser le traitement du signal adapté à la localisation des fluorophores dans les tissus ou dans la cellule. Par l'utilisation de techniques et d'algorithmes spécifiques les fluorophores peuvent être identifiés et semi-quantifiés.

Dans le principe, tout système de détection de fluorescence doit comprendre une source d'excitation lumineuse, une optique de transmission, une optique de séparation entre la lumière d'excitation et la lumière de fluorescence, et enfin un détecteur photo-électronique (Matrice CCD ou PDA, Tube Photomultiplicateur "PMT", Caméra intensificatrice, ...) couplé à un équipement informatique de traitement du signal (Figure 3).

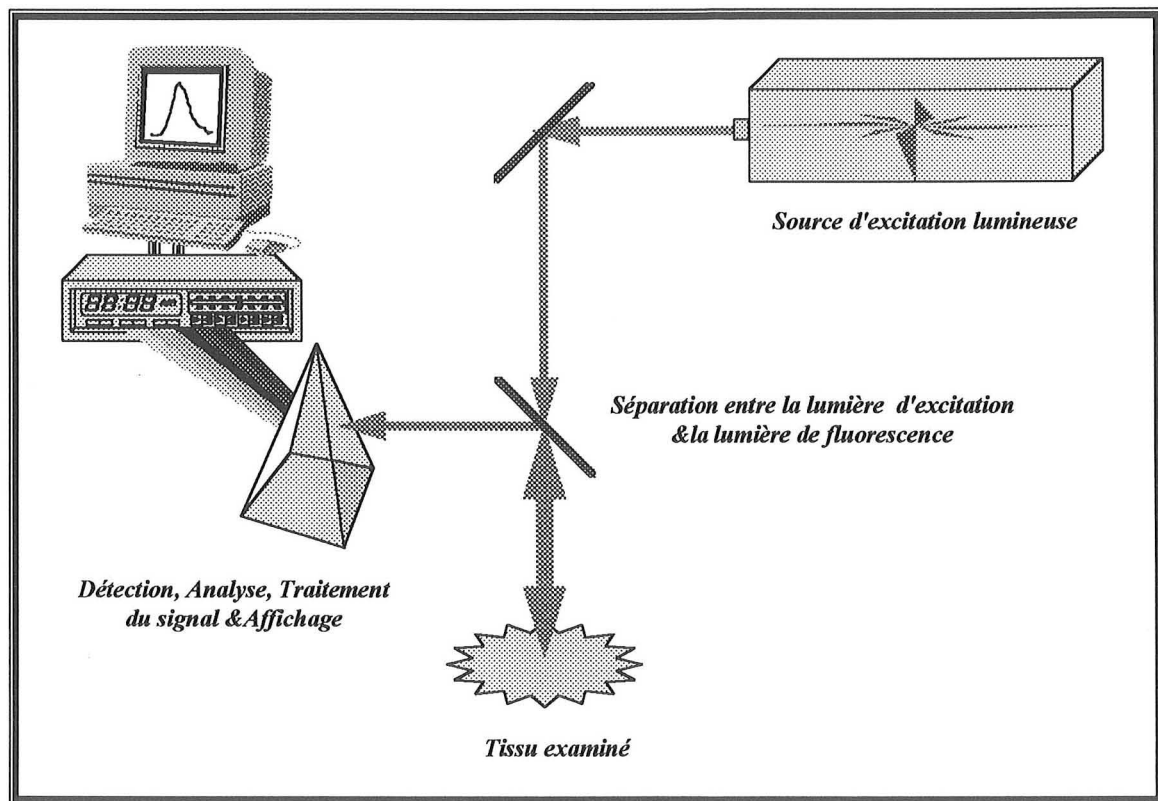


Figure 3 : Schéma de principe de la détection de fluorescence.

La différence entre les systèmes réside dans le choix de la longueur d'onde d'excitation, dans le moyen de transmission de la lumière d'excitation vers le site tissulaire et celui de la détection de la fluorescence. L'optique de transmission peut être une fibre optique (capteur monofibre), un faisceau de fibres (capteur multifibre), ou l'optique d'un endoscope. La séparation entre la lumière d'excitation et le signal de fluorescence peut être effectuée par un miroir dichroïque, si la même fibre optique est utilisée pour l'excitation et la détection. Dans le cas d'un capteur multifibre, un filtre passe-haut sert à éliminer la lumière d'excitation.

D'autre part, la différence entre les systèmes de détection peut provenir de la méthode d'analyse de la fluorescence recueillie. Selon le domaine d'application et la méthode d'analyse, on distingue : la spectroscopie de fluorescence et l'imagerie de fluorescence.

D'autres techniques plus simples peuvent être appliquées à la détection de la fluorescence induite. L'une de ces techniques consiste à mesurer la fluorescence induite par l'intermédiaire d'un photomultiplicateur et de la transformer en un signal sonore dont l'amplitude est proportionnelle à l'intensité de fluorescence [Kinsey 1980, Profio 1988]. Le signal mesuré ainsi est attribué au fluorophore exogène. Un filtre interférentiel de bande passante correspondant à l'émission de fluorescence du fluorophore précède le photomultiplicateur. C'est l'idée du système de la Mayo Clinic utilisé sur un groupe de 16 patients injectés par de l'HpD. L'excitation lumineuse étant réalisée par un laser Krypton (< 415 nm) modulé à une fréquence de 30 Hz, le système a permis de confirmer la présence de 15 cancers, avec un seul faux négatif (tumeur non détectée) [Kato 1985]. Dans cette technique, les auteurs ont considéré que l'autofluorescence des tissus sains et des tissus pathologiques était similaire.

Une autre approche consistait à réaliser la photodétection par ratio [fluorescence induite/autofluorescence] en détectant uniquement le signal de fluorescence aux longueurs d'ondes correspondant aux maximums d'émission de l'autofluorescence (562 ± 30 nm) et de la fluorescence induite de l'HpD (690 ± 40 nm) [Schneckenburger 1987, Profio 1988]. On estime que cette méthode du ratio peut aboutir à la localisation des lésions tumorales dont l'épaisseur est de l'ordre de 1-1,5 mm. Pour des patients injectés par de l'HpD (2mg/Kg du poids corporel) le ratio dans les tumeurs bronchiques par rapport aux tissus sains était compris entre 1,9 : 1 et 14,3 : 1, tandis que pour des patients non injectés, les valeurs correspondantes étaient comprises entre 1,1 : 1 et 2,2 [Andersson-Engels 1992].

III.1.4.1. Spectroscopie de fluorescence

La détection des états pathologiques par spectroscopie de fluorescence tissulaire, générée par des fluorophores endogènes ou exogènes, est basée sur l'analyse comparative des spectres mesurés sur des zones saines et des zones suspectes. Ces spectres sont généralement formés de structures larges et peu intenses. Néanmoins, c'est une méthode de diagnostic explorée en médecine car l'intensité absolue des maxima et des minima ou le ratio

des intensités à des fréquences choisies permettent une différenciation de la nature pathologique au sein d'un même tissu [Andersson 1986, Okunaka 1987, Alfano 1989, Richards-Kortum 1989, Lam 1990-96, Panjehpour 1992-96, Braichotte 1991-95, Etori 1996, A'Amar 1996]. De plus, la spectroscopie de fluorescence *in situ* permet l'identification en temps réel de médicaments, de fluorophores naturels ou de marqueurs fluorescents. Cette performance n'est pas assurée par l'imagerie de fluorescence où on ne distingue que des zones plus au moins intenses ou une image dans le vert et une image dans le rouge. Une autre application importante de la spectroscopie de fluorescence est l'étude *in vivo* de la pharmacocinétique du photosensibilisant, de sa distribution dans l'organisme ainsi que l'estimation de sa concentration intratumorale [Profio 1988, Panjehpour 1992, Alian 1994, Berenbaum 1993, Guillemin 1995].

L'analyse des spectres d'autofluorescence mesurés par cette technique nécessite un traitement spécifique : normalisation, calcul des ratios ou calcul d'un spectre différentiel. Ce sont les procédés habituels permettant de définir les critères de distinction entre les tissus sains et les tissus pathologiques.

A. Normalisation

La normalisation des spectres sert essentiellement à la standardisation de la grandeur physique mesurée. Autrement dit, c'est une calibration des systèmes spectroscopiques, dans lesquels les données énergétiques sont en unités arbitraires, par rapport à un standard dont les caractéristiques énergétiques et spectrales de luminance sont connues. Pour ce faire, la luminance du standard est mesurée par le système avant d'entreprendre toute expérimentation. Ce standard peut être le spectre continu d'une lampe de faible puissance lumineuse (Tungstène, Deutérium, Halogène, Halogène-Mercure ...) [Schomacker 1992, Baraga 1990, Sterenberg 1995, Zonios 1996, Etori 1996], la fluorescence d'une solution comme la Rhodamine ou le rouge Kiton [Andersson 1986, Braichotte 1995, Panjehpour 1996], ou les radiations d'un corps noir [Andersson-Engels 1995, Rokahr 1995]. Cette standardisation de l'échelle spectrale a pour but la quantification des fluorophores et la validation de l'analyse comparative des intensités absolues entre un tissu sain et un tissu pathologique du même organe, d'organes différents ou encore entre individus. Malgré cette normalisation, les mesures spectrales sont toujours exprimées en unités relatives ou

arbitraires car d'autres paramètres physiques et instrumentaux, propres à l'appareillage utilisé, agissent sur le signal de fluorescence. C'est pour cette raison que le ratio des intensités de fluorescence, mesurées au moyen de n'importe quel système, demeure le paramètre le plus significatif pour l'analyse distinctive des différents fluorophores.

B. Critères de distinction

En spectroscopie de l'autofluorescence tissulaire, le seuil de distinction entre tissu sain et tissu pathologique n'est pas bien défini. Il repose actuellement sur l'analyse statistique simple ou multivariable de critères spectraux qui permettent de mettre en évidence une différence de fluorescence entre les tissus [Panjehpour 1995-96, Schomaker 1992, Kapadia 1990]. Les critères recherchés sont fonction de la longueur d'onde d'excitation, de l'organe exploré et du stade évolutif des lésions. Le ratio d'intensité spectrale entre le tissu sain et le tissu pathologique par rapport à un pic de fluorescence choisi est l'un des critères les plus significatifs [Qu 1994, Lam 1990, Andersson-Engels 1992]. D'autres ratios établis entre deux pics distincts, servent à mettre en évidence la différence structurelle des spectres. Sur un groupe de rats xénogreffés avec une tumeur du colon (DMH-W49), Andersson *et al.* ont comparé les spectres de l'autofluorescence mesurés sur la tumeur et les tissus sains suite à une excitation laser azote (337 nm) à partir du ratio $\sim 400/460$ nm. Ils ont trouvé qu'il s'agissait d'un paramètre significativement différent entre les tissus examinés. D'ailleurs, ils ont montré que l'allure des spectres ne changeait pas que les mesures soient réalisées *ex vivo* ou *in vivo* [Andersson 1986]. Schomaker *et al.* en 1992, ont montré que l'intensité de fluorescence due à la NADH décroissait selon une loi exponentielle avec le temps, après résection [Schomaker 1992].

Avec une même longueur d'onde d'excitation de 337 nm, Ramanujam *et al.* ont mesuré la pente dans les spectres obtenus sur des tissus sains et des tissus pathologiques du col de l'utérus (néoplasie intraépithéliale, papillome et inflammation). La pente a été calculée, par l'intermédiaire d'une approximation linéaire, avec un incrément de 20 nm sur toute l'étendue spectrale, telle que :

$$\text{Pente} = \{I(\lambda_{em} + 20 \text{ nm}) - I(\lambda_{em})\} / 20 \text{ nm}.$$

Des différences de pente entre les tissus sains et les tissus pathologiques ont été observées dans la bande 420-440 nm. La pente sur cette bande tracée en fonction de l'intensité

normalisée des pics caractérisants les tissus sains (442 ou 453 ± 3 nm) et les tissus pathologiques (444, 454, 463 ou 470 ± 3 nm) a permis une distinction des tissus pathologiques avec une sensibilité (probabilité de prédire des résultats positifs pour les tissus pathologiques) de 92% et une spécificité (probabilité de prédire des résultats négatifs pour les tissus sains) de 90% [Ramanujam 1994].

Ettori, a choisi une comparaison du ratio $I(360\text{ nm})/I(440\text{ nm})$ pour distinguer les tissus sains et tumoraux de la vessie (25 Patients), suite à une excitation laser XeCl (308 nm). Son choix repose sur le fait que la concentration extracellulaire du collagène est plus forte dans la paroi saines que dans la paroi tumorale. Avec ce critère, il lui a été possible d'identifier correctement 100% des tissus examinés [Ettori 1996].

D'autres chercheurs proposent l'exploitation du ratio établi entre l'intensité de fluorescence et la lumière d'excitation rétrodiffusée [Coremans 1996, Loshenov 1992]. Loschenov *et al.* ont proposé une formule de discrimination (DC) entre les tissus sains et les tissus pathologiques basée sur le ratio de l'intensité maximale/minimale de fluorescence (IF) d'une région spectrale et le ratio de la lumière d'excitation rétrodiffusée :

$$DC = [IF_{(Tumeur)} / \text{Puissance rétrodiffusée}_{(Tumeur)}] / [IF_{(Tissu\ sain)} / \text{Puissance rétrodiffusée}_{(Tissu\ sain)}]$$

Les régions spectrales ont été choisies en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Pour une excitation à 337 nm, ces régions correspondaient à 460-480 nm et 540-560 nm. Les régions 660-690 nm et 690-730 nm ont été considérées pour une excitation à 633 nm. Avec ce critère de discrimination, des ratios de fluorescence allant de 5 à 12 ont été obtenus entre les tissus sains et les tumeurs des bronches et de l'estomac. En outre, l'auteur confirme l'hypothèse concernant la rétention sélective des porphyrines endogènes dans les lésions tumorales et propose l'excitation de 633 nm pour s'affranchir de la réabsorption de l'autofluorescence due à l'oxyhémoglobine [Loshenov 1992].

Zharkova *et al.* supposent que le ratio entre l'intensité de la fluorescence induite et l'intensité de la lumière d'excitation rétrodiffusée reflète la sélectivité tumorale des photosensibilisants [Zharkova 1994]. En effet, dans une tumeur si la concentration du photosensibilisant est plus importante que dans un tissu sain, la rétrodiffusion de la lumière d'excitation sera

forcément plus faible à cause de l'absorption due au photosensibilisant. Par conséquent, l'intensité de fluorescence est relativement plus importante. Cependant, pour que ce ratio soit considéré comme un critère de distinction ou de quantification, les tissus explorés doivent avoir les mêmes paramètres optiques. De plus, il faut s'assurer que la lumière d'excitation rétrodiffusée ne soit pas confondue avec la réflexion spéculaire des tissus.

Panjehpour *et al.* ont proposé une analyse statistique discriminante pour choisir des critères de distinction entre tissus sains et tissus tumoraux de l'œsophage excités à 410 nm. Quinze spectres mesurés sur des tissus sains et 10 spectres mesurés sur des lésions tumorales ont été utilisés comme base de données. Les intensités de fluorescence ont été prélevées entre 430 et 716 nm, avec une résolution de 15 nm, sur les 25 spectres d'autofluorescence. Dans chaque spectre, les intensités mesurées correspondant à 19 longueurs d'onde particulières, ont été rapportées à l'aire du spectre entier. Le résultat de l'analyse statistique a permis de sélectionner cinq longueurs d'onde d'intérêt diagnostique : 490, 580, 670, 685 et 715 nm. Ces données ont été appliquées pour l'élaboration d'un modèle de classification basé sur l'analyse discriminante multivariable linéaire. Le modèle a été testé sur 3 carcinomes, 23 adénocarcinomes et 108 tissus sains de l'œsophage. La sensibilité et la spécificité du modèle ont été respectivement 100% et 98% [Panjehpour 1994-95-96].

Une méthode similaire de classification des lésions tumorales du colon a été proposée par Kapadia *et al.* et par Schomacker *et al.*. L'analyse a été basée sur 70 échantillons, 35 normaux et 35 adénomes, excités par un laser He-cd émettant à 325 nm. Après normalisation par rapport à l'aire globale des spectres comprise entre 350 et 600 nm, 6 longueurs d'onde d'émission, 350, 380, 395, 440, 560 et 590 nm, ont été choisies dans l'analyse de discrimination multivariable de régression linéaire (MVLR). L'algorithme a été ensuite appliqué pour la classification de 35 échantillons normaux, 16 adénomes, 16 papillomes hyperplasiques. Cent pour 100 des échantillons de tissus normaux et des adénomes, et 98% des papillomes hyperplasiques ont été correctement classifiés [Kapadia 1990].

D'autres approches permettant de mettre en évidence la différence structurelle du signal de l'autofluorescence, mesuré sur les différents tissus, consistent à réaliser un spectre différentiel S_d [Vo-Dinh 1995, Panjehpour 1996]. Ce spectre est, en fait, le résultat de la

soustraction d'un spectre T mesuré sur un tissu pathologique d'un spectre T_s mesuré sur un tissu sain lorsque les deux spectres sont ajustés par un coefficient de proportionnalité α par rapport à un pic d'émission commun λ_p , tel que :

$$S_d = T_s(\lambda_p) - \alpha T(\lambda_p)$$

Le spectre différentiel peut également être réalisé si chacun des spectres de l'autofluorescence des tissus sains et des tissus pathologiques est normalisé par rapport à son aire spectrale globale.

Vo-Dinh *et al.* ont rapporté une technique de distinction entre les tissus sains et les tissus pathologiques appelée analyse spectrale différentielle de la fluorescence normalisée (DNF). Le principe de cette technique consiste à normaliser les spectres d'autofluorescence par rapport à l'aire du spectre global pour les rendre indépendants de l'intensité spectrale. Cette procédure a été appliquée sur 15 spectres d'autofluorescence mesurés sur des tissus sains de l'œsophage à une excitation de 410 nm afin de construire un modèle "tissu sain". Ensuite, chaque spectre mesuré sur une lésion tumorale est normalisé de la même manière et est soustrait du spectre tissu sain "modèle". Le spectre différentiel résultant a permis de mettre en évidence deux régions spectrales caractéristiques aux lésions tumorales, 460-490 nm et 640-670 nm, avec une "vallée" à 480 nm et un pic à 660 nm. Cent huit tissus normaux et 26 tissus tumoraux analysés par cette technique ont été classifiés avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 98% [Vo-Dinh 1995].

Cette technique de spectroscopie différentielle de fluorescence est appliquée pour la quantification et la détermination de la sélectivité d'un photosensibilisant dans une lésion tumorale, préalablement localisée [Wilson 1986, Braichotte 1991, Guillemin 1995]. En soustrayant le spectre de l'autofluorescence mesuré avant l'administration du photosensibilisant du spectre après l'administration du photosensibilisant, on obtient un spectre "pur" dû au photosensibilisant. Cependant, pour s'affranchir de la mesure préalable du spectre de l'autofluorescence et des problèmes de détection liés à la distance entre le capteur optique et le site examiné, il faut calculer le ratio, dans le spectre de fluorescence globale, entre le pic d'émission maximale du fluorophore exogène et le pic d'émission maximal de l'autofluorescence. L'ajustement des spectres mesurés sur les différents tissus

examinés à plusieurs intervalles de temps après l'administration du photosensibilisant, est effectué par rapport à un pic d'émission commun se trouvant en-dehors des longueurs d'onde d'émission du photosensibilisant [Ankerst 1984, Profio 1988].

C. Matrice bidimensionnelle d'excitation et d'émission (2D-EEM)

Le principe de cette technique est identique à celui de la spectroscopie de fluorescence ordinaire. Mais, on réalise un balayage avec des longueurs d'onde d'excitation allant de l'ultraviolet au proche infrarouge. Une résolution de 10-20 nm est obtenue en utilisant un jeu de filtres interférentiels ou un monochromateur motorisé. Cette technique est utilisée pour étudier les caractéristiques de fluorescence d'un échantillon tissulaire dont les fluorophores et leur distribution sont inconnus *a priori*. Quand la longueur d'onde du rayonnement lumineux correspond à un maximum d'excitation d'un fluorophore, elle favorise l'émission de fluorescence de celui-ci par rapport aux autres. Ainsi, l'enregistrement des matrices d'excitation et d'émission de fluorescence et la réalisation d'une présentation topographique "Map" permettent de mettre en évidence la distribution et l'identité des fluorophores présents dans l'échantillon examiné. L'identification de certains fluorophores endogènes et le choix d'une excitation optimale des tissus ont été obtenus au moyen de cette procédure par différents chercheurs [Wolfbeis 1985, Richards-Kortum 1991, Ramanujam 1994, Sterenborg 1994]. Cependant, cette technique ne peut être applicable *in vivo* pour la mesure des spectres de fluorescence tissulaire car le temps nécessaire pour la réalisation d'une matrice d'excitation et d'émission est relativement long.

D. Spectroscopie résolue dans le temps ou à filtrage temporel

Basée sur la différence de cinétique de fluorescence observée entre les différents fluorophores, la spectroscopie résolue dans le temps permet la détection d'une seule composante fluorescente dans un mélange de fluorophores excitable à la même longueur d'onde. Le paramètre physique qui caractérise cette technique est la durée de vie ou le temps de décroissance de fluorescence. Ce paramètre n'a un sens précis que si l'excitation cesse brusquement ; pour ce faire, une excitation pulsée est nécessaire. L'intensité temporelle de l'émission de fluorescence $I(t)$ suit une loi du type exponentiel, tel que :

$$I(t) = \exp [-t/\tau]$$

La constante τ , homologue à un temps, est la valeur moyenne du temps d'existence d'une molécule excitée, appelée durée de vie. Cependant, pour un mélange de fluorophores endogènes ou exogènes, l'intensité temporelle de fluorescence constitue la somme des intensités individuelles, c'est à dire :

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot \exp \left[\frac{-t}{\tau_i} \right]$$

Ainsi, une estimation des A_i (paramètres liés à la concentration des fluorophores et à leur rendement quantique de fluorescence) et des τ_i donne des informations sur l'environnement physico-chimique des fluorophores. La première application de cette technique en photodiagnostic était l'élimination de l'autofluorescence tissulaire dans un spectre ou pour produire une image censée mesurer uniquement la fluorescence induite [Kohl 1993]. En effet, la durée de vie de l'autofluorescence est estimée entre 2 et 5 ns. Par contre, la durée de vie de la fluorescence induite d'un photosensibilisant comme l'HpD est estimée entre 12 et 15 ns [Schneckenburg 1987, Kohl 1993, Cubeddu]. Ainsi, l'introduction d'un retard supérieur à 5 ns permet l'obtention d'un signal uniquement dû à la fluorescence induite. Cependant, les caractéristiques spectrales du photosensibilisant ne sont mises en évidence qu'avec un délai équivalant au double de la durée de vie [Kohl 1993].

Pour réaliser la détection à filtrage temporel ou la mesure de la durée de vie de la fluorescence, un laser pulsé à modes déclenchés (Q-switched) ou à modes bloqués doit assurer l'excitation des molécules [Schneckenburg 1987, Alfano 1989, Kohl 1993]. La durée de l'impulsion des lasers à modes déclenchés est généralement de l'ordre de 5 à 20 nanosecondes, ce qui permet de réaliser une détection à filtrage temporel comme l'élimination de l'autofluorescence dans un signal composé (autofluorescence + fluorescence induite). Tandis que les lasers à modes bloqués génèrent des impulsions picosecondes ou femtosecondes qui sont employées pour la mesure de durée de vie de la fluorescence et l'identification des fluorophores. Pour la détection, les systèmes doivent être munis de détecteurs obturables de type matrices CCD intensifiées, tubes intensificateurs d'image, compteurs de photons, caméra Streak, ... Le temps de réaction de ces détecteurs est

généralement ultracourt. Ainsi, l'observation du spectre ou de l'image est effectuée dans une fenêtre temporelle entre deux impulsions lasers après l'introduction d'un certain délai. La figure 4 schématise le principe de cette technique.

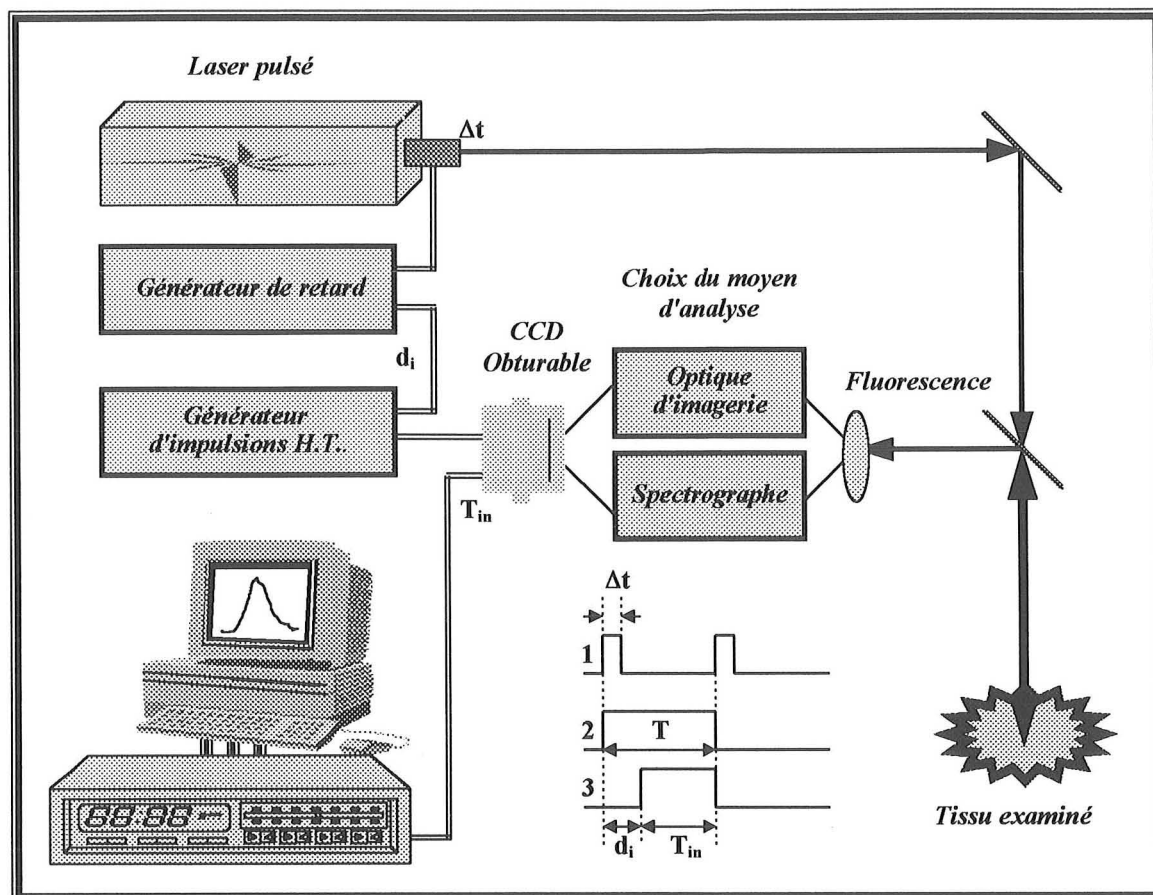


Figure 4 : Principe de la photodétection à filtrage temporel.

Les impulsions lasers de durée Δt sont utilisées pour déclencher l'acquisition du signal de fluorescence après l'application d'un délai prédéfini d_i par l'intermédiaire d'un générateur de retard. Comme le montre le chronogramme, le signal de fluorescence est intégré par cycles dans une fenêtre temporelle $T_{in} \leq T - \Delta t - d_i$. Le temps d'intégration de chaque cycle T_{in} est généralement compris entre 5 et 50 nanosecondes. Le temps d'acquisition global d'un spectre de fluorescence constitue l'accumulation de plusieurs cycles permettant ainsi d'améliorer le rapport signal / bruit.

L'étude de la transformation des différentes fractions monomères, dimères et agrégats, qui sont présentes après l'injection intraveineuse d'un photosensibilisant comme l'HpD, peut être

très importante dans l'analyse de la pharmacocinétique et dans la photodétection des tumeurs. La spectroscopie de fluorescence à filtrage temporel est une technique très appropriée pour étudier ces transformations car les durées de vie de fluorescence des monomères, dimères et agrégats sont très différentes [Andersson-Engels 1992]. Pour le Photofrin II ces durées de vie ont été estimées, au niveau d'une cellule, à 14 : 2,9 : 0,2 ns, respectivement [Schneckenburger 1993].

D'autres applications comme l'identification et la quantification des composantes fluorescentes des porphyrines [Schneckenburger 1987, 1993], des photoproduits [Valat 1988] et des fluorophores endogènes [Pfeifer 1995, Schneckenburg 1995] sont réalisables avec des systèmes de détection à filtrage temporel picoseconde. Par l'utilisation de cette technique, Tang *et al.* en 1989 ont observé que la durée de vie de l'autofluorescence des tissus tumoraux était plus courte que celle des tissus sains. Ils supposent que les désexcitations des fluorophores naturels par des processus non-radiatifs sont plus importants dans la tumeur que dans le tissu normal à cause du désordre de la configuration moléculaire autour des fluorophores [Tang 1989]. En effet, les transitions non-radiatives sont connues pour être à l'origine de la diminution de la durée de vie de fluorescence.

Par ailleurs, puisque la durée de vie de la phosphorescence est de l'ordre de la milliseconde, Tang et al ont étudié les spectres de phosphorescence des tissus sains et tumoraux du sein, et ceci en introduisant un délai supérieur à 1 ms entre l'excitation et l'acquisition des spectres [Tang 1996]. Cette étude n'a pas abouti à une conclusion concrète.

La détermination de la durée de vie de fluorescence peut également être réalisée dans le domaine fréquentiel "Frequency-domain" par la mesure de phase. La fluorescence est induite par une lumière monochromatique modulée par une radiofréquence et mesurée par un intensificateur d'image dont le gain optique est modulé par la même fréquence. La détermination de la durée de vie sera basée sur le déphasage entre le signal de fluorescence et le signal qui module le gain optique de l'intensificateur [Wagnières 1997].

E. Microspectrométrie de fluorescence

C'est une technique qui associe à la fois la spectroscopie à la microscopie de fluorescence. Elle permet la localisation, la quantification et l'identification des fluorophores au niveau de la cellule. La figure 5 présente le schéma d'un microspectromètre de fluorescence [Chinsky 1992, Anidjar 1996].

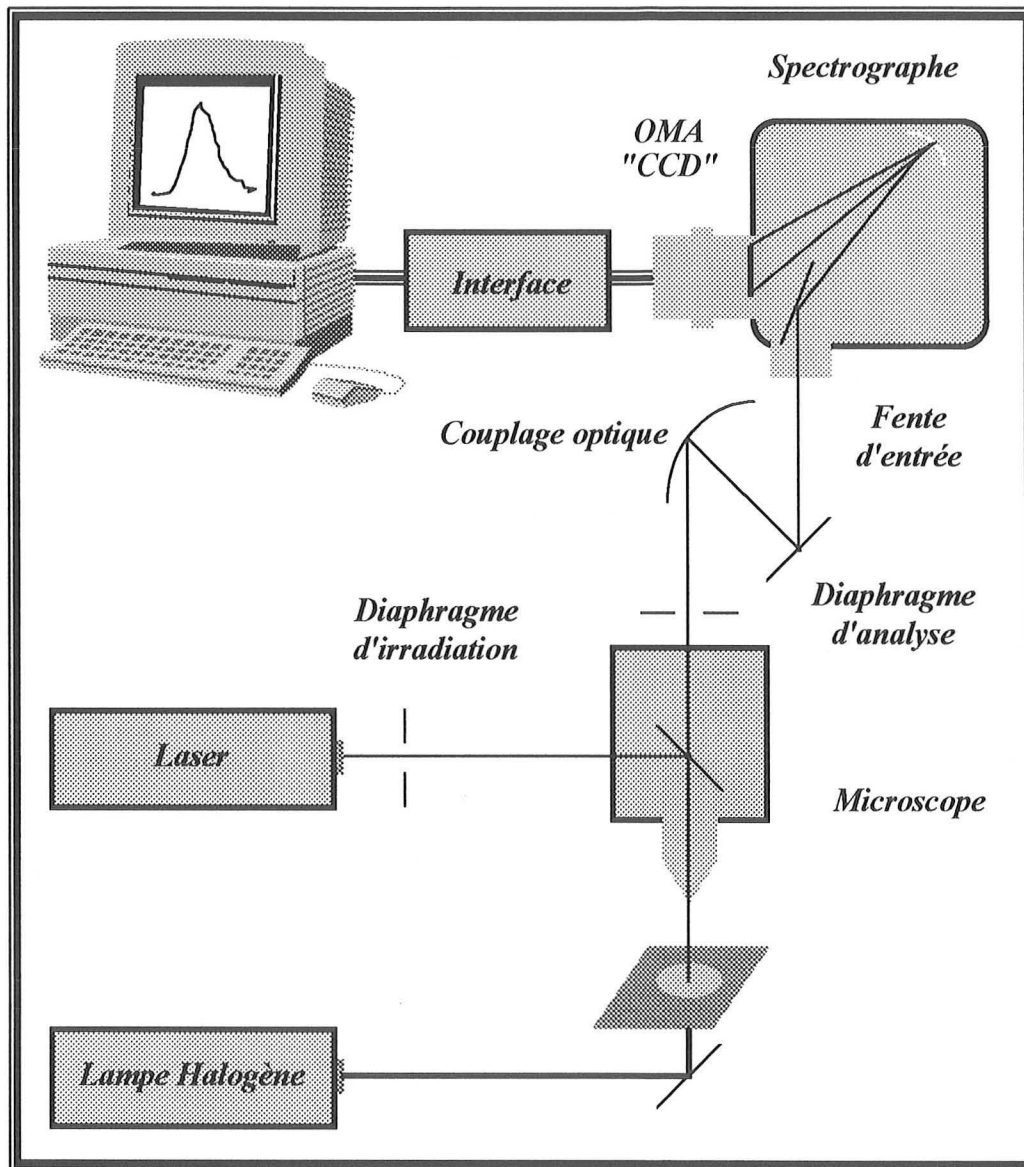


Figure 5 : Schéma d'un microspectromètre de fluorescence [Anidjar 1996].

Cette technique a été appliquée à la mesure de l'autofluorescence des cellules urothéliales tumorales et saines. Le laser argon employé induit principalement la fluorescence des flavines et des riboflavines. Des différences dans l'intensité spectrale et dans la largeur à

mi-hauteur entre les spectres mesurés sur les cellules saines et tumorales ont été observées. Comme observé dans les tissus, l'intensité de fluorescence dans les cellules saines était supérieure à celle des cellules cancéreuses. Un facteur 10 a été mesuré dans cette expérimentation. Par ailleurs, la largeur à mi-hauteur des spectres de fluorescence des cellules saines était supérieure de 40% que celle des cellules tumorales. Les auteurs supposent que les différences spectrales sont essentiellement dues à la faible concentration des formes oxydées des flavoprotéines dans les cellules tumorales [Anidjar 1996, Etori 1996].

III.1.4.2. Imagerie de fluorescence

En diagnostic par fluorescence, les systèmes d'imagerie sont plus pratiques que les systèmes spectroscopiques car l'image de fluorescence permet d'explorer une large zone tissulaire. On peut localiser une petite tumeur qui sera plus contrastée en fluorescence induite ou moins contrastée en autofluorescence. En fait, la plupart des systèmes d'imagerie ont été développés pour la détection de la fluorescence induite des photosensibilisants employés en thérapie photodynamique et notamment les porphyrines. Mais, des modifications mineures sur les différents systèmes d'analyse permettraient à la fois la détection de l'autofluorescence et de la fluorescence induite par les différents fluorophores. Toutefois, afin d'affiner l'observation et d'identifier les fluorophores responsables du signal de fluorescence, l'association de la spectroscopie aux systèmes d'imagerie s'avère nécessaire.

En 1979, Doiron et Profio développent le premier bronchoscope pour la détection de précancres bronchiques basée sur leur rétention préférentielle de l'HpD. Une fibre optique en quartz guidait la lumière d'excitation d'un laser Krypton (< 415 nm) à travers le canal de biopsie du bronchoscope. La puissance lumineuse en sortie de cette fibre était d'environ 10 mW. Un intensificateur d'image d'un gain de 30000 et une caméra vidéo permettaient à l'opérateur d'observer directement l'image intensifiée de la fluorescence induite du site après filtrage de l'autofluorescence et de la lumière d'excitation [Profio 1980]. Profio *et al.* apportèrent des modifications en offrant la possibilité d'alterner l'image de fluorescence et l'image en lumière blanche et en améliorant la suppression de l'autofluorescence. Ainsi, l'autofluorescence est soustraite de telle sorte que l'image globale de fluorescence sur le tissu sain soit nulle [Profio 1987]. Un système similaire associé à la spectroscopie de fluorescence a été réalisé par Kato et Cortese en 1985 [Kato 1985].

Une autre méthode proposée par le groupe de Munich consiste à détecter la fluorescence des tissus uniquement dans le domaine spectral du colorant. Les tissus sont irradiés à deux longueurs d'onde d'excitation pour lesquelles l'autofluorescence est présumée similaire et la fluorescence induite différente [Baumgartner 1987]. L'une des deux irradiations correspond au maximum d'excitation du photosensibilisant (405 nm). La deuxième longueur d'onde (470 nm) n'induit pas la fluorescence du colorant tout en générant une autofluorescence des tissus. Une opération de soustraction permet d'extraire l'image de la fluorescence induite. Cependant, comme les spectres d'absorption des différents fluorophores ont une structure large, les signaux de fluorescence mesurés sur les différents sites sont toujours composés des deux émissions. Ainsi, la séparation des deux signaux de fluorescence reste approximative.

En 1990 l'équipe de Svanberg développe un système utilisant un laser à azote (337 nm) en mode pulsé pour l'excitation des sites tissulaires. Une tourelle de filtres passe bande de longueurs d'onde centrales de 470, 600 et 630 nm précède une caméra intensificatrice qui recueille l'image de fluorescence de chacune des bandes spectrales. L'image de fluorescence due aux porphyrines exogène (HpD, Photofrin ou protoporphyrine IX induite par l'ALA) est affichée en fausses couleurs sur un moniteur en réalisant le procédé suivant :

$$Image = \{Image(630) - Image(600)\} / Image(470)$$

Ce procédé permet de rehausser le contraste entre les tissus sains et la tumeur et de s'affranchir du bruit du fond dû à l'autofluorescence [Svanberg 1990]. Mais la longueur d'onde utilisée pour l'excitation ne correspondant pas au maximum d'excitation du photosensibilisant utilisé, le signal de fluorescence obtenu n'est pas optimal.

Le système d'imagerie de fluorescence développé par l'équipe de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne repose sur la détection de l'image de fluorescence dans deux fenêtres spectrales après excitation lumineuse en mode continue par un laser Krypton (<415 nm, 5-15 mW/cm²). La lumière excitatrice est guidée sur le site par le moyen d'une fibre optique insérée dans le canal de biopsie d'un endoscope. Les fenêtres spectrales choisies correspondent à l'émission de l'autofluorescence dans la bande passante 520-580 nm et à la fluorescence induite (600-700 nm). Deux filtres passe bande correspondant aux fenêtres spectrales précédentes sont placés devant l'optique de deux caméra intensificatrices qui

recueillent séparément l'autofluorescence et la fluorescence du photosensibilisant (l'HpD, Photofrin II ou Protoporphyrine IX "PpIX" induite par acide aminolévulinique "ALA"). Ainsi, l'une des deux images (verte) tient seulement compte de l'autofluorescence tandis que l'autre image (rouge) correspond à la fois à une partie de l'autofluorescence et à la totalité de la fluorescence induite. En prenant en compte le bruit du fond dû à l'autofluorescence dans la deuxième image, un traitement spécifique de type soustractif et/ou par ratio aboutit à l'obtention d'une image purement due à la fluorescence induite. L'image résultante est affichée sur un moniteur. Le système décrit ci-dessus offre la possibilité de visualiser la surface tissulaire en lumière blanche et en image de fluorescence grâce à un chopper qui permettait d'obturer les intensificateurs d'image lors d'une visualisation en lumière blanche [Wagnières 1990]. Un système similaire a été développé au Centre de Recherche en Automatique de Nancy entre 1990 et 1994 [Falcoz-Vigne 1992, Diller 1994].

Lam *et al.* (Vancouver-Canada) ont développé un système d'imagerie pour la détection des cancers bronchiques précoces par fluorescence induite ou par autofluorescence. Le système est composé d'un bronchoscope standard qui guide la lumière d'excitation d'un laser He-Cd (442 nm) et la lumière de fluorescence, de deux caméras intensificatrices dont la première est munie d'un filtre passe bande (520 ± 20 nm) et la deuxième est munie d'un filtre passe haut (> 630 nm), d'un système d'analyse d'images associé à un ordinateur. Un algorithme spécifique permettait de combiner les deux images et de les visualiser sur un écran en fausses couleurs en temps réel : la zone saine est présentée par une image verte et la zone tumorale est présentée par une image rouge [Lam 1993, 1995]. La détection des lésions cancéreuse précoces (dysplasies et carcinomes *in situ*) par cette technique d'autofluorescence permettrait d'augmenter la sensibilité de détection de 50% (de 48% à 73%) par rapport à l'examen endoscopique ordinaire en lumière blanche.

La difficulté principale rencontrée avec tous les systèmes présentés ci-dessus réside dans le manque de sélectivité des photosensibilisants employés dans la photodétection qui se traduit par le faible contraste lumineux que l'on observe entre les précancers et la muqueuse saine périphérique.

Récemment d'autres techniques d'imagerie basées sur le filtrage temporel ont été introduites en imagerie de fluorescence tissulaire et cellulaire. De telles techniques utilisent des caméras intensifiées et obturables. Les sources d'excitation sont des lasers pulsés en mode déclenché (Q-switched) ou en mode bloqué. Les images de fluorescence sont recueillies entre deux impulsions, l'accumulation d'environ 100 images donne un bon rapport signal/bruit. Les systèmes développés permettent la détection de précancers par autofluorescence ou par fluorescence induite. Dans le cas de la fluorescence induite, la suppression de l'autofluorescence est réalisée par le filtrage temporel [Kohl 1993, Schneckenburger 1994, Mizeret 1995, Cubeddu 1995, Andersson-Engels 1995, Paithankar 1996, Anidjar 1996].

Enfin, l'imagerie multispectrale constitue un outil d'identification et de localisation de plusieurs fluorophores, et de détection des changements du microenvironnement comme le pH au niveau tissulaire et cellulaire. C'est une technique qui peut combiner à la fois trois moyens d'analyse : la microscopie, la spectroscopie par transformée de Fourier ou la spectroscopie interférentielle et l'imagerie de fluorescence. Son principe repose sur l'utilisation d'un interféromètre de Sagnac combiné à une caméra CCD (Figure 6).

La fluorescence émise par l'échantillon est collimatée et guidée vers l'interféromètre puis projetée sur une CCD. L'interféromètre divise la lumière reçue en deux faisceaux cohérents. Les différences du parcours optique entre les deux faisceaux, nécessaires pour produire un spectre, sont obtenues en réalisant une rotation mécanique assistée par ordinateur de l'interféromètre vis-à-vis de l'image de fluorescence produite par l'objectif d'une caméra ou d'un microscope. Les deux faisceaux sont ensuite combinés à nouveau pendant que le détecteur mesure les variations de l'intensité en fonction du parcours optique. Cette fonction de variations est appelée "interférogramme". L'interférogramme mesuré sur chaque pixel du détecteur CCD, reconstituant l'image de fluorescence, est recueilli et est ensuite converti en spectre par une transformée de Fourier. Ainsi, avec cette technique on peut tracer le spectre correspondant à chaque pixel de l'image de fluorescence tout en observant la totalité de l'image d'un échantillon tissulaire [Valisa 1995]. Cette technique peut potentiellement être employée en détection à filtrage temporel et pour la mesure de la diffusion Raman.

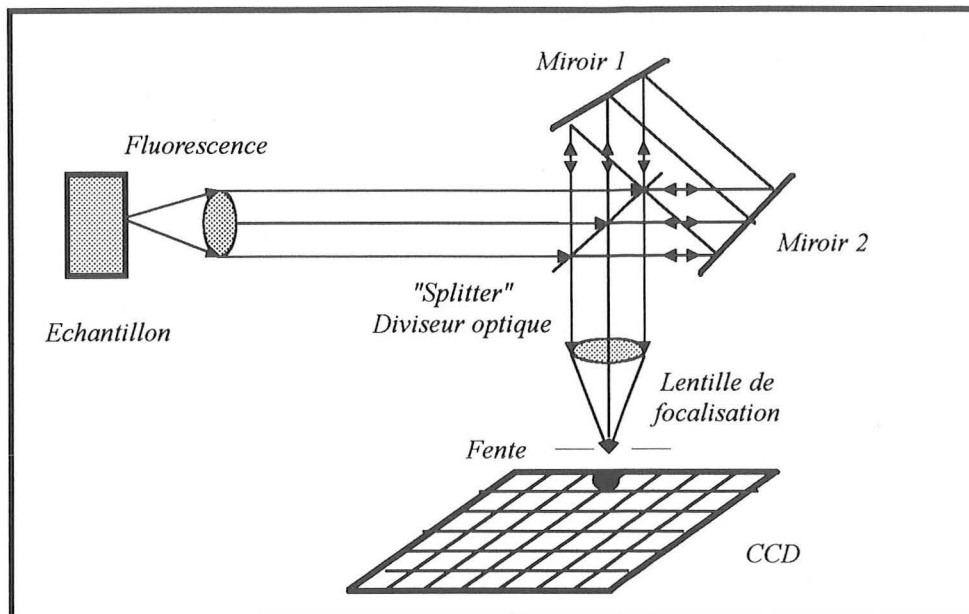


Figure 6 : Présentation simplifiée d'un interféromètre de Sagnac.

III.1.5. Revue de l'application clinique de la fluorescence induite en diagnostic

Le diagnostic basé sur la détection de la fluorescence induite de l'HpD a fait l'objet d'un très grand nombre d'investigations. Dans un article de revue de 1992, Andersson-Engels rapporte une étude réalisée sur 409 patients ayant différents types de lésions malignes. Les patients ont été examinés soit avec un laser argon (488-514 nm), soit avec un laser He-Cd (442 nm), soit avec une source de lumière blanche, généralement une lampe à mercure, filtrée à 365 nm. Une dose d'HpD de 5 mg/Kg du poids corporel a été administrée aux patients. La détection de fluorescence a été effectuée entre 48-72 h après l'injection du photosensibilisant. L'étude concernait des lésions tumorales du poumon, de l'oesophage, de l'estomac, du rectum, de la vessie, de la cavité orale, des yeux, de la peau et du cerveau. Trois cent trente quatre lésions /405 ont été distinguées par la signature spectrale de l'HpD, 32 lésions /405 avaient une fluorescence ambiguë, similaire à celle des tissus sains, le reste n'a pas été détectable. Une photosensibilisation cutanée a été observée chez 20 patients [Andersson-Engels 1992]. Dans une autre étude, il était possible de détecter des tumeurs vésicales avec une dose d'HpD de 2,5 mg/kg du poids corporel. Dans cette étude, la meilleure discrimination entre les tumeurs et les tissus sains environnants est obtenue 2 heures après l'injection intraveineuse [Andersson-Engels 1992].

D'autres chercheurs ont constaté que le cancer bronchique et les métaplasies de l'œsophage de Barrett pouvaient être détecté à un stade précoce par ratio de fluorescence en utilisant de très faibles doses de Photofrin II (0.25 mg/kg) sans provoquer une photosensibilisation cutanée [Lam 1990, Nilsson 1995].

Cependant, les inconvénients principaux des porphyrines et notamment l'HpD comme marqueur tumoral pour le diagnostic des cancers se résument par le fait que l'HpD n'est pas une seule composante chimique stable et bien caractérisée, il a une sélectivité relativement faible pour les tissus tumoraux (2-5), il provoque une photosensibilisation de la peau et son rendement quantique de fluorescence est très faible (0.02). De plus, un délai de 24 à 72 heures après l'injection intraveineuse est généralement nécessaire pour avoir le meilleur contraste [Profio 1988, Monnier 1992, Wagnières 1992, Falcoz-Vigne 1992, Diller 1994, Brault 1995].

L'application topique ou par instillation de fluorophores dans certaines localisations anatomiques est une alternative qui permet d'éviter les effets délétères systémiques. La production de Protoporphyrine IX par l'instillation de l'ALA dans la vessie donne actuellement des bons résultats pour la localisation des tumeurs [Forrer 1995, Lam 1995, Jichlinski 1996]. Mais, la photodétection ne peut intervenir que 2 à 4 heures après l'instillation, ce qui implique de ne pas uriner durant ce temps. Cependant, la fluorescence est visible à l'œil sans système d'amplification.

Stepp *et al.* ont réalisé une étude clinique de photodétection par l'ALA sur 104 patients ayant des lésions urothéliales (27 lésions primaires et 77 récidives). Pour la détection de la fluorescence induite de PpIX accumulé dans les lésions tumorales, un système composé d'une caméra vidéo CCD, d'un moniteur couleur, d'un spectroscope et d'un cystoscope a été employé. La source d'excitation était un laser Krypton (405 nm) ou une lampe xénon filtrée sur une bande passante allant de 375 à 440 nm. L'ALA a été administré soit par voie orale (40 mg/Kg du poids corporel), soit par inhalation (500 mg "10%"), soit par instillation intravésicale (1g "2%"). La détection de fluorescence a été réalisée entre 2-4 heures après l'instillation. Les autres modes d'administration ont servi à réaliser une étude pharmacocinétique (18 patients). Les mesures de fluorescence réalisées sur l'ensemble des patients ont montrées un contraste de valeur moyenne de 10,7 entre les tissus sains et les

tissus tumoraux. La sensibilité et la spécificité de cette technique étaient respectivement 97% et 67%. La sensibilité de détection par cystoscopie de fluorescence était meilleure qu'en cystoscopie généralement comprise entre 42% et 79%, par contre la spécificité était similaire [Stepp 1995].

Dans une étude réalisée sur 22 patients ayant différentes lésions tumorales de la vessie (carcinomes *in situ*, dysplasies et carcinomes urothéliaux), Rokahr *et al.* ont montré que le contraste, basé uniquement sur l'autofluorescence est meilleur qu'en utilisant la fluorescence de la PpIX induite par l'ALA. Les patients ont été divisés en deux groupes. Le premier groupe (10 patients) a été examiné après 2-4 heures de l'instillation de l'ALA avec un laser à colorant (405 nm) pompé par un laser à azote pulsé (337 nm, 3 ns). Le deuxième groupe (12 patients) a été examiné en autofluorescence avec le laser à azote. L'analyse de fluorescence a été réalisée par une technique spectroscopique. Une fonction de démarcation $D = \{(m_n - m_t) / (\sigma_n^2 + \sigma_t^2)^{0.5}\}$ a été définie pour mettre en évidence le contraste du signal mesuré (m_t et m_n sont respectivement les valeurs moyennes des ratios calculés à partir des spectres mesurés sur les tumeurs et les tissus normaux, σ_t et σ_n sont les écarts types correspondants). Les ratios de distinction ont été définis par $R1 = I(635 \text{ nm}) / I(490 \text{ nm})$ pour le groupe ALA et par $R2 = I(460 \text{ nm}) / I(400 \text{ nm})$ et $R3 = I(431 \text{ nm}) / I(390 \text{ nm})$ pour le groupe non-ALA. Les lésions tumorales du groupe ALA ont été classées avec une démarcation moyenne $D \approx 0,5$. La démarcation pour le groupe non-ALA a atteint une valeur moyenne $D \approx 1,5$ avec le ratio R2 et $D \approx 2$ avec le ratio R3 [Rokahr 1995].

D'autres familles de molécules ont récemment été employées en clinique. Ces molécules représentent des composés de la chlorophylle (Phéophorbide), des chlorines et des phtalocyanines [Santus 1990, Panjehpour 1992, Ris 1993, Henderson 1992]. Les chlorines et notamment la Méta-tétra(hydroxyphenyl)-chlorine "mTHPC" (Foscan[®]) qui présente une seconde génération de photosensibilisants est supposée avoir de bonnes propriétés de photodétection [Braichotte 1995, Forrer 1995]. Cependant, très peu d'études de photodétection basée sur la mTHPC ont été publiées.

Dans une étude clinique récente, 5 patients ayant des lésions bronchiques (2 carcinomes micro-invasifs et 3 carcinomes *in situ*) ont été examinés par un système d'imagerie et par spectroscopie de fluorescence (système de Lausanne). Une dose de mTHPC de 0,15 mg/Kg de poids corporel a été administrée aux patients par voie intraveineuse. La source

d'excitation lumineuse était un laser Krypton (407, 413 nm) couplé à l'optique d'un endoscope dont la puissance en sortie de l'optique était entre 10 et 25 mW. Les mesures spectroscopiques ont été réalisées avec une irradiance de 1-3 mW/cm² en sortie de fibre optique. La détection de la fluorescence induite de la mTHPC a été réalisée 96 après heures l'injection. Les ratios de sélectivité calculés à partir des spectres étaient compris entre 1,5 et 2,1. Les images réalisées sur les mêmes lésions dans deux régions spectrales (F: 600-720 nm, B: 520-580 nm) ont été traitées avec une fonction de discrimination, telle que :

$$\text{Image résultante} = [\text{Image (F)} - \text{Image (B)}]$$

Malgré le faible ratio de sélectivité, les images réalisées par le système ont permis de bien délimiter les lésions tumorales. Leur autofluorescence était très faible, probablement à cause d'une absorption par l'hémoglobine plus grande dans le vert que dans le rouge. Ainsi, le traitement d'image a permis de mieux visualiser ces lésions en fluorescence induite. Par contre, ce raisonnement ne peut être appliqué, à coup sûr, pour des lésions invisibles endoscopiquement [Forrer 1995].

III.1.6. Revue de l'application clinique de l'autofluorescence en diagnostic

Plusieurs équipes de recherche travaillent actuellement sur la détection et la localisation des cancers par autofluorescence. Les disciplines médicales essentiellement concernées par ces investigations sont la pneumologie, l'O.R.L., l'urologie et la gynécologie.

L'équipe d'Alfano fut parmi les premières à étudier l'autofluorescence tissulaire. Un laser argon (457, 488 et 514 nm) a été utilisé pour l'excitation des échantillons prélevés sur des tissus sains et tumoraux des bronches et des seins. Les spectres de l'autofluorescence ont montré des différences structurelles entre les tissus sains et tumoraux. Les différences ont été essentiellement reliées à l'absorption de l'hémoglobine dans les tumeurs et au gradient de concentration en riboflavine oxydée. Cependant, aucune différence de l'intensité spectrale n'a été reportée [Alfano 1989, Tang 1989].

Une autre étude expérimentale réalisée sur 50 échantillons tissulaires de l'estomac, de l'œsophage, de la cavité buccale et de la vessie a été rapportée. La source d'excitation était

un laser Xe-ion (365 nm). En plus de la différence en intensité, les spectres mesurés sur les bords des lésions tumorales ont été caractérisés par la présence de pics autour de 635 et 690 nm que l'on a attribué aux porphyrines endogènes [Yang 1987].

D'autres études ont été effectuées *in vivo* à une ou à plusieurs longueurs d'onde d'excitation. Hung *et al.* réalisent une investigation spectroscopique *in vivo* des bronches chez 31 patients (5 carcinome *in situ* et 26 carcinomes invasifs). Trois longueurs d'onde d'excitation ont été utilisées pour générer l'autofluorescence tissulaire (405, 442 et 488 nm). Pour les deux premières excitations, la distinction entre les tissus sains et les lésions tumorales a été essentiellement liée à la différence de l'intensité de l'autofluorescence (faible intensité dans les tumeurs). Une chute spécifique de l'intensité de l'autofluorescence dans les lésions tumorales a été observée dans la région bleu-vert pour l'excitation à 488 nm. ; ceci serait lié au déficit en formes oxydées des riboflavines [Hung 1991, Lam 1993]. Cependant, dans une étude réalisée à deux longueurs d'onde d'excitation (337 et 405 nm), l'autofluorescence des tumeurs et des tissus sains des bronches montre des différences persistantes dans l'allure et dans les intensités spectrales entre les tissus observés [Andersson-Engels 1991].

A l'issue d'une autre étude expérimentale et par simulation de Monte Carlo, il a été confirmé que la distinction entre les tumeurs et les tissus sains de la voie aéro-digestive supérieure est plus robuste en se référant à l'intensité de l'autofluorescence plutôt qu'à l'allure spectrale. En fait, l'intensité de l'autofluorescence des tumeurs excitées par un laser He-Cd (442 nm-cw), au moyen d'un capteur multifibre (1 excitatrice, 6 réceptrices), était de 6 à 15 fois plus faible que celle des tissus sains. Par contre, le ratio dans la même structure spectrale entre la région rouge (660-680 nm) et la région verte (500-550 nm) ne permettait pas une distinction des tissus pathologiques. La différence spectrale par rapport aux tissus sains n'était pas significative. Le ratio [R/V] des tumeurs bronchiques était supérieur de 0,15% à 0,25% par rapport à celui des tissus sains [Qu 1994-1995].

Panjehpour *et al.* ont réalisé une étude *in vivo* sur 36 patients ayant des dysplasies sévères associées à un œsophage de Barrett. Les dysplasies et les muqueuses saines avoisinantes ont été excitées par un laser à colorant (410 nm) pompé par un laser à azote pulsé (337 nm, 5 ns) au moyen d'un capteur optique multifibre (1 excitatrice & 12 réceptrices, $\varnothing=200 \mu\text{m}$). L'analyse différentielle normalisée des spectres de l'autofluorescence a montré deux zones

ayant un intérêt diagnostique, centrées vers 480 nm et 660 nm. Un modèle d'analyse discriminante à deux critères (intensités différentielles normalisées à 480 et 660 nm) a permis de classer tous les tissus examinés correctement (100%) [Panjehpour 1996]. Dans une étude récente réalisée sur des sites tissulaires sains et dysplasiques de la voie aérodigestive supérieure, chez 19 patients, à deux longueurs d'onde d'excitation (370 et 410 nm), Dhingra *et al.* ont montré qu'une excitation résonante (410 nm) des porphyrines endogènes permettait une distinction optimale des tissus pathologiques. Il ont proposé le ratio $I(640\text{ nm})/I(490\text{ nm})$, qui était supérieur à 6, comme un critère de discrimination [Dhingra 1996].

Cothren *et al.* ont employé un capteur multifibre (1 excitatrice, 9 réceptrices) pour guider la lumière d'un laser à colorant (370 nm, 3 ns) pompé par un laser à azote et pour l'acquisition de l'autofluorescence *in vivo* chez 20 patients ayant différentes lésions du colon (32 sites normaux, 31 adénomes et 4 papillomes hyperplasiques). L'intensité de la fluorescence due au NADH (460 nm) des tissus sains était 4 fois plus forte que celle des adénomes. Par contre, l'intensité de la fluorescence à des longueurs d'onde supérieures à 650 nm était plus importante dans les adénomes que dans les tissus sains. Par rapport aux longueurs d'onde citées ci-dessus, les papillomes hyperplasiques avaient des intensités intermédiaires. Le critère de distinction, constituant le ratio $I(460\text{ nm})/I(680\text{ nm})$, a permis de classer les tissus examinés avec une sensibilité de 100%, une spécificité de 97% et une valeur de prédiction de 94% [Cothren 1990].

En utilisant la technique spectrale bidimensionnelle d'excitation et d'émission 2-EMM, Richards-Kortum *et al.* ont montré que l'excitation optimale de la muqueuse colique peut être réalisée à 330, 370 ou 430 nm ± 10 nm. Ainsi, pour une excitation de 370 nm, les longueurs d'onde d'émission situées à 404, 480 et 680 nm sont utilisées comme critères de distinction entre les tissus sains et les tissus pathologiques du colon [Richards-Kortum 1991, Rava 1991]. Marchesini *et al.*, dans une étude réalisée sur 83 échantillons prélevés sur des muqueuses saines et tumorales du colon de 45 patients, rapportent que pour une excitation à 410 nm, l'intensité de l'autofluorescence dans la bande spectrale de 460-530 nm décroît graduellement à partir des muqueuses normales (n=42) vers les adénocarcinomes (n=19) et enfin vers les adénomes (n=5). Néanmoins, les adénocarcinomes ont été caractérisés par une émission à 635 nm [Marchesini 1992]. L'émission spécifique des tissus

tumoraux à 635 nm, attribuée aux porphyrines endogènes, a été confirmée par spectroscopie résolue dans le temps (λ_{ex} : 505 nm, délai : 20 ns) par Ebert [Ebert 1995].

Lohman *et al.* 1989, ont réalisé une étude *ex vivo* sur des tissus sains (n=32) et tumoraux (19 dysplasies, 5 carcinomes) du col de l'utérus. Les spectres des tissus excités à 365 nm (lampe à mercure filtrée, FWHM=11 nm) ont été caractérisés par une émission à 475 nm attribuée à la NADH. Cette émission était 10 fois plus importante au bord des tumeurs que dans les tissus sains et augmentait avec le degré de la malignité, tandis que la fluorescence, à cette longueur d'onde, était quasi nulle au milieu des lésions tumorales [Lohman 1989].

Glassman *et al.* ont utilisé des excitations U.V. (300 & 320 nm) produite par une lampe xénon filtrée (FWHM=5 nm) pour examiner 18 échantillons tumoraux de différents degrés de malignité et 10 échantillons de tissus normaux de l'utérus. Deux critères de distinction ont été définis pour l'interprétation des spectres de l'autofluorescence :

$$R1=I(340\text{ nm})/I(440\text{ nm}), \lambda_{ex}=300\text{ nm}$$

$$R2=I(383\text{ nm})/I(460\text{ nm}), \lambda_{ex}=320\text{ nm}$$

Le ratio R1 était supérieur à 12 (12-500, moyenne=62,1) pour tous les tissus tumoraux et inférieur à 11 (5,8-11, moyenne=7,8) pour tous les tissus sains. Le ratio R2 était inférieur à 1 (0,05-2, moyenne=0,8) pour la majorité des tissus tumoraux et supérieur à 1 (0,55-2,6, moyenne=1,45) pour la majorité des tissus sains. Ainsi, le choix du ratio s'est porté sur R1, car il était plus significatif pour la différenciation entre les tissus examinés (sensibilité 95%, spécificité 100%) [Glassman 1992]. Pourtant, la diminution d'un ratio comme R2 dans les spectres des tumeurs reflète l'augmentation de la NADH et la diminution du collagène en fonction du degré de la malignité et par conséquent de l'épaississement de l'épithélium [Schomaker 1992, Kholli 1995]. Cette analyse qui relie la diminution du signal de la fluorescence du collagène à l'épaississement de l'épithélium (car le collagène n'est présent qu'au delà de l'épithélium), peut être plus cohérente que le choix du ratio avec une intensité arbitraire de 440 nm [Kholli 1995]. Le choix de la longueur d'onde d'analyse a été étudié par Mahadevan *et al.* lorsqu'ils ont réalisé des matrices bidimensionnelles d'excitation et d'émission sur 18 biopsies du col de l'utérus. Ils ont montré que la meilleure longueur d'onde

d'excitation pour des localisations utérines était de 330 nm et que la meilleure distinction pouvait être obtenue par rapport à l'émission de fluorescence vers 385 nm (Collagène) [Mahadevan 1993].

Le tableau 3 résume les différents travaux présentés dans cette étude.

Tableau 3 : Récapitulation des travaux réalisés par spectroscopie de l'autofluorescence

patients ou échantillons	Localisation tumorale	λ ex [nm] Pulsé /cw	Etude clinique	Critères de distinction	Capteur	Référence
32 papillomes 19 dysplasies 5 CIS	col de l'utérus	LF-Hg 365	Ex vivo	Intensité de fluorescence $R=I_{TS}(475nm)/I_T(475nm)$ par rapport à la NADH	Excitation directe	Lohman 1989
10 patients 10 sains 18 cancers	gynécologie	LF-Xénon 300 320	Ex vivo	$R1=I(340\text{ nm})/I(440\text{ nm})$ $R2=I(383\text{ nm})/I(460\text{ nm})$ dans chaque spectre	Excitation directe	Glassman 1992
10 sains 10 cancers	utérus	LF-Xénon 330	Ex vivo	Intensité relative à 385 nm	Excitation directe	Mahadevan 1993
28 patients 66 sains 5 inflamm. 21 papillome 23 CIS	utérus	Azote-Pls 337	In vivo	Pente de 420-440 en fonction de l'intensité relative de fluorescence	Monofibre	Ramanujam 1994
15 sains 16 cancers	seins	Argon-cw 457, 488 & 514	Ex vivo	Allure spectrale, sans précision de la différence de l'intensité spectrale	Excitation directe	Alfano 1989
11 sains 10 cancers	bronches	Argon-cw 457, 488 & 514 cw	Ex vivo	Allure spectrale, sans précision de la différence de l'intensité spectrale	Excitation directe	Tang 1989
31 patients 5 CIS 26 cancers	bronches	Krypton 405 He-cd 442 & Argon 488 cw	In vivo	Intensité de fluorescence $R=I_{TS}(520\text{ nm})/I_T(520\text{ nm})$	Monofibre $\varnothing=600\ \mu\text{m}$	Hung 1991
Sans précision	poumons & estomac	Azote Pls 337 & HeNe 633	Ex vivo	$R=[I_T/I_{\text{rétrodiffusée}(T)}] / [I_{Ts}/I_{\text{rétrodiffusée}(Ts)}]$ Porphyrines endogène > 670 nm	Monofibre	Loschenov 1992
32 patients 108 sains 26 adénocar. 36 carcinomes	œsophage	Azote- Pls Colorant 410	In vivo	Proportion des intensités spectrales à 490, 580, 670, 685 et 715 nm, analyse discriminante	Multifibre ($I_{\text{ex}}+7_{\text{récep}}$) $\varnothing=200\ \mu\text{m}$	Panjehpour 1995

patients ou échantillons	Localisation tumorale	λ_{ex} [nm] Pulsé /cw	Etude clinique	Critères de distinction	Capteur	Référence
48 Patients 200 sites cancers et sains	œsophage	Azote- Pls Colorant 410	<i>In vivo</i>	Spectre différentiel normalisé, λ_{em} d'intérêt (480 nm & 660 nm)	Multifibre (7 _{ex} +12 _{récep}) Ø=200µm	Vo-Dinh 1996
13 Patients 19 dysplasies	appareil aérodigestif supérieur	Azote- Pls Colorant 370, 410	<i>In vivo</i>	R=I(640 nm)/I(490 nm) Porphyrines endogène	Multifibre (1 _{ex} +6 _{récep}) Ø=200µm	Dhingra 1996
69 sains 47 adénomes 16 papillomes	colon	He-Cd 325 cw	<i>Ex vivo</i>	Proportion des intensités spectrales à 350, 380, 395, 440, 560 & 590 nm Analyse multivariable de régression linéaire (MVLRL)	Monofibre Ø=400µm	Kapadia 1990
20 Patients 32 sains 31 adénomes 4 papillomes	colon	Azote-Pls 337	<i>In vivo</i>	R=I(640 nm)/I(490 nm) Porphyrine / NADH	Multifibre (1 _{ex} +9 _{récep}) Ø=200µm	Cothren 1990
45 patients 42 sains 19 adénocar. 5 adénomes	colon	410	<i>Ex vivo</i>	Ratios I(480 nm), I(520 nm) & I(530 nm) / I(500 nm), I(635 nm) Porphyrine	Excitation directe	Marchesins 1992
sains, papillomes et adénomes	Colon	Azote-pls colorant 410	<i>In vivo</i>	Spectre différentiel normalisé, λ_{em} d'intérêt 477 nm	Multifibre (7 _{ex} +12 _{récep}) Ø=200µm	Vo-Dinh 1996
25 Patients 23 sains 15 inflamm. 21 cancers 5 CIS	Vessie	XeCl-Pls 308 337 colorant 480	<i>In vivo</i>	R=I(360 nm)/I(440 nm) pour λ_{ex} 308 nm	Monofibre Ø=1 mm + Multifibre (7 _{ex} +12 _{récep}) Ø=200 µm	Ettori 1996

Abréviations : CIS : carcinome *in situ*, Pls : laser en mode pulsé, cw : laser en mode continu, LF : lampe filtrée, R : région spectrale rouge, V : région spectrale verte.

III.2. PHOTODETECTION PAR SPECTROSCOPIE RAMAN

La spectroscopie Raman représente un moyen d'analyse permettant d'étudier les changements d'énergie interne des molécules simples et complexes dans des milieux liquides, solides ou poudres, lorsque celles-ci sont excitées par une lumière monochromatique située dans l'ultraviolet ou le visible. En fait, la transition électronique dans une molécule est rarement une transition électronique pure mais plus couramment une transition complexe ou vibronique : passage d'un niveau électronique E_1 à un niveau électronique E_2 et passages simultanés des niveaux de vibration V_1 et rotation R_1 aux niveaux de vibration V_2 et rotation R_2 [Barriol 1970, Courtot 1972].

La spectroscopie Raman est régie par un mécanisme qui dépend de la collision du quantum de lumière incidente avec la molécule. L'effet de cette collision perturbe la molécule et lui fait subir une des trois transitions possibles : rotationnelle pure ou vibrationnelle pure ou encore rotationnelle - vibrationnelle [Walker 1962, Specrum 1994]. Par conséquent, le quantum de la lumière émise est définie par la quantité d'énergie et les changements qu'elle produit (Figure 7) :

- rotationnel pur, si la molécule tourne sur elle-même :

$$h\nu = (E_{r2} - E_{r1})$$

- vibrationnel pur, si la molécule se déforme et oscille de la même façon qu'un ressort parfaitement élastique :

$$h\nu = (E_{v2} - E_{v1})$$

- rotationnel - vibrationnel :

$$h\nu = (E_{v2} - E_{v1}) + (E_{r2} - E_{r1})$$

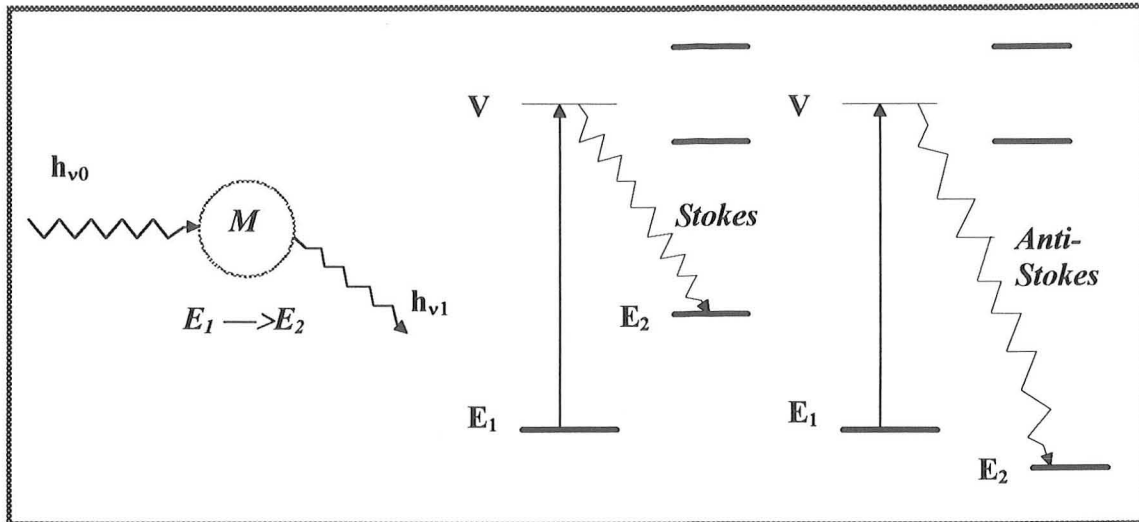


Figure 7 : Diagramme des niveaux d'énergie de la diffusion Raman [Demtröder 1995].

L'énergie E_2 peut être rotationnelle, vibrationnelle ou rotationnelle-vibrationnelle.

Le critère de Raman dépend du changement de la polarité durant la vibration, ce changement donnant des informations sur les paramètres tels que les distances internucléaires et les fréquences vibrationnelles. Ces dernières sont utilisées pour la détermination structurale.

III.2.1. L'effet Raman

L'effet Raman se produit quand une lumière monochromatique intense, généralement issue d'un laser, d'une fréquence ν_0 , traverse une cellule contenant des molécules. La plus grande partie de la puissance optique est diffusée sans changement de longueur d'onde : c'est la diffusion "Rayleigh".

Une faible quantité de la lumière est également diffusée mais à des fréquences différentes comme : $(\nu_0 - \nu_1)$ et $(\nu_0 + \nu_1)$; c'est la diffusion Raman. La diffusion Raman s'effectue simultanément vers les longueurs d'onde plus longues, de plus faible énergie, dite "Anti-Stokes" et vers les longueurs d'ondes plus courtes dites "Stokes". L'émission des raies Stokes est plus importante que celle due aux Anti-Stokes [Spectrum 1994, Demtröder 1995].

En Raman, les niveaux d'énergie intéressants correspondent aux états internes vibrationnels et rotationnels des molécules. Les énergies correspondant aux transitions entre ces niveaux sont faibles, de l'ordre de 1eV. Si la lumière incidente est située dans la région visible du spectre, la plupart des émissions Stokes et Anti-Stokes dues aux états vibrationnels et rotationnels moléculaires seront situées dans une région spectrale de ± 150 nm autour de la radiation d'excitation [Spectrum 1994].

En spectroscopie Raman, plutôt que les longueurs d'onde absolues, on utilise la différence en longueur d'onde entre les diffusions Raman et Rayleigh. Cette différence s'exprime par :

$$\text{Raman shift [cm}^{-1}\text{]} = (1/\lambda_i) - (1/\lambda_R)$$

où λ_i est la longueur d'onde d'excitation et λ_R est la longueur d'onde de l'émission Raman. Les états naturels vibrationnels et rotationnels, les niveaux d'énergie intramoléculaires sont décrits par cette relation.

III.2.2. Potentiel diagnostique

Les informations obtenues à partir des spectres de Raman, comme les états naturels vibrationnels et rotationnels ainsi que les niveaux d'énergie intermoléculaires, sont très utilisées en laboratoire pour l'analyse de la structure et l'identification chimique des molécules. Cette analyse peut à la fois être qualitative et quantitative. Les fréquences vibrationnelles déterminées à partir du spectre Raman d'une substance peuvent être utilisées pour l'identifier [Jun 1995, Demtröder 1995]. Le spectre Raman d'un mélange de composants représente la superposition de tous les spectres de chacun de ces composants. En principe, l'effet Raman permet également l'analyse quantitative car l'intensité d'un pic Raman est, en général, directement proportionnelle à la concentration volumique du composant ayant induit cet effet. Mais, à cause de l'autofluorescence qui masque la diffusion Raman et la variation de l'intensité des sources lumineuses, l'analyse quantitative est relativement difficile.

Le spectre Raman est composé de pics très étroits spécifiques aux molécules, ce qui est plus lisible qu'un spectre de fluorescence souvent très étendu. Comme la spectroscopie

d'autofluorescence, aucune manipulation ou préparation préalable n'est nécessaire pour l'application *in situ* de la spectroscopie Raman. Cependant, ses applications *in vivo* sont très limitées, car les émissions Raman sont très faibles par rapport à la diffusion Rayleigh (de l'ordre de 10^{-6}) et même par rapport à l'émission de l'autofluorescence ; elle sont difficiles à détecter. Par conséquent, la détection des émissions Raman nécessite un temps d'acquisition relativement long, de l'ordre de 100 secondes. La source d'excitation lumineuse utilisée pour la spectroscopie Raman est généralement un laser argon continu et bien focalisé sur l'échantillon. Une puissance incidente de 100 mW est nécessaire pour obtenir un signal Raman détectable [Spectrum 1994].

En 1989, Alfano *et al.* étudièrent les différences spectroscopiques entre les tissus sains et les cancers du poumon et les cancers du sein. Cette étude concernait à la fois les spectres de l'autofluorescence et les spectres Raman. Un laser argon (488 & 514 nm), modulé par un chopper à une fréquence de 100 Hz, servait pour l'excitation des échantillons. La puissance de tir laser a été réglée entre 1 et 100 mW. Les résultats des mesures effectuées sur les tissus normaux des seins ont été divisés en deux groupes. Le premier groupe qui représente 11/15 échantillons, a été caractérisé par des pics Raman vers 1036, 1242, 1584, 2745 et 2944 cm^{-1} . Le deuxième groupe qui représente 4/15 échantillons manquait de structures spectrales (sans pics de Raman). En ce qui concerne les tissus tumoraux, dans 14/16 échantillons tumoraux aucun pic Raman n'a été détecté. Des résultats similaires ont été obtenus pour les échantillons prélevés sur des poumons de 11 patients. La sensibilité de détection des tumeurs par rapport aux pics Raman était de 0,72 pour l'ensemble des échantillons [Alfano 1989, Tang 1989].

Dans une étude récente, Boustany *et al.* ont utilisé un laser saphir pompé par un laser à argon pour générer des impulsions de 2-3 ps et de longueur d'onde de 251 nm à une puissance de 3 mW. Cette lumière a été employée pour l'irradiation de 100 échantillons sains et tumoraux (adénocarcinomes) de la muqueuse du colon chez 4 patients. L'acquisition des spectres Raman a été réalisée par un spectromètre couplé à un CCD refroidi à l'azote liquide durant un temps d'intégration de 100 secondes. Dans les lésions tumorales, la contribution, dans le spectre global des émissions Raman dues aux acides nucléiques était plus importante que celle dans la muqueuse saine. Par contre, la contribution des acides aminés aromatiques dans la muqueuse saine était plus importante que celle dans la tumeur [Boustany 1996]. Il

est possible que le diagnostic par effet Raman soit basé sur la différence de contribution de ces acides entre les tissus sains et les tissus tumoraux.

Le filtrage holographique, réjecteur de bande spectrale étroite, a récemment été introduit en spectroscopie Raman. Le filtre holographique est utilisé en préfiltrage devant le spectrographe pour éliminer la rétrodiffusion du laser et la diffusion Rayleigh. Cette technique combinée à un filtrage temporel du signal détecté en utilisant un détecteur CCD intensifié doit constituer un système de détection Raman très performant. Le filtrage temporel permet d'éliminer l'autofluorescence masquant la faible diffusion Raman. En utilisant un laser pulsé, l'effet Raman qui est simultanément à l'excitation laser, peut être dissocié de l'autofluorescence persistante. L'acquisition de la diffusion Raman sera réduite à la durée de l'impulsion laser et le temps d'intégration peut être réduit à quelques secondes [Spectrum 1994].

IV. LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE

La thérapie photodynamique est une méthode physico-chimique destinée au traitement local des tumeurs cancéreuses. Son principe général repose sur la destruction sélective des cellules néoplasiques tout en préservant les cellules saines environnantes [Wilson 1986, Manyak 1988, Henderson 1992, Guillemin 1995]. La préparation d'un dérivé d'hématoporphyrine soluble en 1960 par Lipson a constitué une étape importante dans le développement de cette technique pour le dépistage et le traitement de tumeurs expérimentales puis humaines [Girardeau-Montaut 1986]. Ensuite, l'utilisation des lasers comme sources photoniques en 1975 par Dougherty avec les dérivés d'hématoporphyrine a donné une importance grandissante à la thérapie photodynamique [Fisher 1995]. Ainsi, parallèlement aux travaux de recherche *in vitro* et *in vivo* qui se poursuivent aujourd'hui, la thérapie photodynamique (PDT) est appliquée chez l'homme depuis 1980. Elle s'adresse à titre curatif aux cancers de petite taille chez des patients inopérables ou à titre palliatif aux cancers avancés et aux récidives [Girardeau-Montaut 1986, Santus 1990]. Les principaux cancers concernés par cette thérapie sont : les cancers bronchiques, les cancers de la vessie, les cancers de l'œsophage et les cancers de la peau. Des rémissions tumorales complètes au delà de 5 ans, observées par les différentes équipes, laissent présager que la thérapie photodynamique représente une méthode intéressante en cancérologie [Girardeau-Montaut 1986].

IV.1. PRINCIPE DE LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE

A l'intérieur de la fenêtre thérapeutique (600-900 nm), le rayonnement laser pénètre profondément dans la plupart des tissus. La distribution intra-tissulaire du rayonnement montre que dans cette bande spectrale, la diffusion est dominante. Un photosensibilisant ayant un spectre d'absorption adapté est administré au patient, s'il est retenu sélectivement dans certains tissus, leur irradiation à la longueur d'onde appropriée déclenche des réactions photochimiques *in vivo* et par suite des transformations biologiques pouvant aboutir à la destruction de ces tissus [Boulnois 1986]. La thérapie photodynamique repose sur ce principe (Figure 8).

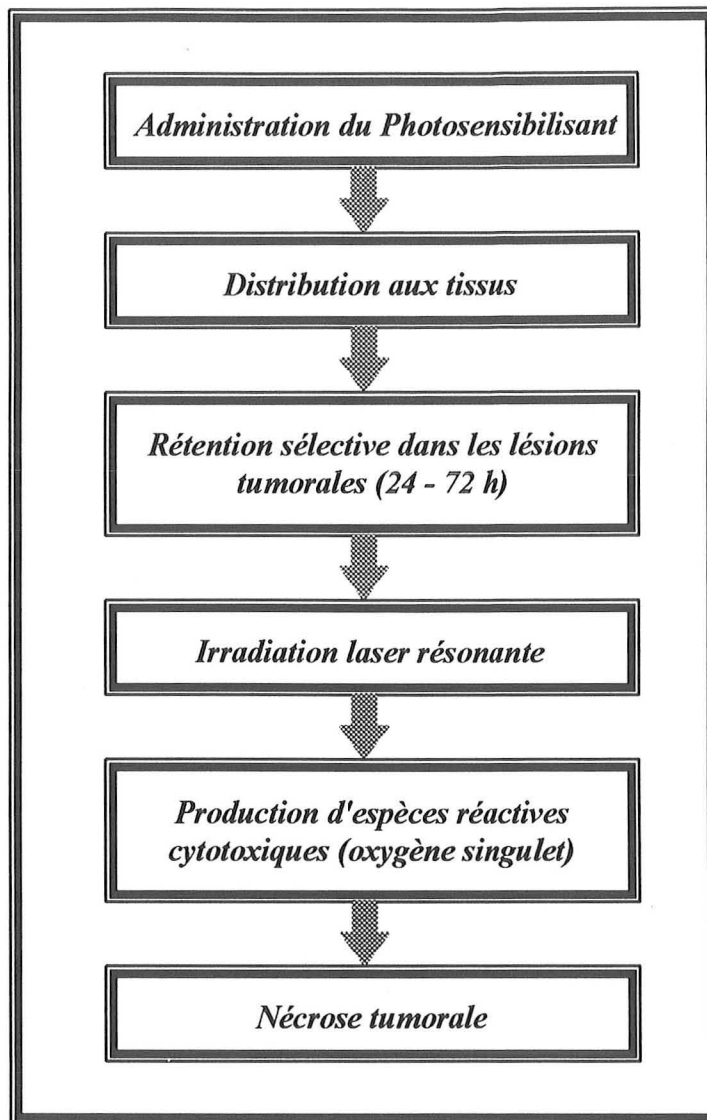


Figure 8 : Principe de la thérapie photodynamique.

En effet, le principe de la thérapie photodynamique consiste à administrer au patient, essentiellement par voie intraveineuse, un agent photosensible. Les agents les plus employés actuellement sont les dérivés des porphyrines, des chlorines, des phtalocyanines,... Ces substances ont la propriété d'être retenues préférentiellement dans les tumeurs cancéreuses et dans certains organes (le foie, la rate et les reins) ainsi que dans la peau pendant plusieurs jours [Ankerst 1984, Michael 1988, Henderson 1992].

L'irradiation lumineuse résonante des zones à forte concentration en photosensibilisant produit des réactions photochimiques qui aboutissent à la destruction des cellules tumorales. Le transfert d'énergie du photosensibilisant excité à l'oxygène tissulaire produit de l'oxygène

singulet " $^1\text{O}_2$ " qui est le principal responsable des effets cytotoxiques car c'est un oxydant très puissant [Boulnois, Henderson 1992].

IV.2. LA REACTION PHOTOCHEMIQUE (CONVERSION INTERSYSTEME DE JABLONSKI)

Lorsque la réponse induite par irradiation met en jeu les structures électroniques moléculaires, la transformation est appelée photochimique. Les phénomènes physiques responsables des phénomènes d'excitation et de désactivations sont connus.

La série de réactions moléculaires peut être séparée en plusieurs phases :

- excitation ;
- désactivation radiative (fluorescence), ou non radiative par conversion interne (CI), relaxation vibrationnelle ou par conversion inter-système (CIS), (Voir diagramme de Jablonski, section III.1.1, page 34) ;

Cette dernière désactivation dans laquelle la perte d'énergie n'est que partielle, implique un inversement du spin de l'électron excité. Ainsi, les deux électrons de la paire qui a été rompue possèdent le même sens de rotation sur eux-mêmes. Cet état de multiplicité de spin différente est nommé état triplet. L'excitation directe de la molécule de l'état fondamental à l'état triplet n'est pas possible : cet état ne peut être atteint que par l'intermédiaire d'un état singulet. Le déclin de l'état triplet (10^{-3} -10 s) vers l'état fondamental est beaucoup plus lent que celui de l'état singulet, ce qui permet à la molécule de photosensibilisant d'interagir avec d'autres molécules [Meunier 1992, Henderson 1992].

Des processus chimiques peuvent être induits grâce à l'excès d'énergie de cet état (Figure 9). Dans les mécanismes dits de type I, le photosensibilisant (PS) réagit chimiquement avec des molécules en interaction directe. Des réactions d'oxydoréduction conduisent à des espèces radicalaires et à la dégradation des molécules avoisinantes. Le photosensibilisant est le plus souvent détruit au cours de ces réactions. L'autre voie, dite de type II, est un transfert d'énergie à l'oxygène (naturellement à l'état triplet) qui aboutit à la production d'espèces cytotoxiques hautement réactives (production d'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$). Il est probable que les deux types de réactions photochimiques coexistent mais leur importance relative dépend

du degré d'oxygénation des tissus [Brault 1995, Henderson 1992]. Quoiqu'il en soit ces espèces radicalaires vont entraîner des réactions d'oxydation ou de peroxydation irréversibles au niveau des cellules qui ont fixé le photosensibilisant aboutissant à la destruction cellulaire.

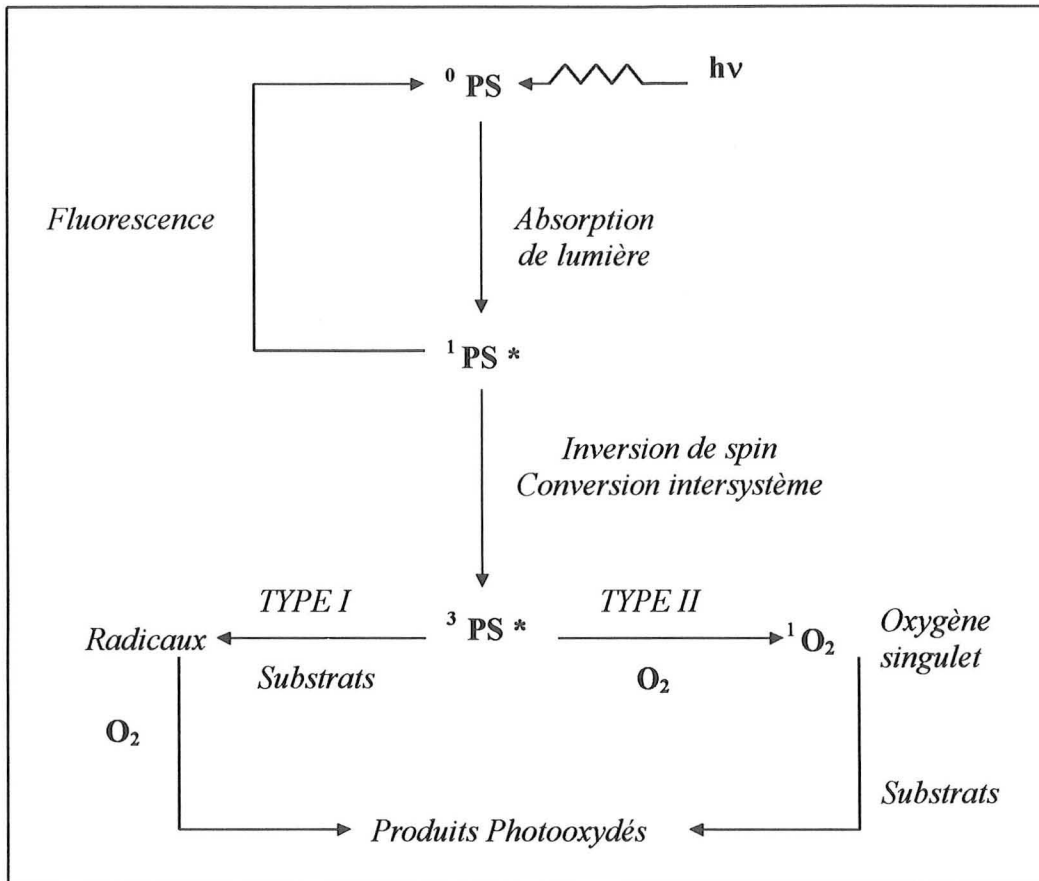


Figure 9 : Schéma des phénomènes photochimiques.

Les photosensibilisants, sous l'influence de la lumière utilisée pour les exciter, sont dégradés progressivement : c'est le phénomène de photoblanchiment. Cette dégradation, qui se manifeste par la diminution de l'intensité de fluorescence, est plus rapide à pH élevé et en présence d'oxygène. On retrouverait ces conditions dans les tissus normaux où la dégradation des photosensibilisants serait plus rapide réduisant ainsi les effets secondaires délétères [Patrice 1995, Ma 1994].

Ce phénomène de photoblanchiment peut être exploité pour effectuer le traitement d'une tumeur profonde et améliorer l'index thérapeutique. Une première irradiation lumineuse induit une dégradation du photosensibilisant dans les couches superficielles des tissus sains

sans qu'ils soient endommagés. Plus profondément, les molécules photosensibles retenues dans la tumeur restent disponibles. Une irradiation plus intense aboutit à la destruction de la lésion tumorale tout en préservant les tissus sains voisins [Braichotte 1992, Jacques 1993, Ma 1994].

IV.3. LE PHOTOSENSIBILISANT

Pour caractériser les molécules qui peuvent atteindre un état excité ou aboutir à des effets photochimiques, on définit des rendements quantiques qui se réfèrent à l'absorption d'un photon de lumière. Un agent photosensibilisant doit présenter un rendement d'état triplet et un rendement de production d'oxygène singulet le plus élevé possible. De plus, l'énergie de l'état triplet doit être au moins égale à celle nécessaire pour porter l'oxygène de son état fondamental à son état singulet excité. Ainsi, la bande d'absorption du photosensibilisant doit être située au maximum dans le proche infrarouge (< 800 nm). Les porphyrines, les chlorines et les phtalocyanines répondent plus ou moins à ces critères. Le rendement quantique en oxygène singulet de ces molécules est de l'ordre de 0,5-0,9 [Brault 1995, Meunier 1992, Panjehpour 1992].

La plupart des préparations actuellement en usage clinique dérivent essentiellement des porphyrines (HpD). L'HpD se compose de plusieurs fractions porphyriniques, c'est donc un mélange complexe. En clinique, la forme oligomère (Photofrin) qui se présente sous forme d'agrégats est la plus cytotoxique et elle est utilisée à la dose de 2 à 2,5 mg/Kg. L'inconvénient de cette famille de photosensibilisants est essentiellement lié à leur composition complexe et à leur faible rendement quantique en état triplet à une irradiation de 630 nm. La nécrose tissulaire induite est de l'ordre de 1-6 mm [Santus 1991, Fisher 1995]. D'autre part, l'énergie nécessaire pour induire la nécrose tumorale est relativement élevée, ce qui nécessite des temps d'irradiation longs pour des lésions étendues [Ris 1993]. De plus la sélectivité maximale de ces produits, qui est atteinte entre 24 et 72 heures après l'administration aux patients, est loin d'être idéale puisque la valeur du gradient de concentration [tumeur / tissus sain] est souvent comprise entre 2:1 et 5:1 à l'exception du cerveau où il peut atteindre 10:1 [Andersson-Engels 1992].

Les chlorines et notamment la méta-tétra (hydroxyphenyl) chlorine "mTHPC" ont été récemment introduite en thérapie photodynamique pour le traitement des carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures [Braichotte 1992, Braichotte 1995, Ma 1994]. Cette seconde génération de photosensibilisants possède une absorption dans le rouge à 652 nm et un rendement de production d'oxygène singulet très élevé de l'ordre de 80%. Comparée à l'HpD, c'est une substance quasi pure > 99%, de molécules très stables, même sous un flux lumineux intense. Ce produit, qui a été testé cliniquement, présenterait une sélectivité tumorale supérieure à 15 et de bonnes propriétés de fluorescence pour la photodétection [Braichotte 1992]. D'autres études plus récentes rapportent des ratios de fluorescence tumeur/tissu sain pouvant aller de 1 à 18 [Alian 1994, Braichotte 1995]. Une dose de 0,15-0,3 mg/Kg de la mTHPC permet, au bout d'un intervalle de temps de 24 à 96 heures après l'administration, d'obtenir une nécrose jusqu'à 10 mm de profondeur [Ris 1993, Ma 1994].

L'utilisation de l'acide delta-aminolévulinique (ALA) représente une nouvelle approche très intéressante pour le développement de la thérapie photodynamique [Andersson-Engels 1995]. Physiologiquement, toutes les cellules de l'organisme sont capables de synthétiser des noyaux porphyriniques par condensation d'une molécule d'acide succinique et une molécule de glycine composant l'ALA. L'administration d'un excès d'ALA incite les cellules à fabriquer en grande quantité de la protoporphyrine IX (PpIX) [Loh 1993, Fisher 1995, Schuitmaker 1996]. L'administration de l'ALA peut être réalisée par voie intraveineuse ou orale, en application topique ou par instillation. Grâce à une bonne sélectivité tumorale de l'ALA, la production de PpIX peut être atteinte en 2-4 heures. A condition que l'efficacité thérapeutique de cette approche soit bonne, l'induction de PpIX paraît avantageuse car la photodétection et le traitement photodynamique peuvent être entreprises peu de temps après l'administration de l'ALA. Par opposition à l'administration systémique, lors d'une application topique, la production de PpIX est limitée aux zones à traiter et évite la photosensibilisation de structure voisines saines et de la peau.

A l'exception de l'ALA-PpIX et la BPD qui s'éliminent en quelques heures, l'inconvénient principal de l'ensemble des photosensibilisants administrés par voie générale réside dans le manque de sélectivité et leur rétention prolongée dans la peau durant 2 et 6 semaines. Cette

rétenion peut être, en absence de précaution, à l'origine d'une photosensibilisation cutanée [Wilson 1986].

IV.3.1. Spectres d'excitation et d'émission

L'HpD est constitué d'un mélange de porphyrines dont l'absorption est maximale dans le bleu violet à 400 nm (Figure 10). Cette importante bande d'absorption est appelée bande de Soret. Il existe par ailleurs quatre bandes d'absorption plus faibles appelées bandes Q et situées entre 500 et 630 nm. Suite à une excitation lumineuse, l'HpD émet un signal de fluorescence composé de deux pics autour de 615-630 et 675-690 nm.

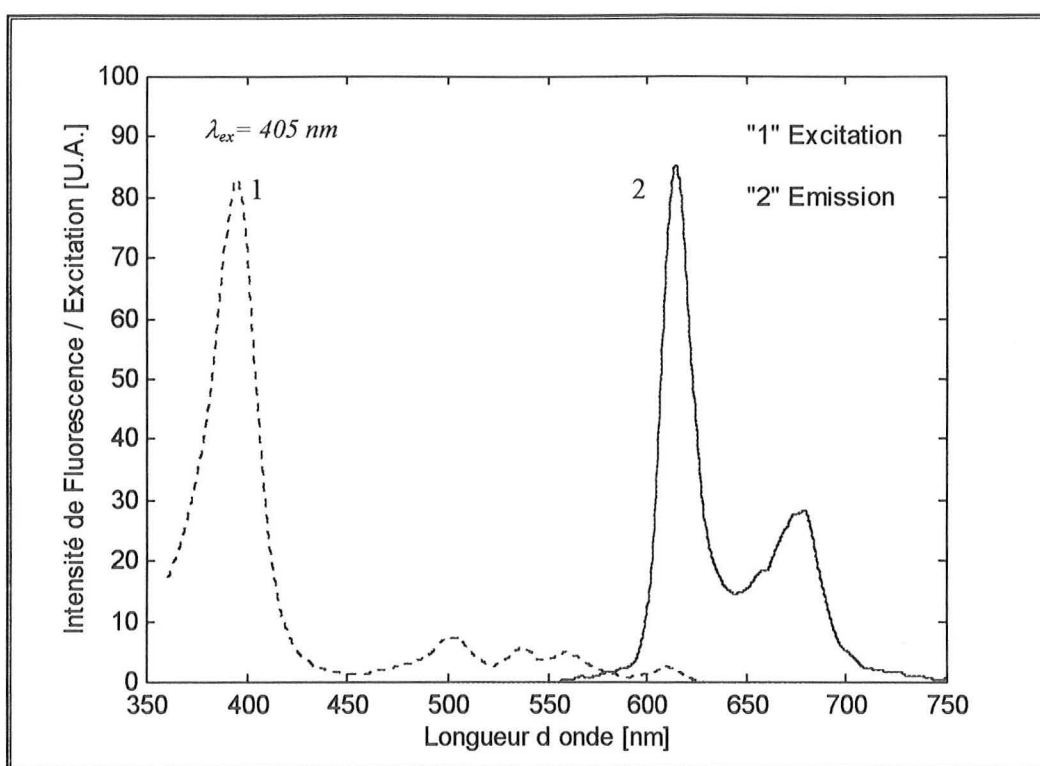


Figure 10 : Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de l'HpD (3µg/ml en PBS+2% SVF).

La mTHPC présente des pics d'excitation autour de 420, 519, 555, 599 et 650 nm. Ce dernier étant le plus intéressant pour le traitement. Son spectre de fluorescence est caractérisé par une bande d'émission allant de 625 à 745 nm avec un pic central à 652 nm et un pic secondaire à 714 nm (Figure 11).

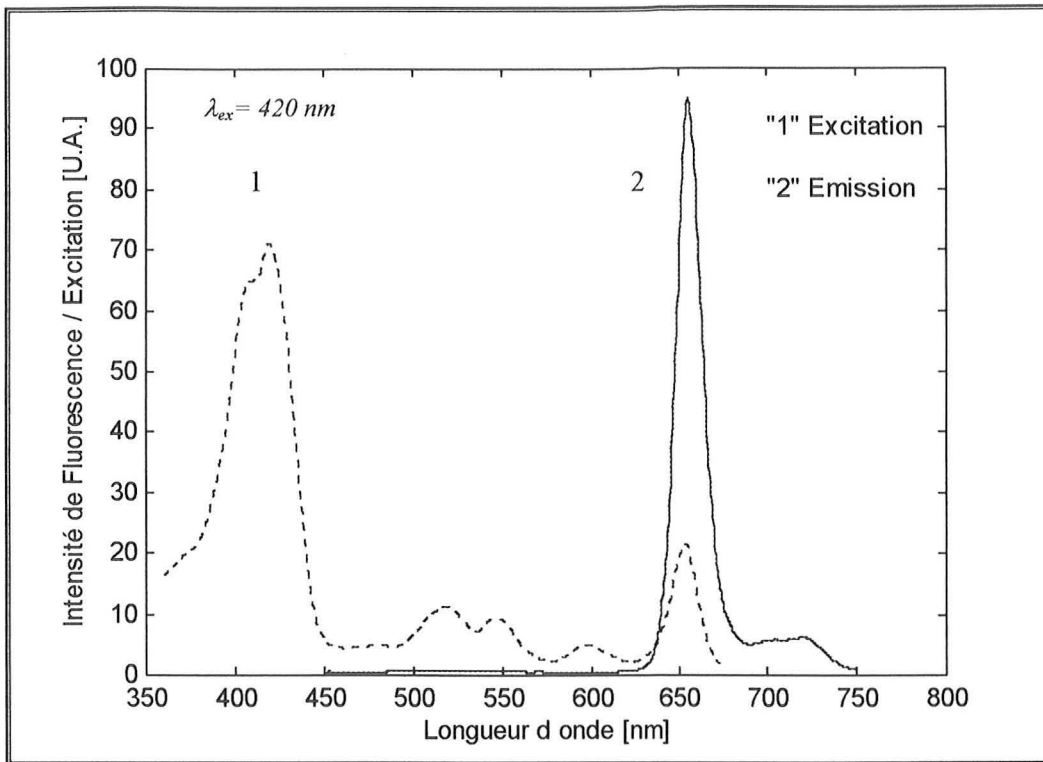


Figure 11 : Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de la mTHPC (3 µg/ml en PBS+2% SVF).

IV.3.2. Propriétés pharmacocinétiques

L'étude pharmacocinétique permet de déterminer la concentration relative du photosensibilisant dans la tumeur. Il existe un intervalle de temps optimal après administration où le ratio est le plus élevé [Brault 1995]. Ce paramètre joue un rôle très important dans l'optimisation de l'efficacité de la thérapie photodynamique et l'amélioration de son index thérapeutique. Puisque les photosensibilisants sont fluorescents, il est possible de suivre leurs progressions dans les tissus cancéreux, et les tissus sains et de déterminer leur biodistribution en temps réel.

IV.3.2.1. Biodistribution du photosensibilisant

Les tumeurs présentent des différences structurales et métaboliques notables par rapport aux tissus sains. Si nous analysons le cas particulier de l'HpD, les études *in vitro* n'ont révélées aucune différence de rétention entre les cellules tumorales et les cellules saines [Andersson-Engels 1992]. Ainsi, le principal mécanisme de rétention de l'HpD, et d'autres photosensibilisants d'ailleurs, peut être lié à la structure ou à la physiologie des tumeurs. Les

différents points de vue admettent que le photosensibilisant injecté par voie générale pénètre dans toutes les cellules de l'organisme. Cependant, la modification de la perméabilité cellulaire et de la vascularisation ainsi que le faible drainage lymphatique des tumeurs, favorisent la rétention des molécules photosensibles [Girardeau-Montaut 1986, Brault 1995].

Les photosensibilisants ont la propriété de s'éliminer en quelques heures de la plupart des tissus, mais sont retenus préférentiellement dans les tumeurs cancéreuses et dans certains organes (le foie, la rate et les reins) ainsi que dans la peau pendant plusieurs jours [Ankerst 1984, Michael 1988, Henderson 1992]. La rétention varie beaucoup en fonction du type et du stade des tumeurs. Elle varie également au sein d'une même tumeur. C'est pour cette raison qu'on détecte généralement la fluorescence sur au moins trois points différents de la tumeur. Les études effectuées, par fluorescence induite, sur des lésions à différents stades (dysplasie, carcinome invasif, microinvasif, *in situ*, ...) ont montré qu'il y avait une proportionnalité entre le stade de la tumeur et l'intensité de fluorescence détectée et donc la quantité de molécules photosensibles qu'elle fixe [Konig 1993].

IV.3.2.2. Sélectivité

La sélectivité d'un photosensibilisant est, par définition, le gradient de concentration entre les tissus cancéreux et les tissus sains. En terme de fluorescence, la sélectivité s'exprime par le ratio de l'intensité de fluorescence induite dans la tumeur par rapport à l'intensité de fluorescence induite dans le tissu sain environnant. On considère que la sélectivité du photosensibilisant définie ci-dessus est représentative de sa concentration intratumorale.

Néanmoins, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration du photosensibilisant mais également à la quantité de la lumière absorbée par ses molécules. L'hétérogénéité structurale et optique des tissus biologiques implique une pénétration variable du rayonnement lumineux, d'un tissu à l'autre, voir au sein d'un même tissu. Ainsi, la sélectivité déterminée à partir de l'intensité relative de fluorescence n'est pas tout à fait rigoureuse, car les conditions de mesures sur les tissus sains et les tumeurs ne sont pas les mêmes. Par conséquent, certains auteurs différencient la sélectivité de fluorescence du photosensibilisant et le gradient de concentration du photosensibilisant [Braichotte 1992].

En plus, Braichotte *et al.* ont montré que la sélectivité en terme de fluorescence variait en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Deux longueurs d'onde d'excitations (426 et 599 nm) ont été utilisées pour étudier la sélectivité de la mTHPC sur des biopsies prélevées sur 4 patients ayant différentes lésions malignes de l'œsophage et des bronches. La sélectivité tumorale de la mTHPC mesuré chez un patient à la longueur d'onde d'excitation 599 nm est apparue légèrement meilleure qu'à 426 nm. Par contre, pour les trois autres patients, la sélectivité à la longueur d'onde d'excitation 426 nm était meilleure qu'à 599 nm [Braichotte 1992]. Les variations reflètent certainement l'hétérogénéité des tissus en termes de propriétés optiques.

IV.4. LA DOSIMETRIE EN PDT

La dosimétrie de la thérapie photodynamique (PDT) doit permettre d'optimiser l'index thérapeutique : efficacité thérapeutique sur la zone pathologique sans lésion des tissus sains voisins. Cette prédiction est d'autant plus utile qu'il n'existe pas de photosensibilisant spécifique et que les paramètres d'intérêt varient au cours du traitement.

La réalisation idéale de cette dosimétrie exige des modèles théoriques et expérimentaux permettant d'estimer la quantité de photosensibilisant disponible, le coefficient d'atténuation globale de la lumière (Σ_{eff}), la pression partielle de l'oxygène (P_{O_2}), le pH et la température dans les tissus [Guillemin 1995]. Cependant, il n'y a pour le moment aucune définition générale commune de la dose en PDT. En principe, il serait possible d'éviter toute dosimétrie lumineuse s'il était possible de mesurer directement *in vivo* la production d'oxygène singulet durant l'irradiation ; jusqu'à présent cette hypothèse n'a pas été prouvée [Abdul-Nour 1994].

La quantité du photosensibilisant est un facteur déterminant pour obtenir la destruction tumorale mais aussi pour préserver les tissus sains voisins et minimiser les effets secondaires (photosensibilisation cutanée). Il s'agit d'optimiser la dose de photosensibilisant nécessaire afin d'obtenir un effet thérapeutique le plus efficace, c'est à dire au moment où le gradient de concentration entre les tissus malades et les tissus sains est le plus élevé. Une telle procédure nécessite l'estimation de la concentration du photosensibilisant dans la tumeur. En

tenant compte de l'effet de photoblanchiment et des propriétés optiques des tissus, la spectroscopie de la fluorescence induite permet la quantification *in vivo* et en temps réel du photosensibilisant [Andersson-Engels 1992, Panjehpour 1992]. La démarche conventionnelle consiste à lier par des courbes étalons l'intensité de fluorescence dans les tissus à l'intensité de fluorescence dans des milieux simulant les propriétés optiques et le microenvironnement physico-chimique du tissu dans lequel des quantités connues du fluorophore sont ajoutées. La quantification par cette méthode reste approximative. La courbe étalon établie par l'extraction chimique du photosensibilisant par chromatographie en phase liquide haute performance "HPLC" sur des échantillons tissulaires est une autre alternative de quantification [Panjehpour 1993]. La spectrophotométrie de réflectance diffuse peut être une méthode plus adaptée pour la quantification du photosensibilisant. On peut tracer la réflectance dans le rouge où l'absorption du photosensibilisant est dominante mais où l'absorption tissulaire est beaucoup plus faible [Wilson 1986].

La posologie clinique en fonction du photosensibilisant employé a été empiriquement déterminée à partir d'études chez l'animal, puis d'étude de phase I et II chez l'homme. Elle est de 2-5 mg/Kg du poids corporel pour l'HpD et le Photofrin [Wilson 1986]. Pour la mTHPC, elle est de l'ordre de 0,1 - 0,5 mg/Kg du poids corporel [Ma 1994, Forrer 1995].

Le rôle de la dosimétrie photonique consiste à optimiser l'énergie lumineuse délivrée à la zone malade pour être à la fois précise, suffisante et adaptée à la quantité du photosensibilisant participant à la réaction photochimique, afin d'obtenir un effet thérapeutique maximal vis à vis des cellules cancéreuses. Ainsi, lors du traitement, il est primordial d'estimer la dose de lumière effectivement absorbée par le photosensibilisant dans la géométrie de distribution du flux lumineux pour s'assurer que l'ensemble des tissus malades a reçu la dose de lumière, estimée nécessaire et suffisante pour obtenir l'effet photobiologique recherché.

La dose de la lumière absorbée dans les tissus ciblés dépend essentiellement de 4 facteurs :

- la concentration du photosensibilisant ;
- les paramètres optiques des tissus (diffusion, absorption et anisotropie) ;
- la géométrie d'irradiation (fibre nue, diffuseur cylindrique, diffuseur sphérique ...) ;
- l'environnement physico-chimique du photosensibilisant.

A ce jour, différentes équipes ont travaillé sur des modèles théoriques de propagation de la lumière dans ces milieux biologiques. D'importantes quantités d'informations concernant les propriétés optiques des tissus ont été publiées. Des instruments de mesure des propriétés optiques ont été développés selon l'emplacement de la zone tumorale à irradier à partir du signal lumineux rétrodiffusé en continu durant l'irradiation lumineuse [Abdul-Nour 1994].

La dose effective absorbée par l'unité de masse du tissu, selon Profio et Doiron 1987, est définie par :

$$D = (a/\rho).C.\Phi.K.t \quad [J/kg]$$

Où :

a [$m^{-1}(\mu g/g)^{-1}$] : absorbance du photosensibilisant à la longueur d'onde d'irradiation ;

ρ [$Kg m^{-3}$] : densité du tissu ($1030 kgm^{-3}$) ;

C [$\mu g/g$] : concentration du photosensibilisant dans le tissu ;

Φ [W/m^2] : densité du flux lumineux.(irradiance) ;

K : efficacité photodynamique relative (le rendement quantique de l'oxygène singulet dans des conditions cliniques en mol par photon absorbé / le rendement quantique de l'oxygène singulet dans des conditions de référence "oxygénation complète des tissus") ;

t [s]: durée d'irradiation.

Cette expression approximative tient compte de la majorité des paramètres physiques qui peuvent intervenir dans la réalisation d'un traitement photodynamique. D'autres formules qui ressemblent à celle-ci ont été proposées par différents auteurs [Jacques 1992]. Cependant, les doses d'énergie, qui dépendent de la localisation tumorale et du volume des lésions, sont déterminées empiriquement. Les doses communément employées en clinique avec le Photofrin comme photosensibilisant, pour une longueur d'onde d'excitation de 630 nm, sont

de 25 à 300 J/cm² pour le traitement superficiel et de 200 à 400 J/cm pour les applications interstitielles [Fisher 1995]. Pour la mTHPC, les doses d'énergie utilisées en clinique pour l'irradiation des cancers bronchiques ou de l'œsophage, avec un laser argon (514 nm) dont la profondeur de pénétration est de 1 mm, sont comprises entre 70 et 150 J/cm² [Forrer 1995]. Ce choix de faible profondeur de pénétration permet d'éviter une perforation des tissus traités. A 652 nm, la dose d'énergie est de 7 - 10J/cm².

CONCLUSION

Les techniques conventionnelles de diagnostic sont, d'une façon générale, très performantes pour déceler des anomalies cancéreuses. Cependant, leur résolution est loin d'être optimale, elle atteint rarement l'ordre du millimètre. Ainsi, les cancers en phase précoce et notamment au stade du carcinome *in situ* ne peuvent pas être détectés facilement. De plus, ces techniques sont parfois lourdes et très onéreuses. Leur mise en œuvre comme procédés de dépistage en est limitée de ce fait.

Grâce aux nouvelles technologies des détecteurs matriciels obturables, la soustraction de l'autofluorescence coexistant avec la fluorescence induite est devenue réalisable en temps réel au moyen d'un filtrage temporel. Mais, la photodétection par fluorescence induite souffre encore des problèmes liés à la sélectivité des photosensibilisants employés comme marqueurs tumoraux. Bien que certains auteurs rapportent des ratios de sélectivité supérieurs à 10, les nouveaux photosensibilisants comme la mTHPC ou la PpIX-ALA n'ont pas montré une sélectivité meilleure que celle de l'hématoporphyrine et ses dérivés. Ainsi, de nombreux faux positifs (tissu sain déclaré tumoral) et faux négatifs (tissu cancéreux déclaré normal) grèvent l'efficacité de cette méthode.

La photodétection par autofluorescence serait plus intéressante que la photodétection par fluorescence induite. Sans injection de fluorophore exogène, le contraste observé entre les tissus pathologiques et les tissus sains semble meilleur que celui mesuré en fluorescence induite. Néanmoins, la normalisation et la définition des critères de distinction ne sont pas encore optimales. Le choix de la longueur d'onde d'excitation optimale aboutira sans doute à une meilleure définition de ces critères. Nous pensons que la meilleure approche de distinction entre les tissus sains et les tissus pathologiques serait celle qui tiendrait compte de l'origine biochimique de l'autofluorescence, donc des différents chromophores tissulaires qui modulent le signal.

La mTHPC ayant une bonne efficacité thérapeutique, notamment pour les cancers bronchiques, mérite une étude approfondie de sa pharmacocinétique afin de définir la dose administrée et de déterminer le meilleur intervalle de temps entre l'administration et le traitement photodynamique. La variabilité de sa rétention d'une localisation anatomique à

l'autre et d'un individu à l'autre nécessite l'étude de la pharmacocinétique sur plusieurs modèles tumoraux. Il serait possible de définir une pharmacocinétique propre à chacun de ces modèles. Une telle étude permettrait d'estimer la concentration intratumorale en photosensibilisants, et par conséquent d'ajuster les paramètres du traitement afin d'améliorer l'index thérapeutique de la PDT.

L'élément le plus important dans l'élaboration des procédés du photodiagnostic et de la pharmacocinétique demeure l'instrumentation, aussi bien pour l'excitation que pour la détection. La conception d'une instrumentation fiable doit permettre d'augmenter la sensibilité de la détection de la fluorescence et de minimiser le phénomène de photoblanchiment. De plus, la correction de la distorsion des spectres de l'autofluorescence doit être réalisée au niveau des détecteurs et au niveau de la géométrie d'excitation et de détection.

DEUXIEME PARTIE

***OPTIQUE ET INSTRUMENTATION
ASSOCIEES A LA PHOTODETECTION***

INTRODUCTION

Les caractéristiques précises des signaux biomédicaux comme l'amplitude ou le spectre sont très délicates à déterminer, car sujettes à de très larges variations d'un individu à un autre. De plus, leur forme dépend énormément de la méthode d'acquisition. Cependant, pour un signal donné, on peut optimiser les conditions de mesure. Ceci nécessite un choix de matériel adapté aux propriétés physiques du signal à mesurer et à son environnement.

Le signal de fluorescence détecté dans un tissu biologique dépend des propriétés optiques de celui-ci. La distribution de la lumière d'excitation dans les tissus est régie par les coefficients d'absorption et de diffusion. L'amplitude du signal de fluorescence est directement liée à l'énergie absorbée par les fluorophores. En retour, il y a aussi une perturbation du signal de fluorescence émis ; une partie de la fluorescence sera absorbée par les chromophores tissulaires, une autre partie sera diffusée.

La capacité d'analyse d'une chaîne d'acquisition spectroscopique destinée à la mesure de la fluorescence dépend en premier lieu des caractéristiques spectrales des éléments qui la composent. La longueur d'onde, la largeur de la bande spectrale et la stabilité des sources d'excitation sont des paramètres qui agissent directement sur le signal de fluorescence. Les éléments passifs (fibres optiques, réseaux de diffraction, ...) qui guident et dispersent le signal de fluorescence ainsi que les éléments actifs (photomultiplicateur, CCD, PDA, ...) qui transforment la grandeur physique mesurée en un signal électrique doivent répondre à certains critères assurant la reproductibilité des mesures.

L'analyse des différents paramètres physiques et instrumentaux qui agissent sur le signal de fluorescence fait l'objet de cette deuxième partie.

I. SCHEMA DE PRINCIPE

Le schéma de principe que nous présentons ici englobe les différents éléments optiques et optoélectroniques les plus fréquemment utilisés dans les systèmes spectroscopiques. La photodétection par spectroscopie de fluorescence consiste à guider la lumière d'excitation au moyen d'une ou plusieurs fibres optiques jusqu'au tissu à examiner et à guider une partie de la lumière de fluorescence au moyen d'une deuxième fibre ou d'un faisceau de fibres optiques vers un spectrographe. C'est le montage le plus simple et le plus robuste.

Dans d'autres montages, une seule fibre optique sert à la fois pour l'excitation et l'acquisition de fluorescence. Dans ce cas, un système optique composé de miroirs dichroïques et d'objectifs assure la séparation entre la lumière d'excitation et la lumière de fluorescence ainsi que le couplage entre les différentes fibres optiques (Figure 12).

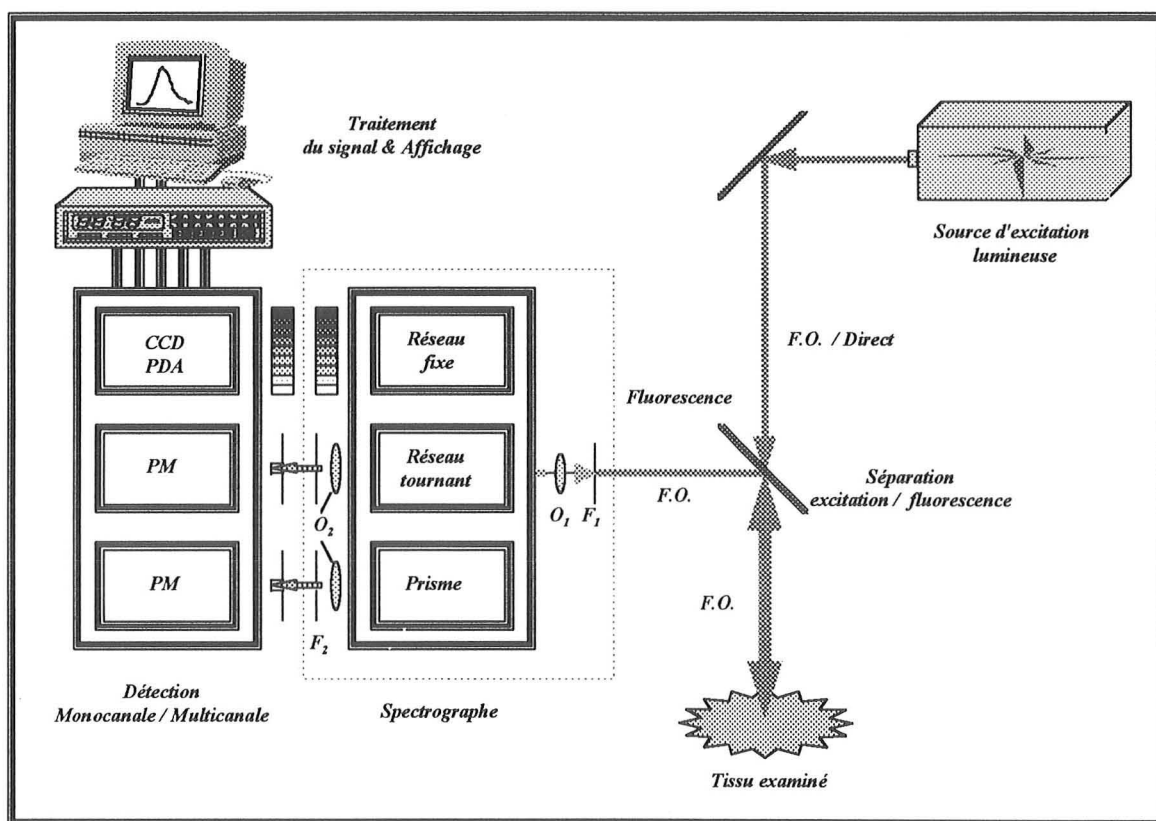


Figure 12 : Principe de la photodétection par spectroscopie

On désigne sous le nom de spectrographe l'instrument optique équipé d'un système dispersif destiné à séparer les radiations de la lumière. Cet instrument est un spectromètre lorsque sa fente de sortie est couplée à un détecteur photoélectrique pour mesurer l'intensité spectrale des raies.

Dans un spectrographe, après élimination de la lumière d'excitation, la fluorescence traverse un collimateur formé d'une fente d'entrée F_1 et d'un objectif O_1 . Le faisceau de lumière parallèle est ensuite dispersé au moyen d'un prisme ou d'un réseau. Puis, les raies de fluorescence sont focalisées par un objectif O_2 et projetées sur le plan focal. Une fente de sortie F_2 très étroite sélectionne les radiations monochromatiques à la sortie du spectrographe. En faisant tourner légèrement le système dispersif autour d'un axe de symétrie perpendiculaire à l'axe d'incidence, on fait défiler tout le spectre lumineux sur la fente de sortie F_2 . Un détecteur optoélectronique (photomultiplicateur, PM) placé derrière cette fente recueille les raies de fluorescence et les convertit en un signal électrique. Ce signal analogique est converti en signal numérique et traité par ordinateur. Le positionnement du système dispersif étant calibré en longueur d'onde, l'intensité lumineuse des raies tracée en fonction de ce positionnement constitue la totalité du spectre de fluorescence.

Dans le cas où le système dispersif est un réseau concave et le détecteur optoélectronique une barrette de photodiode (PDA) ou une batterie de détecteurs à transferts de charges (CCD), la fente de sortie du spectrographe correspond à la taille active du détecteur multicanal. Le spectre entier est projeté sur un plan focal qui constitue la CCD ou la PDA. La bande passante du spectrographe sera définie en fonction de la dimension de la fente d'entrée et la taille du pixel de la CCD ou de la PDA. Ce type de système spectroscopique est actuellement le plus employé dans l'analyse de la fluorescence tissulaire car la mesure de la totalité du spectre est réalisée simultanément. Il est connu sous le nom d'analyseur optique multicanal (*Optical Multichannel Analyser*, OMA).

II. SOURCES DE LUMIERE

La lumière présente à la fois un aspect ondulatoire et un aspect corpusculaire. L'aspect ondulatoire de la lumière apparaît lors de l'émission d'ondes électromagnétiques durant les transitions électroniques entre niveaux d'énergie des atomes excités. L'aspect de la lumière devient corpusculaire lors de son interaction avec la matière quand la lumière apparaît comme constituée de particules (photons) dont chacun est le support d'une énergie élémentaire déterminée par la fréquence du rayonnement. Ainsi, dans son aspect global, la lumière est considérée comme une forme d'énergie composée de photons auxquels on associe une onde électromagnétique. Elle est donc caractérisée par son spectre et son énergie.

Les sources qui produisent de l'énergie lumineuse et qui sont utilisées en photodiagnostic peuvent être divisées en deux groupes : sources de lumières dites "blanches" dont le spectre est continu avec une répartition variable d'énergie en fonction de la longueur d'onde et sources monochromatiques qui sont à la fois intenses et cohérentes que sont les lasers et les diodes lasers. Nous proposons ici de donner un aperçu sur le principe et les caractéristiques des différents types de sources.

II.1. LES LAMPES

Le soleil émet une lumière dite "blanche" et dont le spectre continu possède un maximum pour la radiation de couleur jaune-verte (550 nm). Suivant le type de lampe, la répartition en intensité rayonnée peut varier avec des maxima pour des longueurs d'onde différentes.

Les lampes à arc au xénon produisent de grandes densités lumineuses dans le visible et l'infrarouge. Leur étendue spectrale proche ultraviolet - visible est plutôt homogène. La version pulsée (flash) des lampes xénon est relativement plus riche en UV et en visible (180-780 nm) que les sources en mode continu. La durée de l'impulsion des sources flash est généralement de l'ordre de quelques microsecondes à une nanoseconde à une fréquence pouvant atteindre 100kHz. Ce type de lampes associé à des filtres interférentiels peut être utilisé en spectroscopie à filtrage temporel.

Les lampes à arc à vapeur de mercure offrent un spectre de raies assez riche permettant un choix de pic entre 200 et 2500 nm. Ces lampes peuvent produire des faisceaux lumineux intenses et collimatés grâce à la petite taille et la forte luminance de l'arc de radiance pour les raies situées à : 253, 302, 312, 365, 405, 435, 546 et 577 nm. Dans les applications spectroscopiques en photodiagnostic, le choix d'une longueur d'onde d'excitation "est limité" à ces raies. Ces lampes sont également utilisées pour l'étalonnage spectral des systèmes spectroscopiques.

Les lampes à incandescence au tungstène ou Quartz-tungstène-halogène présentent un maximum de densité spectrale dans le rouge. Elles sont d'un emploi très courant pour l'éclairage. Leur version calibrée de faible puissance est souvent employée pour l'étalonnage des intensités spectrales.

Le tableau 4 donne quelques exemples des lampes qui peuvent être employées en spectroscopie. Le choix du type de lampe, le mieux adapté au domaine d'application, dépend en premier lieu de leurs critères spectraux et de leurs puissances.

Tableau 4 : Caractéristiques des lampes employées en spectroscopie

<i>Type de lampes</i>	<i>Bande spectrale [nm]</i>	<i>Raies</i>	<i>Puissance [Watt]</i>	<i>Caractéristiques de l'Irradiance</i>
Deutérium	180-400 nm	-	30	Riche en UV < 250 nm
Mercure	200-2500	UV-Visible 253,7-302,2-312,6 365-404,7 - 435,8 - 546,1 - 577	50-1000	Maximum aux pics du mercure
Xénon	200-2500	IR	75-1000	Riche en UV, Visible et IR
Mercure-xénon	200-2500	UV-Visible -IR	200-1000	Riche en UV
Quartz-tungstène-halogène	240-2700	Visible	10-1000	Riche en visible

II.2. LES LASERS

Le laser est une source de rayonnement monochromatique, cohérente dans le temps et l'espace, et à grande densité d'énergie. Ses caractéristique énergétique et spectrale produisant différentes interactions avec les tissus biologiques (thermique, photochimique, électromécanique et photoablatif) font que les lasers trouvent des applications multiples en médecine [Guillemin 1996].

II.2.1. Principe de l'émission laser

La production d'un faisceau laser qui repose sur le principe de l'émission stimulée nécessite la combinaison de trois éléments essentiels : un milieu actif (ensemble d'atomes ou de molécules excités), une boucle de réaction ou résonateur et une excitation externe appelée pompage (Figure 13).

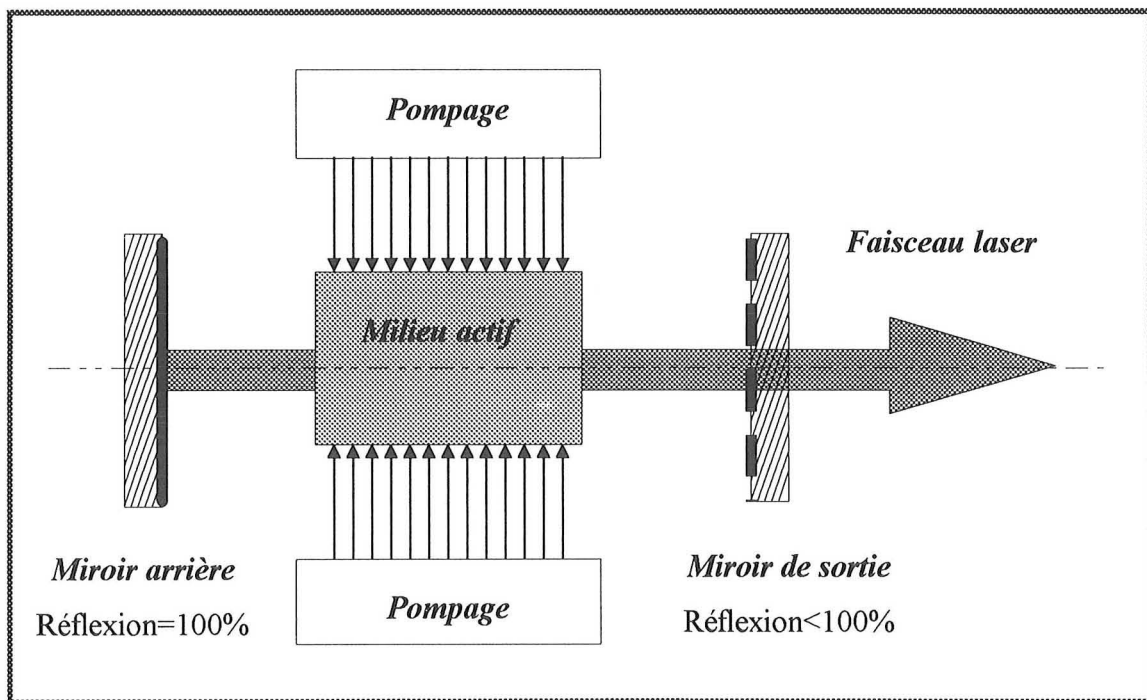


Figure 13 : Principe de fonctionnement du laser

Dans un milieu actif, la désexcitation radiative spontanée d'un atome favorise la désexcitation d'un autre atome voisin. De cette deuxième désexcitation est produit un photon dont l'onde associée est de même longueur d'onde et de même phase que celle du

photon incident. On dit alors que l'émission de ce second photon est *stimulée* par le photon incident. En effet, l'émission de la lumière dans le milieu actif est attribuée à la transition des atomes d'un niveau d'énergie E_2 vers un niveau de plus faible énergie E_1 ; la différence $E_2 - E_1$ détermine la longueur d'onde théorique de l'émission radiative, λ :

$$h\nu = E_2 - E_1 ; \lambda = h / (E_2 - E_1)$$

Pour produire un faisceau laser, il faut placer le milieu actif dans un résonateur qui est, en fait, une cavité optique dans laquelle l'onde lumineuse se réfléchit et s'amplifie. L'exemple le plus simple des cavités optiques est le résonateur de Fabry-Pérot qui est constitué de deux miroirs dont l'un est semi-transparent. Les miroirs utilisés peuvent être plans ou sphériques. Dans tous les cas, la longueur de la cavité est ajustée de manière à préserver les propriétés de phase des ondes qui se réfléchissent à l'intérieur du résonateur (obtention d'une onde stationnaire).

Pour obtenir une amplification de lumière, il faut que le nombre de photons émis soit en permanence supérieur au nombre de photons absorbés dans le milieu, ce qui implique une forte population électronique dans les niveaux de haute énergie. Ce phénomène d'inversion de la population active s'effectue par une excitation extérieure ou pompage du milieu résonnant (milieu actif dans une cavité résonante). Parmi les différentes techniques de pompage utilisé nous citons : le pompage par lumière incohérente (lampe flash ou lampe à arc), le pompage par décharge électrique et le pompage par lumière cohérente (un laser pompe le milieu actif d'un autre laser).

II.2.2. Caractéristiques du rayonnement laser

II.2.2.1. Monochromaticité

Seule une longueur d'onde donnée est amplifiée de telle sorte que la radiation soit représentée par une raie très étroite. En réalité, le spectre d'émission de la lumière ne correspond pas à une raie de fréquence précise, mais à une bande centrée autour de cette fréquence. Ce spectre possède l'allure d'une courbe gaussienne (lasers à gaz) ou lorentzienne (lasers à solides) dont la largeur de la bande spectrale est déterminée à mi-hauteur. D'autre

part, la cavité ne laisse osciller qu'un certain nombre de fréquences ($\nu_q = qc/2\lambda$ avec q entier) appelées modes longitudinaux. Ainsi, le faisceau laser émis possède un spectre distribué tout au long du profil de la gaussienne déterminé par la longueur de la cavité..

II.2.2.2. Cohérence du faisceau

La cohérence du laser se caractérise essentiellement par l'égalité de phases entre les ondes associées aux photons émis. En fait, la bande spectrale du faisceau étant très étroite, les longueurs d'onde des diverses composantes spectrales sont très voisines (cohérence temporelle). Si on se place à une faible distance de la sortie du générateur laser, ces ondes sembleront bien en phase (cohérence spatiale). Par contre, à mesure que l'on s'en éloigne, le décalage spatial dû à la différence de longueur d'onde s'observe mieux.

II.2.2.3. Puissance du faisceau

La puissance de sortie P du faisceau laser est l'un des paramètres les plus significatifs. Elle dépend :

- du milieu actif ;
- de la méthode de pompage ;
- de la quantité d'énergie fournie au milieu actif ;
- de la qualité de la cavité résonante.

Le rendement d'un laser à gaz est très faible, de l'ordre 10^{-5} à 10^{-3} . Mais, le faisceau laser étant très directionnel, toute sa puissance en sortie est concentrée sur une petite surface, ce qui lui confère une densité surfacique de puissance très élevée. Dans certains lasers pulsés, du fait de la courte durée de l'impulsion, la puissance du pic (crête) peut atteindre l'ordre d'une dizaine de gigawatt (10^{10} W). Après focalisation, la densité de puissance d'une impulsion atteint l'ordre de 10^{13} /cm² [Antonetti 1995].

II.2.3. Classification des lasers

L'effet laser peut être produit au sein d'une très grande variété de matériaux actifs qu'ils soient solides (rubis, YAG-Nd, ...), gazeux (CO₂, Argon, HeNe, ...), liquides (colorant organique, ...) ou semi-conducteurs (AsGa, ...). Ainsi, les différents types de lasers peuvent être différenciés selon leur mode de pompage, selon l'état physique du milieu actif amplificateur ou selon leur mode de fonctionnement.

Selon le mode de fonctionnement, on peut classer les lasers en 4 catégories :

- Lasers en mode continu (cw) dont la source d'excitation (pompage) fonctionne en continu.
- Lasers pulsés en mode relaxés dont le pompage se fait par des décharges électriques ou par lampe flash. La durée de l'émission produite est d'une milliseconde à quelques centaines de microsecondes. Dans le cas idéal, elle est équivalente à la durée de l'impulsion du pompage.
- Les lasers pulsés en mode déclenchés ou Q-switched. Dans ce mode de fonctionnement l'effet laser ne se produit que lorsque le pompage par une lampe flash dépasse un certain seuil. Pendant ce temps, un obturateur optique (électromécanique ou électro-optique) empêche le démarrage de l'émission stimulée par la suppression des photons initiateurs. A la fin de l'impulsion de pompage, cet obturateur est très rapidement ouvert libérant ainsi l'énergie en un temps très court. Les impulsions de ces lasers sont plus intenses et plus brèves que les lasers relaxés. Leur durée est équivalente à la durée de vie de l'état excité (5 - 20 ns).
- Les lasers pulsés à modes bloqués. Dans les premiers lasers de ce type, la génération des impulsions très courtes (de picoseconde à quelques dizaines de femtoseconde) était produite dans un milieu actif à jet de colorant organique (rhodamine 6G). Les molécules organiques présentent des niveaux d'énergie vibrationnelle très nombreux. En réalisant un pompage par un laser argon (par exemple), on peut faire osciller dans la cavité un très grand nombre de modes. La mise en phase de ces modes se fait par l'utilisation d'un autre

jet de colorant "absorbant saturable", de sorte que les modes s'additionnent de façon cohérente et forment une impulsion ultrabrève. En fait, cet absorbant bloque l'émission laser en compensant l'amplification de la cavité. Ainsi, les modes qui se trouvent en même phase s'additionnent jusqu'à ce que leur amplitude puisse partiellement saturer l'absorbant. Cette bande de saturation dans le milieu favorise la croissance des autres modes en phase avec eux. Chacun des modes bloqués contribue à augmenter l'amplitude du pic circulant dans la cavité. Du fait de la saturation de l'absorbant, de la saturation du gain dans le milieu amplificateur et des pertes sur les miroirs, deux impulsions peuvent se propager en sens inverse dans la cavité. La durée de ces deux impulsions qui se croisent dans l'absorbant saturable devient de plus en plus courte avec des intensités plus élevées ce qui engendre des effets non linéaires dans les jets de colorant, comme l'automodulation de phase. La conséquence de ces effets est la création de nouvelles fréquences qui se rejoignent constamment grâce à un système de prisme qui rend la dispersion globale de la cavité légèrement négative [Antonetti 1995]. Actuellement, on utilise également des milieux actifs solides (par exemple : Titane-Saphir) qui permettent d'obtenir des impulsions pico ou femtosecondes sur un domaine spectrale accordable.

En médecine, on a tendance à classer les lasers suivant leur longueur d'onde car c'est le paramètre le plus significatif vis à vis du spectre d'absorption des tissus [Guillemin 1996]. Le tableau 5 donne quelques exemples des lasers employés en médecine.

Tableau 5 : Exemples de lasers médicaux

<i>Type du laser</i>	<i>Longueur d'onde [nm]</i>	<i>mode [cw/Pulsé]</i>
ArF	193	pulsé (15-20 ns)
KrF	248	pulsé (15-20 ns)
XeCl*	308	pulsé (15-20 ns)
Azote (N ₂)*	337	pulsé (1 ns)
Krypton (Kr+)*	407-413	cw
HeCd*	325-442	cw
Argon (Ar+)*	488-514	cw
Nd-YAG doublé (KTP)	532	cw/pulsé

Type du laser	Longueur d'onde [nm]	mode [cw/Pulsé]
HeNe	632,8	cw
Colorant	visible-proche IR	cw/pulsé
	504-592	(1,2-2,5 μ s)
	577	(0,3-1 ms)
	630	cw
Alexandrite	720-755-800	pulsé
Rubis	694	pulsé (30 ns)
Nd-YAG	1064-1320-1444	cw/pulsé
Ho-YAG	2100	pulsé
Er-YAG	2940	pulsé
Co2	10600	cw/ultrapulsé

* : Lasers pouvant être employés en diagnostic

II.3. LES DIODES LASERS

Les diodes lasers sont composées de semi-conducteurs, dans la jonction **p-n** desquels on crée un milieu amplificateur avec sa cavité résonnante et dont l'inversion de population est réalisée lors du passage du courant électrique.

II.3.1. Principe de fonctionnement des diodes lasers

Une diode laser se comporte comme une diode électroluminescente (LED) ordinaire tant qu'un certain seuil du courant conduisant à l'inversion de population n'est pas atteint (Figure 14). Au-delà de ce seuil, on a une émission de longueur d'onde correspondant à la différence d'énergie entre la bande de valence (**trous**) est la bande de conduction du semi-conducteur (**électrons libres**), (Figure 15). En effet, quand on met en contact un semi-conducteur de type **n** et un semi-conducteur de type **p**, les niveaux d'énergie se déplacent à travers la jonction jusqu'à ce que le niveau d'énergie des électrons répartis dans la bande de conduction atteigne un niveau théorique appelé Fermi E_f . Si on polarise cette jonction en appliquant un courant électrique extérieur, une inversion de population très localisée peut être produite. Les électrons en excès du côté **n** cherchent à occuper les emplacements des

trous du côté p. Ces transitions peuvent être accompagnées par l'émission de photons qui entraînent des transitions induites ou stimulées : c'est l'effet laser.

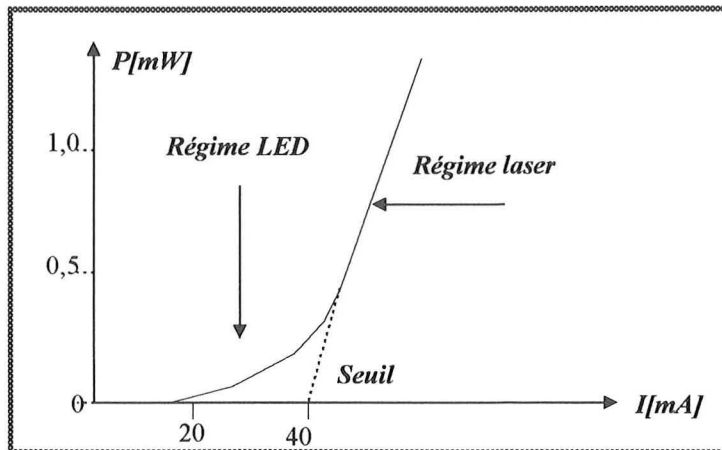


Figure 14 : Puissance émise par une diode laser en fonction du courant

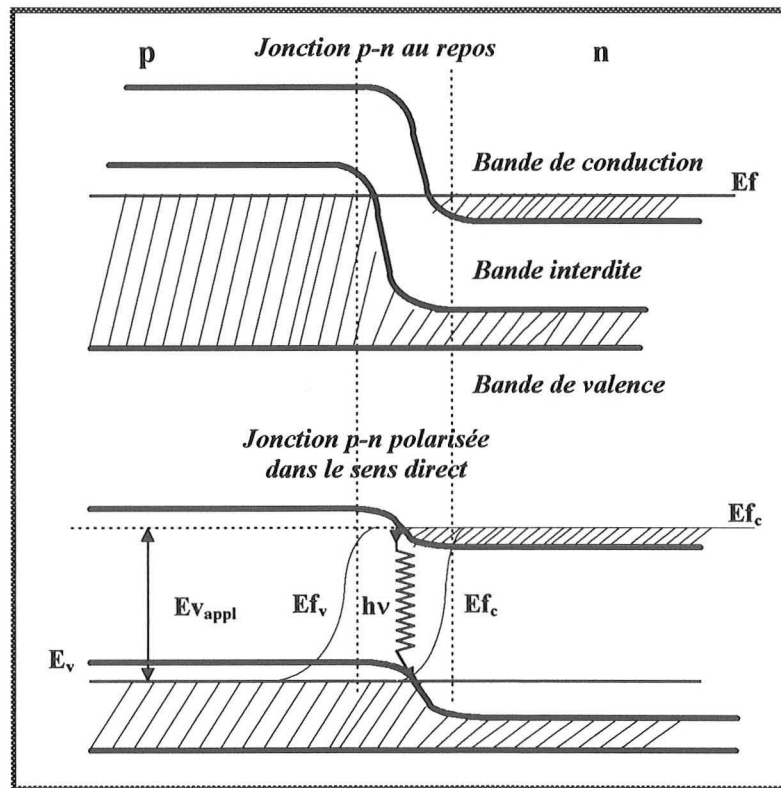


Figure 15 : Schéma des niveaux d'énergie dans une diode semi-conductrice

Dans les diodes laser, le milieu actif est une zone de confinement des porteurs et/ou des photons qui est assimilable à un parallélépipède implanté dans le semi-conducteur (Figure 16). La longueur de la zone est d'environ 100 à 500 μm , son épaisseur est de l'ordre de 0,5

à 1 μm . La cavité Fabry-Pérot est réalisée par le clivage des extrémités du semi-conducteur ou par l'apposition des couches réfléchissantes sur ses faces externes [Girardeau-Montaut 1987, Ungar 1989, Antonetti 1995]. Du fait de la faible dimension de la jonction, une partie du mode laser se propage par onde évanescente des deux parts de la jonction dans le semi-conducteur. Contrairement au laser classique, la divergence du faisceau est importante.

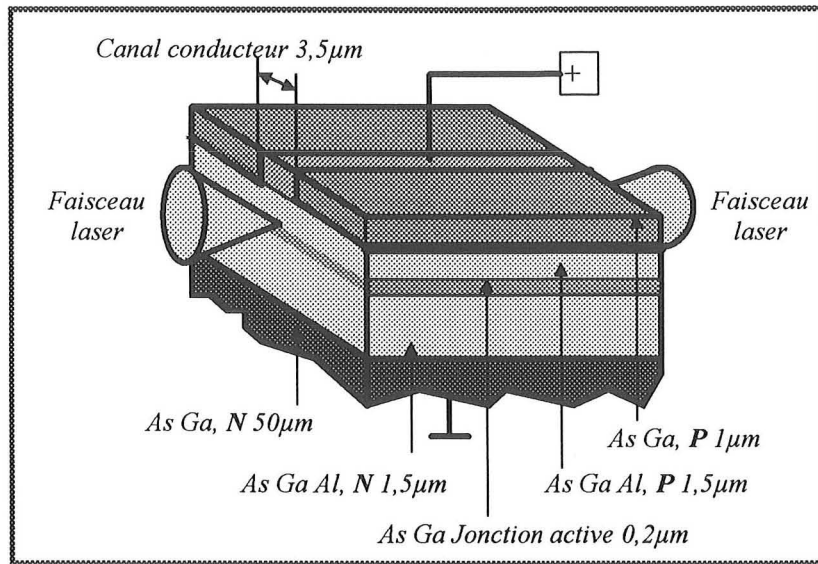


Figure 16 : Structure spatiale d'une diode laser à hétérojonction à haut rendement à la température ambiante

II.3.2. Courant de seuil

Le courant de seuil I_s est généralement de l'ordre de 30 à 100 mA, à 25°C, mais il augmente en fonction de la température selon une loi exponentielle, tel que :

$$I_s = I_0 \cdot \exp(T/T_0)$$

où T_0 est la température ambiante et I_0 est le courant à cette température.

Le courant de seuil dépend également de la géométrie de la cavité (jonction) et de ses propriétés physiques comme : sa longueur, son épaisseur active, son coefficient de réflexion, son facteur de confinement, qui caractérise le mode dont les photons générés se propagent dans la cavité, et son rendement quantique [Ungar 1989].

II.3.3. Structure des diodes lasers

On distingue deux types de structure de diodes lasers (Figure 17) :

- homostructure qui est uniquement constituée d'une jonction **p-n** avec un confinement de photons, et dont la cavité active est de même type **p** mais dopée de sorte que son profil d'indice assure le confinement des photons et par conséquent guide l'onde laser.
- hétérostructure à double jonction (deux corps différents) dans laquelle la zone active est composée d'une zone centrale entourée d'une zone de confinement de porteurs **p** puis d'une zone de confinement optique. Avec cette configuration, l'inversion de la population peut être réalisée avec un seuil de courant inférieur à celui des homostructures

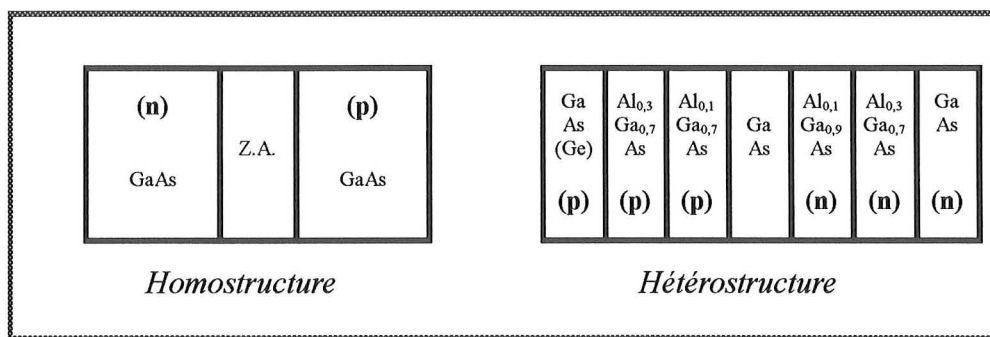


Figure 17 : Exemple de structure des diodes lasers : homostructure et hétérostructure

Le principe des diodes hétérostructure consiste à doper les zones adjacentes de la jonction en lui ajoutant des atomes dont le nombre d'électrons est différent (aluminium dans le cas de l'arséniure de gallium AsGa). Ce dopage augmente localement l'écart en énergie entre la bande de valence et la bande de conduction par déplacement du niveau d'énergie de Fermi. Il permet également d'obtenir une propagation sans atténuation du mode laser. Cet écart d'énergie n'est pas assuré dans les diodes de type homostructure où une partie des photons émis est localement absorbée.

Le placement des électrodes en forme de peigne dans ce type de diode permet de faire fonctionner une jonction de grande surface sous forme de plusieurs micro-lasers indépendants : c'est la technique de barrette de diode multicanale (Diode Array). Cette technique permet d'obtenir une puissance de l'ordre de quelques Watts avec un rendement de 30%.

L'avantage des diodes lasers réside dans leur compacité et leur rendement élevé par rapport aux lasers traditionnels. Cependant, les systèmes à diode laser sont encore très coûteux. Les longueurs d'onde générées par les diodes lasers sont actuellement limitées aux longueurs d'onde allant du rouge au proche infrarouge.

Tableau 6 : Bandes d'émission des lasers à semi-conducteur

<i>Matériau du milieu actif</i>	<i>Longueur d'onde d'émission [nm]</i>
Ga Al As	770-900
Ga As	904
In Ga As	1060
Ga In As P	1330 - 1500
Ga As _{1-x} P _x	650 - 840
Ga In _{1-x} As _x	840 - 3300

Les nouvelles diodes lasers émettant à des longueurs d'onde intéressantes pour la thérapie photodynamique (635, 650, et 670 nm) sont actuellement d'une utilisation courante en clinique. Les diodes lasers (1060 nm) doublées ou triplées en fréquence peuvent potentiellement être employées en photodiagnostic.

III. OPTIQUE DES TISSUS

La propagation des rayonnements lumineux dans les tissus biologiques est régie par des phénomènes observables comme l'absorption et la diffusion. Ces phénomènes présentent des coefficients variables selon la longueur d'onde et selon le type du tissu et sa teneur en chromophores (eau, mélanine, hémoglobine, ...).

Dans ce chapitre, nous présentons les différents paramètres optiques des tissus et nous analysons leur influence sur l'intensité et les caractéristiques spectrales de la fluorescence tissulaire. Nous présentons également les deux principaux modèles théoriques qui permettent la détermination de ces paramètres.

III.1. DIFFUSION ET ABSORPTION DE LA LUMIERE.

Dans un milieu quelconque, et d'après les lois de la mécanique quantique, on considère les probabilités d'absorption et de diffusion du photon sur un libre parcours moyen. Le libre parcours moyen **MFP** (Mean Free Path) est la distance moyenne que parcourt un photon avant de subir un choc dans la matière au sein de laquelle il se propage (Figure 18) .

A l'issue d'un **MFP**, chaque photon possède une probabilité **P_a** d'être absorbé par collision inélastique avec une molécule. S'il n'est pas absorbé, il poursuit son parcours par collision élastique de façon aléatoire, c'est à dire, qu'il diffuse selon un angle θ , et avec une probabilité **$P(\theta)$** (Figure 19). Cette probabilité **$P(\theta)$** représente la fonction angulaire de phase [Diebold 1990]. Les paramètres **P_a** et **$P(\theta)$** sont caractéristiques de la matière traversée et dépendent de la longueur d'onde utilisée. Si la longueur d'onde est très supérieure à la dimension des particules diffusantes, la diffusion est dite Rayleigh. Dans le cas inverse ou dans le cas où la dimension des particules diffusantes est du même ordre que la longueur d'onde, la diffusion est dite diffusion de Mie. Dans les tissus biologiques, la taille moyenne des diffuseurs est d'environ un micron, ce qui est l'ordre des longueurs d'onde utilisée dans le diagnostic par fluorescence. La diffusion dans les tissus biologiques est donc une diffusion de Mie [Ettori 1996].

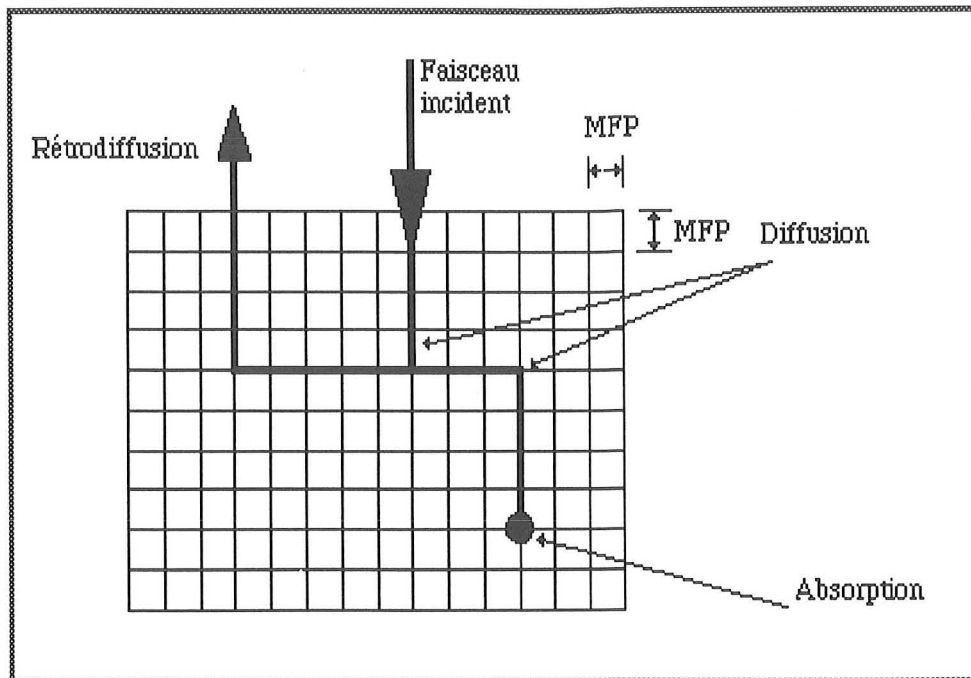


Figure 18 : Modélisation plane des phénomènes de diffusion et d'absorption.

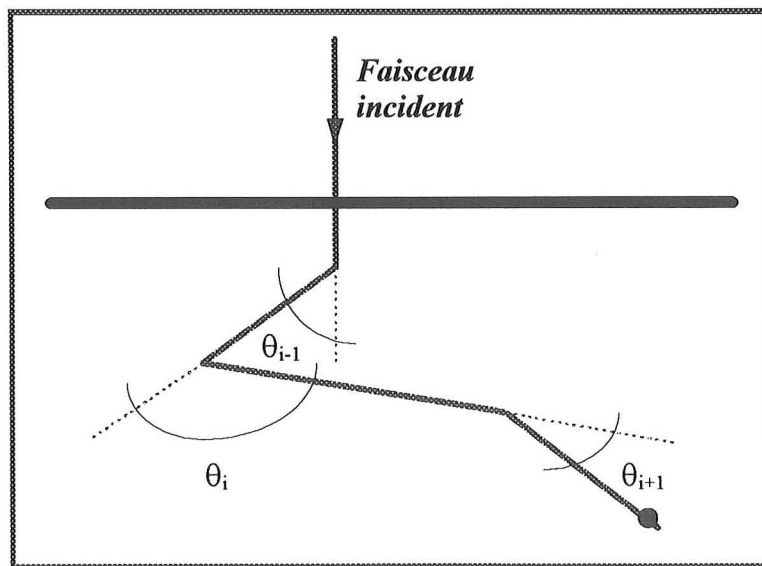


Figure 19 : Evolution statistique des photons

La fonction angulaire de phase représente la loi de probabilité de diffusion. Autrement dit, elle reflète la quantité du flux lumineux présent en un point écarté d'un angle θ par rapport à l'axe du faisceau incident. Cette répartition du flux lumineux en fonction l'angle de diffusion prend généralement l'allure d'une courbe gaussienne dont le centre correspond à l'angle $\theta=0^\circ$. Le cosinus moyen de l'angle de diffusion noté $\mu=\langle\cos(\theta)\rangle$, à mi-hauteur de la

gaussienne, constitue un paramètre microscopique qui caractérise la diffusivité du milieu. Il peut être exprimé par :

$$\mu = \frac{\int_{-\pi}^{\pi} P(\theta) \cos\theta \sin\theta d\theta}{\int_{-\pi}^{\pi} P(\theta) \sin\theta d\theta}$$

avec $-1 \leq \mu \leq 1$:

$\mu = -1$: rétrodiffusion élevée ;

$\mu = 0$: diffusion isotrope ;

$\mu = 1$: diffusion importante dans le sens d'incidence de la lumière (vers l'avant).

La composition chimique et la structure hétérogène des tissus font que le rayon laser ne se propage pas en ligne droite, comme dans l'air. On observe ainsi de nombreux phénomènes de diffusion qui entraînent des changements fréquents de direction. Le cosinus moyen de diffusion dans les tissus vivants est compris entre 0,7 et 0,99 et souvent proche de 0,97.

III.2. PARAMETRES OPTIQUES DES TISSUS

Nous donnons ici une définition des différents paramètres optiques qui caractérisent et qui décrivent l'évolution de la lumière dans les tissus. Ces paramètres peuvent être divisés en deux catégories : paramètres microscopiques et paramètres macroscopiques [Wilson 1987].

A. Paramètres microscopiques

Ce type de paramètres se divise en paramètres fondamentaux et paramètres composés ou dépendants.

a. Paramètres microscopiques fondamentaux :

Σ_a [mm^{-1}] : le coefficient d'absorption qui caractérise la proportion de lumière absorbée par unité de longueur ;

Σ_s [mm^{-1}] : le coefficient de diffusion qui caractérise la proportion de lumière diffusée par unité de longueur ;

$P(\theta)$: la fonction angulaire de phase normée à 1 qui décrit la probabilité de diffusion dans une direction écartée d'un angle θ par rapport à l'axe initial de propagation de la lumière.

b. Propriétés microscopiques composées :

$\Sigma_t = \Sigma_a + \Sigma_s$ [mm^{-1}] : le coefficient d'atténuation totale ;

μ : coefficient d'anisotropie (le cosinus moyen de l'angle de diffusion) ;

MFP [mm] = $1/\Sigma_t$: le libre parcours moyen entre deux absorptions ou deux diffusions photoniques ;

$\Sigma'_s = \Sigma_s(1-\mu)$: le coefficient de diffusion réduit ;

$c = \frac{s}{s+k} \equiv \frac{\Sigma_s}{\Sigma_t}$: l'albédo qui décrit la fraction d'énergie ayant interagi avec le diffuseur et qui

est diffusée dans le milieu ; s et k sont respectivement les coefficients de diffusion et d'absorption de Kubelka-Munk.

B. Paramètres macroscopiques :

Σ_{eff} [mm^{-1}] : le coefficient d'atténuation effective ;

$\delta_{\text{eff}} = 1/\Sigma_{\text{eff}}$ [mm] : la profondeur de pénétration effective qui représente la profondeur à laquelle la lumière transmise est réduite à 37% de sa valeur initiale ;

R_e : la Réflectance diffuse ;

T_d : la Transmittance diffuse.

III.3. MODELES THEORIQUES DE PROPAGATION DE LA LUMIERE DANS LES TISSUS VIVANTS

Tous les modèles théoriques qui peuvent être utilisés pour déterminer la distribution de la lumière dans les tissus requièrent la connaissance des paramètres optiques (coefficients d'absorption, de diffusion et d'anisotropie). Ces derniers sont considérés comme des données initiales pour chaque calcul concernant la pénétration et la distribution de la lumière dans les tissus.

De nombreux modèles théoriques et expérimentaux ont été développés pour la détermination des paramètres optiques des tissus [Wilson 1986, Flock 1989, Cui 1992, Royston 1996]. Nous présentons ici le modèle de Kubelka-Munk et la loi de Beer-Lambert.

III.3.1. Modèle à deux flux - modèle de Kubelka et Munk

Le modèle à 2-flux est parmi les premiers modèles développés pour étudier la propagation de la lumière dans des milieux fortement diffusants. C'est une solution approximative de l'équation de transport de Boltzmann.

Ce modèle consiste à considérer une couche du milieu tissulaire infiniment étendue, d'épaisseur X_{max} homogène, dont une face est illuminée par une source parfaitement diffuse. On définit l'intensité de lumière i qui se propage vers la face non-illuminée de l'échantillon et l'intensité de lumière j qui se propage dans le milieu vers la source (Figure 20).

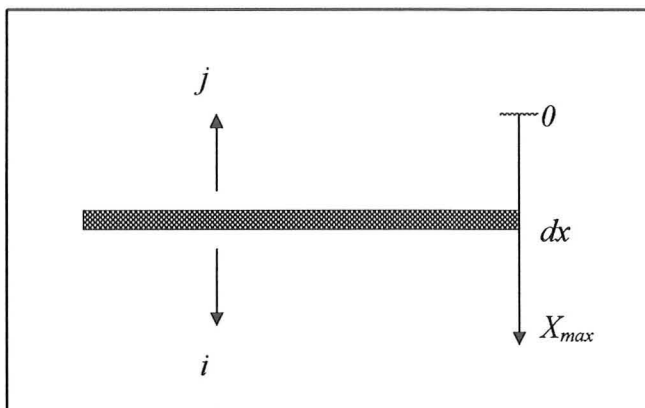


Figure 20 : Propagation de la lumière dans un échantillon tissulaire suivant le modèle de Kubelka et Munk.

A travers une lamelle d'épaisseur dx , les variations de i et j sont données par les équations de Kubelka-Munk [Kubelka 1948, 1954]

$$- di = - (S+K).i. dx + S.j. dx$$

$$dj = - (S+K).j. dx + S.i. dx$$

Où S et K sont respectivement les coefficients de diffusion et d'absorption de Kubelka-Munk.

Un calcul à partir des équations de Kubelka-Munk permet d'exprimer les valeurs des coefficients d'absorption et de diffusion en fonction de la transmittance diffuse T_d , de la réflectance R_e et de l'épaisseur de l'échantillon X_{max} [Maarek 1984].

$$S = \text{Arg Sh} \left(\frac{b \cdot R_e}{T_d} \right) / b \cdot X_{max}$$

$$K = S \cdot (a-1)$$

où :

$$a = (1 + R_e^2 + T_d^2) / 2R_e$$

$$b = (a-1)^{1/2}$$

L'exploitation de cette méthode requiert la possibilité de pouvoir mesurer la réflectance et la transmittance d'un échantillon soumis à un éclairage parfaitement diffus et de disposer de tissus homogènes. Ceci nécessite la réalisation de mesures en deux étapes : détermination de la réflectance sur fond noir et à l'infini.

Les mesures de la transmittance diffuse totale T_d et de la réflectance R_e peuvent être réalisées à l'aide d'un dispositif utilisant une sphère d'intégration optique.

III.3.2. La loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert énonce que l'intensité d'un rayonnement lumineux collimaté I_0 décroît exponentiellement en fonction de la distance parcourue x , telle que :

$$I(x) = I_0 \exp(-\Sigma_a x)$$

où Σ_a est le coefficient d'absorption du milieu traversé.

La loi de Beer-Lambert suppose que le milieu traversé est homogène et contient des molécules identiques. De plus, ce milieu doit être absorbant et non diffusant, ce qui implique que les photons se propagent en ligne droite. Dans cette configuration, les photons traversant le milieu entrent en collision avec les molécules. Si le faisceau lumineux transporte des photons dont la longueur d'onde se trouve à l'intérieur du spectre d'absorption des molécules, un certain nombre de photons du faisceau sera absorbé par les molécules. L'effet macroscopique de cette absorption sera une diminution de l'intensité du faisceau.

Si la loi de Beer-Lambert est applicable dans la quasi-totalité des domaines de la physique ondulatoire, elle ne donne qu'une approximation du phénomène d'atténuation dans les milieux présentant des diffusions multiples comme le cas des tissus vivants. On peut déterminer approximativement un coefficient d'atténuation totale Σ_t qui constitue la somme du coefficient d'absorption et du coefficient de diffusion. On peut également définir un coefficient d'atténuation effective Σ_{eff} pour lequel 73% de la lumière initiale est absorbée.

$$P(x) = P_0 \exp(-\Sigma_t x)$$

$$\Sigma_t = \Sigma_a + \Sigma_s$$

Cependant, pour déterminer les coefficients Σ_a et Σ_s séparément, il est nécessaire de trouver une méthode pour mesurer l'un de ces deux coefficients. Théoriquement, la mesure du coefficient de diffusion Σ_s est possible, en mesurant la fonction angulaire de phase $P(\theta)$. La

détermination de $P(\theta)$ passe ainsi par la mesure du flux lumineux diffusé pour chaque angle θ situé entre l'axe du faisceau incident et l'axe de diffusion. L'intégration des flux diffusés sur tous les angles solides peut aboutir au calcul du coefficient de diffusion [A'Amar 1993].

D'autre part, la mesure du coefficient d'absorption peut être réalisée en utilisant une sphère d'intégration optique et des échantillons tissulaires d'épaisseur inférieure au libre parcours moyen. Pour cette épaisseur optique mince, la diffusion multiple des photons dans les échantillons peut être négligée et l'atténuation de la lumière peut être attribuée à l'absorption [A'Amar 1993].

Une autre approche de la loi de Beer-Lambert consiste à mesurer un coefficient d'atténuation K_d caractéristique aux milieux très diffusants, tel que [Grossweiner 1990] :

$$K_d = \sqrt{3K[K+S(1-\mu)]}$$

où K , S et μ sont respectivement le coefficient d'absorption, le coefficient de diffusion et le cosinus moyen de diffusion. Pour Wilson *et al.*, le coefficient d'absorption K dérivé du modèle de 2-flux est égal au double du coefficient microscopique standard d'absorption Σ_a ($K=2\Sigma_a$) [Wilson 1987]. Cependant, Reichman *et al.* ont incorporé le coefficient Σ_a dans une version du modèle de 2-flux [Reichman 1973]. Cui *et al.* ont repris l'expression du coefficient d'atténuation K_d mais on utilisant les coefficients standards, tel que [Cui 1992] :

$$K = \sqrt{3\Sigma_a[\Sigma_a+\Sigma_s(1-\mu)]}$$

On définit également un coefficient d'atténuation effective de la lumière pour des longueurs d'onde allant de 600 à 1300 nm très diffusées dans les tissus vivants :

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a[\mu_a+\mu_s(1-g)]}$$

où μ_a , μ_s et g sont respectivement le coefficient d'absorption, le coefficient de diffusion et le cosinus moyen de diffusion [Wilson1990].

III.4. INFLUENCE DES PARAMETRES OPTIQUES SUR LE SIGNAL DE FLUORESCENCE

L'action simultanée de l'absorption et de la diffusion de la lumière dans les tissus est caractérisée par trois paramètres : le coefficient d'absorption (Σ_a), le coefficient de diffusion (Σ_s) et le cosinus moyen de diffusion (μ). Leur influence sur le signal de fluorescence est double. D'une part, ils régissent la distribution spatiale et la répartition de la lumière d'excitation dans le tissu, et par conséquent déterminent la proportion effectivement absorbée par les fluorophores. D'autre part, ils agissent sur la distribution spatiale et sur l'intensité de la lumière de fluorescence.

La détermination de ces paramètres optiques dépend essentiellement du modèle théorique employé et du protocole de mesure ; un large éventail de valeurs numériques peut être attribué au même type de tissu. Ces valeurs sont étroitement liées à leur métrologie. Pour cette raison, notre analyse ici sera basée sur l'absorbance des chromophores tissulaires tout en tenant compte de la diffusion due à l'hétérogénéité structurale des tissus.

L'influence des paramètres optiques des tissus sur le signal de fluorescence se produit en deux étapes :

- répartition de l'énergie de la lumière d'excitation entre les molécules fluorescentes et les chromophores tissulaires ;
- réabsorption de la fluorescence par les chromophores tissulaires

Soit un milieu homogène contenant n fluorophores caractérisés par leurs rendements quantiques de fluorescence Φ_F et par leurs absorbances A (Figure 21). La distribution spatiale de ces fluorophores dans le milieu est supposée uniforme. L'énergie d'excitation lumineuse à une longueur d'onde donnée λ_{ex} , est donc répartie aux fluorophores en fonction de leurs absorbances.

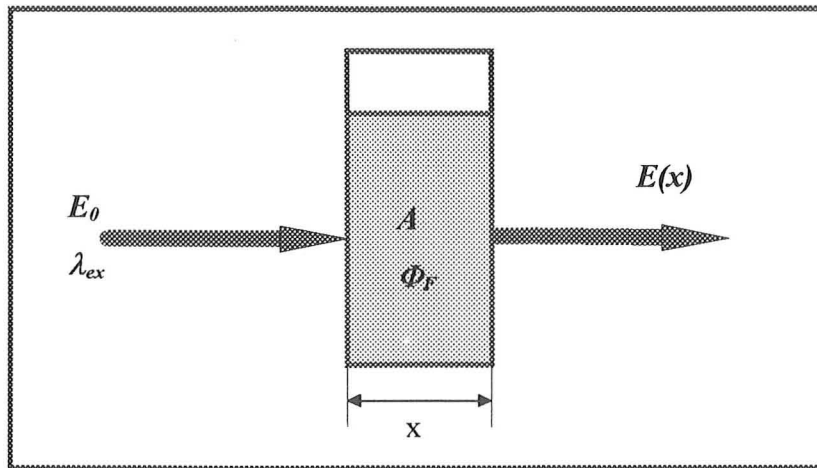


Figure 21 : Absorption de la lumière dans un milieu homogène

La probabilité pour qu'un photon soit absorbé dans ce milieu d'épaisseur x est [Wagnières 1992] :

$$P_a = 1 - \exp(-\Sigma_a x)$$

Selon la définition de l'absorbance on peut écrire :

$$A \equiv -\log_{10}(1 - P_a)$$

Ainsi :

$$\Sigma_a = (1/x) \cdot A \cdot \ln(10) \quad \dots (*)$$

D'autre part, comme l'absorbance en fonction de la concentration c [M/L] et le coefficient d'extinction molaire ϵ [$M^{-1} \cdot L \cdot cm^{-1}$] du fluorophore est donnée par :

$$A = \epsilon \cdot c \cdot x \quad \dots (**)$$

En combinant les équations (*) et (**), on peut écrire :

$$\Sigma_a = \ln(10) \cdot \epsilon \cdot c = 2,3 \epsilon \cdot c$$

Ainsi, pour un milieu contenant n fluorophores :

$$\Sigma_{a(n)} = 2,3 \sum_n \epsilon_n \cdot c_n$$

Selon la loi de Beer-Lambert, l'énergie qui traverse ce milieu d'épaisseur x est :

$$E(x) = E_0 \exp(-\sum_{a(n)} x)$$

En négligeant la réabsorption par les fluorophores eux-mêmes, la fluorescence échappée de ce milieu non diffusant, où les seuls absorbants sont les fluorophores, peut être donnée par :

$$F_{esc} = \sum_n \Phi_{f(n)} * E_{abs(n)}$$

$$E_{abs(n)} = E_0 - E(x)$$

On obtient donc :

$$F_{esc} = E_0 \sum_n \Phi_{f(n)} \cdot [1 - \exp(-\sum_{a(n)} \cdot x)]$$

où F_{esc} représente l'intégrale de l'énergie des photons émis quel que soit leur longueur d'onde (l'aire du spectre de fluorescence normalisée), $\Phi_{f(n)}$ est le rendement quantique de fluorescence, $E_{abs(n)}$ est l'énergie lumineuse absorbée et l'indice n désigne les fluorophores excités.

Dans le cas où les fluorophores se trouvent dans un milieu tissulaire, les coefficients d'absorption et de diffusion de ce milieu perturbent la propagation de la lumière d'excitation et de la lumière de fluorescence. Par conséquent, il se produit un changement dans la répartition de l'énergie absorbée et dans la directivité de la fluorescence émise.

Les chromophores tissulaires qui absorbent dans le proche ultraviolet et le proche infrarouge sont essentiellement l'oxyhémoglobine et la mélanine. L'oxyhémoglobine possède une bande d'absorption maximale centrée autour de 415 nm et deux bandes secondaires centrées autour de 540 et 580 nm (Figure 22). La mélanine, localisée dans l'épiderme, est caractérisée par une absorption importante dans l'ultraviolet et décroît progressivement d'une façon monotone jusqu'au proche infrarouge ($\approx 300 - 1100$ nm).

Ainsi, si la longueur d'onde d'excitation coïncide avec les bandes d'absorption des chromophores tissulaires, l'énergie lumineuse incidente E_0 sera absorbée par les fluorophores et par les chromophores. Les longueurs d'onde d'excitation employées dans la mesure de la fluorescence tissulaire se situent souvent entre le proche ultraviolet et le violet où la diffusion est relativement faible par rapport à l'absorption. Le chromophore le plus absorbant dans cette bande spectrale est l'oxyhémoglobine. Pour simplifier l'analyse, nous considérons que l'absorption est due à ce chromophore. Ainsi, si la distribution spatiale des fluorophores dans les tissus est uniforme et si la quantité $\epsilon.c$ de l'oxyhémoglobine est supérieure à celle des fluorophores, l'énergie disponible pour exciter ceux-ci diminue du fait de l'absorption par l'oxyhémoglobine. Il en résulte que l'atténuation globale de la lumière $\Sigma_t = \Sigma_s + \Sigma_a$, devient plus importante, mais il n'en est pas de même pour l'intensité de fluorescence. Dans cette dernière expression, le coefficient Σ_a caractérise l'absorption due aux fluorophores et à l'oxyhémoglobine.

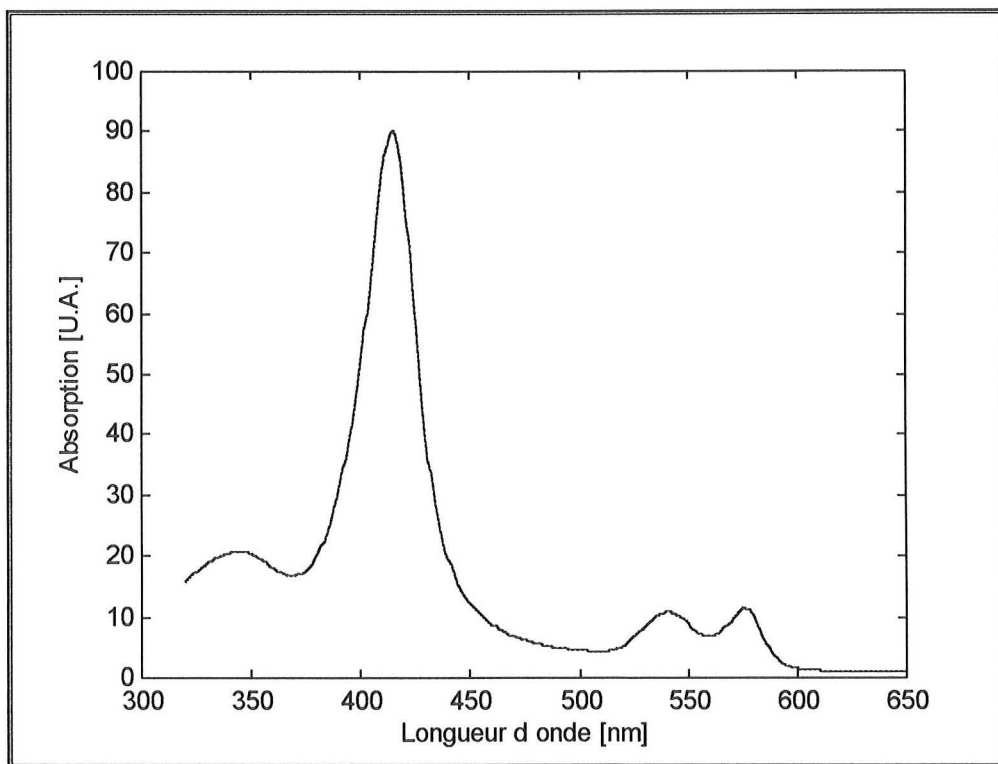


Figure 22 : Spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine

La diffusion de la lumière dans les tissus est le deuxième facteur influençant la distribution et l'atténuation de la lumière d'excitation. Dans le cas d'une diffusion isotrope ($\mu < 0,5$), la lumière sera répartie dans un volume tissulaire proche d'une sphère. Dans la région spectrale

allant du proche ultraviolet au proche infrarouge (300 - 900 nm), la capacité de pénétration de la lumière est variable. Elle est approximativement proportionnelle à la longueur d'onde et est particulièrement élevée dans la région spectrale comprise entre le rouge et le proche infrarouge (600 - 850 nm). C'est pourquoi la distribution sphérique de la lumière de fluorescence sera plus étendue que celle de la lumière d'excitation, car les longueurs d'onde de la fluorescence émise sont par nature plus longues que celles de la lumière d'excitation. Si la géométrie de détection est assez large pour détecter toute la fluorescence diffusée, la diffusion dans les tissus n'aura pas d'impact sur le signal de fluorescence. Dans le cas contraire, où la géométrie de détection est plus faible que le "diamètre" de diffusion, une moindre intensité de fluorescence sera observé.

Dans les tissus vivants, le cosinus moyen de diffusion est généralement compris entre 0,7 et 0,99, ce qui signifie que la distribution de la lumière est plutôt ovoïde. La figure 23 schématise le profil bidimensionnel de la distribution de la lumière dans les tissus établi à partir de la fonction de phase de Henyey-Greestein [Ettori 1996].

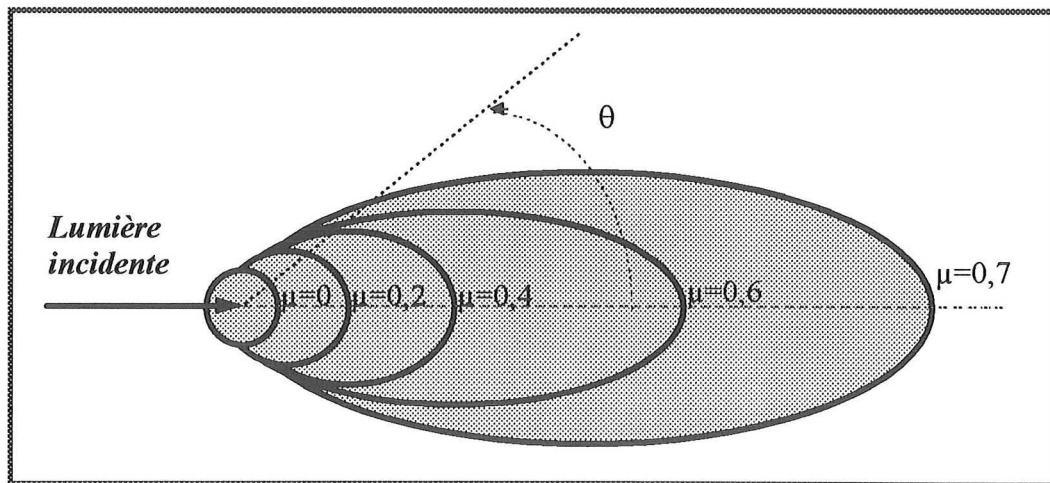


Figure 23 : Fonction angulaire de phase de Henyey-Greestein

En pratique, on excite le tissu et on récupère la fluorescence au moyen de fibre(s) optique(s) placée(s) en contact avec la surface tissulaire. Ainsi, la géométrie d'excitation et de détection est caractérisée par l'angle solide ou le cône d'acceptance de la fibre optique. Dans le cas où le cosinus moyen de diffusion dans le tissu est supérieur à 0,5 ($\mu > 0,5$), la diffusion sera dirigée vers l'avant. Par conséquent, la lumière d'excitation pénètre plus profondément dans le tissu.

La lumière de fluorescence étant considérée comme l'intégrale de sources de lumière ponctuelles isotropes [Keijzer 1989], la diffusion de la lumière de fluorescence se fait dans toutes les directions et dépend de l'incidence de la lumière d'excitation. La figure 24 schématise un tissu diffusant vers l'avant dans lequel une source ponctuelle de fluorescence est placée. Comme l'émission de fluorescence est conditionnée par l'absorption de photons, le profil de la distribution de la lumière d'excitation s'applique également à la lumière de fluorescence. L'intensité de fluorescence sera maximale dans l'axe d'incidence. Pour simplifier l'analyse, on pourrait supposer que la lumière de fluorescence se divise en deux parties : la première se dirige dans le sens d'incidence de la lumière d'excitation et la deuxième se dirige dans le sens inverse (vers le capteur). Ainsi, plus le tissu est diffusant vers l'avant, plus grande sera la proportion de la lumière de fluorescence dirigée vers la fibre optique. Nous pensons que la conséquence macroscopique de cette diffusion se traduit par une plus grande intensité de fluorescence recueillie par le capteur, comparée à un tissu où la diffusion est isotrope.

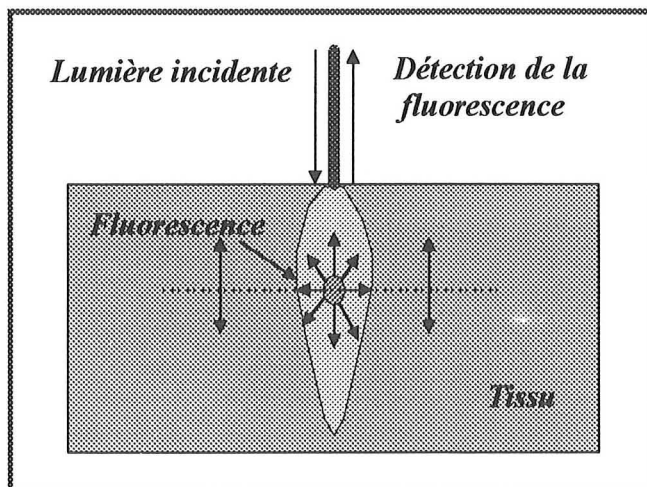


Figure 24 : Distribution de la lumière dans un tissu diffusant vers l'avant

La lumière d'excitation étant plus absorbée dans les couches proches de la surface, la fluorescence émise près de la surface ne subit pas de réabsorption majeure du fait de ses longueurs d'onde plus longues. Le libre parcours moyen de la lumière de fluorescence est plus grand que celui de la lumière d'excitation. Dans une zone située près de la surface tissulaire, la trajectoire parcourue par les photons d'excitation est l'équivalent d'une épaisseur optique relativement mince. Cette épaisseur devient semi-transparente pour les

photons de fluorescence émis dans la même localisation. Par contre, la fluorescence émise dans les couches plus profondes du tissu subit à la fois une diffusion multiple et une réabsorption. La réabsorption a pour effet de modifier l'allure du spectre de fluorescence en le modulant selon l'allure des spectres d'absorption des chromophores tissulaires. Vu les longueurs d'onde d'excitation et les longueurs d'onde de fluorescence, l'oxyhémoglobine joue le rôle prépondérant dans l'absorption de la lumière d'excitation et la réabsorption d'une proportion de la lumière de fluorescence.

Si la longueur d'onde d'excitation correspond à la bande d'absorption maximale de l'oxyhémoglobine ($\approx 370 - 450$ nm), la différence en intensité de fluorescence entre tissu vascularisé et tissu non vascularisé, contenant la même concentration de fluorophores, serait essentiellement due à la différence d'absorption de la lumière d'excitation. La réabsorption de la fluorescence devient moins importante du fait du décalage naturel du spectre d'émission. On observe son effet sur les spectres de fluorescence lorsque les tissus sont très vascularisés et/ou lorsque les longueurs d'onde d'excitation sont inférieures à 370 nm. C'est à dire quand une région du spectre de fluorescence coïncide avec la bande d'absorption maximale de l'oxyhémoglobine.

IV. FIBRES OPTIQUES

Les fibres optiques sont des guides, régis par la loi de Snell-Descartes, constitués d'un cœur dans lequel se propage la lumière en se réfléchissant sur la gaine optique d'indice de réfraction plus faible [Ungar 1989]. Elles possèdent une structure physique qui tend essentiellement à supprimer la divergence naturelle de la lumière de façon que l'affaiblissement de la puissance optique en fonction de la distance soit très faible. Leur utilisation est actuellement limitée à une région spectrale allant de 300 à 1800 nm. Par leurs faibles dimensions et leurs qualités de souplesse, la plupart des fibres optiques peuvent être intégrés dans des applications endoscopiques. Elles constituent des éléments intermédiaires entre la source et le site à illuminer, et inversement entre le site fluorescent et les détecteurs.

IV.1. PROPAGATION DE LA LUMIERE DANS UNE FIBRE OPTIQUE

La transmission guidée des rayons lumineux dans une fibre optique peut être réalisée à partir de deux phénomènes physiques distincts : la réflexion totale à l'interface de deux milieux diélectriques et l'effet de courbure de la trajectoire d'un rayon lumineux qui se propage en milieu inhomogène [Niay 1995].

IV.1.1. Réflexion totale

La réflexion totale est l'un des phénomènes les plus importants pour guider la lumière dans une fibre optique. Nous considérons deux milieux diélectriques transparents, séparés par un dioptre plan, d'extension infinie caractérisés par leurs indices n_1 et n_2 (Figure 25). Si le faisceau de lumière incident provient d'un milieu d'indice n_1 inférieur à n_2 ($n_1 < n_2$), une partie de l'énergie optique incidente se réfléchit alors que l'autre partie est transmise (réfraction). Par contre, si le faisceau de lumière incident provient d'un milieu d'indice n_1 supérieur à n_2 ($n_1 > n_2$), le faisceau subit une réflexion totale, à condition que l'angle d'incidence avec la normale θ_i soit supérieur à un angle critique θ_c [Halley 1985, Niay 1995].

L'angle critique d'incidence au-delà duquel la réflexion est totale s'écrit :

$$\theta_c = \arcsin \frac{n_2}{n_1}$$

Pour $\theta_i \geq \theta_c$, il y a réflexion totale. Sinon le faisceau subit une réflexion et une réfraction sur le dioptre comme dans le cas où l'indice $n_1 < n_2$.

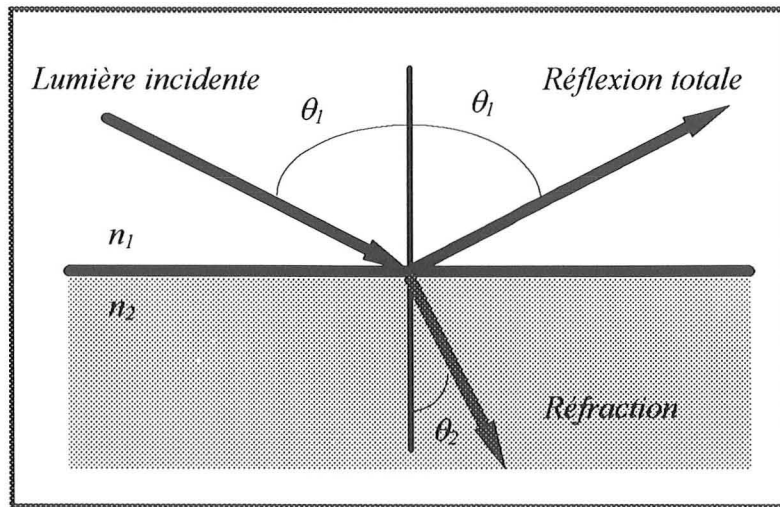


Figure 25 : Réflexion totale de la lumière sur un dioptre plan

IV.1.2. Propagation en milieu inhomogène

Dans un milieu inhomogène, le dispositif matériel destiné au guidage de la lumière, dans une direction donnée, doit présenter une variation de caractéristique physique en fonction d'une coordonnée transverse. Ainsi, l'indice de réfraction de la lumière dépend du point de l'espace considéré. Si le guidage optique utilise un cylindre de section circulaire, le guide sera composé d'un cœur diélectrique inhomogène entouré d'un milieu extérieur homogène. Tous les points de l'espace situés sur une même droite parallèle à l'axe de symétrie du cylindre présentent les mêmes caractéristiques physiques. Par contre, l'indice de réfraction du cœur de diamètre d_1 décroît graduellement, en fonction de la distance en direction du rayon r du cylindre, d'une valeur n_1 sur l'axe ($r=0$) à une valeur n_2 à l'interface cœur-gaine (Figure 26). La variation de l'indice de réfraction $n(r)$ ainsi que sa dérivée première doivent être lentes et continues pour qu'au voisinage d'un point quelconque dans le cœur, on puisse considérer le

milieu comme localement homogène et isotrope. Cette notion de continuité est d'importance primordiale pour assurer l'homogénéité du milieu sur une distance supérieure à la longueur d'onde de la lumière qui doit se propager dans le guide [Halley 1985].

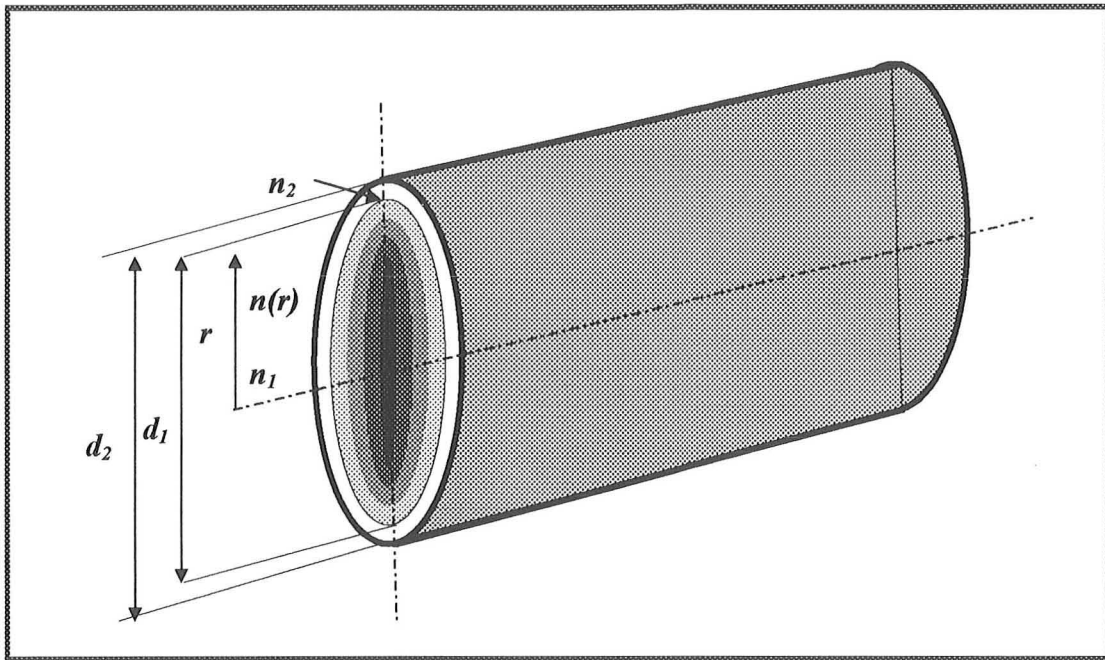


Figure 26 : Structure d'un guide optique de milieu inhomogène

Des approches analytiques et numériques permettent d'étudier la propagation de la lumière dans les milieux inhomogènes. Elles permettent l'analyse modale de la lumière (Maxwell) et la définition du couplage entre modes ainsi que le calcul de la dispersion intermodale (Wentzet-Kramers-Brillouin, "W.K.B.") [Halley 1985]. Au moyen de telles approches, on peut calculer la trajectoire des rayons lumineux qui traversent le guide, si les conditions initiales d'injection des rayons sont précises. En effet, les rayons ont tendance à s'incurver vers les points de haut indice, c'est à dire sur l'axe du symétrie du cylindre optique. C'est un effet de "mirage optique" qui assure la propagation de la lumière dans le guide de cœur inhomogène [Niay 1995].

IV.1.3. Types de fibres optiques

Selon les modes et les phénomènes de propagation, on définit trois types de fibres optiques.

IV.1.3.1. Fibre multimode à saut d'indice

C'est la plus courante des fibres optiques. Elle est composée d'un cœur cylindrique transparent de diamètre d_1 et d'indice constant n_1 , entouré d'une gaine homogène transparente d'indice $n_2 < n_1$ qui constitue une interface optique permettant la réflexion totale de la lumière [Girardeau-Montaut 1987]. L'ensemble cœur-gaine est protégé par un dépôt semi rigide externe (Figure 27).

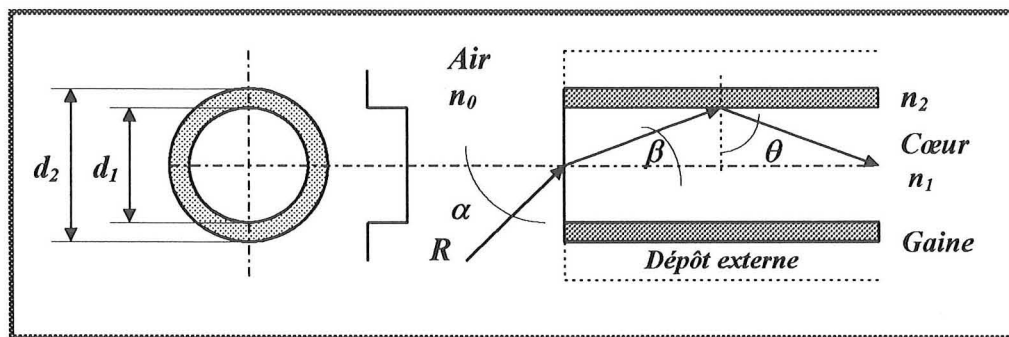


Figure 27 : Géométrie d'une fibre multimode à saut d'indice

Pour que les rayons incidents R soient réfléchis sur l'interface cœur-gaine de la fibre optique, en poursuivant leur propagation en ligne brisée, l'angle θ doit satisfaire à la condition de la réflexion interne totale, c'est à dire :

$$\theta \geq \theta_c = \arcsin \frac{n_2}{n_1}$$

La condition de guidage dans le cœur est donc :

$$\beta \leq \beta_c = \arccos \frac{n_2}{n_1}$$

Ainsi, on peut écrire :

$$n_1 \sin \theta_c = n_2$$

$$n_1 \cos \beta_c = n_2$$

D'autre part, dans le milieu extérieur d'indice n_0 l'angle d'incidence α doit être inférieur à un certain angle critique d'acceptance α_c . Selon la loi de Snell-Descarte :

$$n_0 \sin \alpha_c = n_1 \sin \beta_c = O.N.$$

On appelle le terme $n_1 \sin \beta_c$, qui est indépendant de n_0 , ouverture numérique (O.N.) [Halley 1985]. Elle est exprimée par :

$$O.N. = n_1 \sin \beta_c = \sqrt{n^2 - n_2^2}$$

L'ouverture numérique donnée ainsi est caractéristique à la fibre optique. Par contre, si on utilise le terme $n_0 \sin \alpha_c$, l'ouverture numérique va dépendre de l'indice du milieu extérieur [Ungar 1989, Niay 1995] :

$$O.N. = n_0 \sin \alpha_c = \frac{1}{n_0} \sqrt{n^2 - n_2^2}$$

Si le milieu extérieur est l'air, $n_0 = 1$, cette expression rejoint la première et on obtient la valeur maximale de l'ouverture numérique. En fait cette dernière expression de l'ouverture numérique caractérise l'angle maximum d'acceptance de la fibre optique, et par conséquent détermine l'angle d'injection que doit faire le faisceau pour assurer sa propagation dans la fibre. Elle décrit également le phénomène de dispersion du faisceau en sortie de fibre. Si l'ouverture numérique est d'une faible valeur (par exemple, $O.N. = 0.2$), la lumière en sortie de fibre optique serait peu divergente.

Toute lumière arrivant sur la face d'entrée de la fibre sous un angle $\alpha < \alpha_c$ se propage dans la fibre. Le cône de demi-angle au sommet est appelé cône d'admission ou cône d'acceptance (Figure 28). L'angle solide formé par le cône d'acceptance est donné par :

$$\Omega_{Acc} = 2\pi (1 - \cos \alpha_c)$$

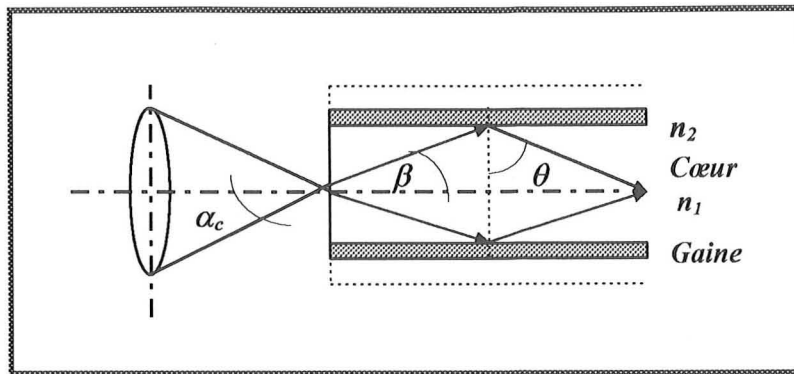


Figure 28 : Cône d'acceptance d'une fibre optique à saut d'indice

Pour caractériser le cône d'acceptance, on définit également un nombre d'ouverture $F/\#$ dérivé de l'angle d'acceptance ($\alpha_c, n_0=1$), tel que :

$$F/\# = 1/2 \sin \alpha_c = 1/2 O.N$$

Ce type de fibre possède une bande passante peu élevée, liée à l'O.N.. Plus celle-ci est grande, plus l'angle d'acceptance peut être grand et un plus grand nombre de modes peut être guidé.

IV.1.3.2. Fibre multimode à indice variable

Dans ce type de fibre, appelée aussi fibre à gradient d'indice, on observe un plus grand parcours des rayons les plus inclinés par rapport à l'axe, compensé par une vitesse ($v=c/n$) plus élevée à l'extérieur de la fibre qu'au centre (Figure 29). Comme le cœur de la fibre, de diamètre d_1 , constitue un milieu inhomogène, la propagation de la lumière est assurée par un effet de mirage optique. Le profil de variation de l'indice n en fonction du rayon $r < d_1$ au centre de la fibre peut être décrit par une loi de distribution de puissance telle que [Girardeau-Montaut 1987] :

$$n(r) = [n_1^2 - O.N.^2 (r/d_1)^k]^{1/2}$$

où k est un coefficient qui détermine les vitesses effectives de propagation des différents modes dans la fibre. Il définit la bande passante de la fibre. Dans le cas particulier où $k=2$, le profil de propagation de la puissance lumineuse est dit parabolique.

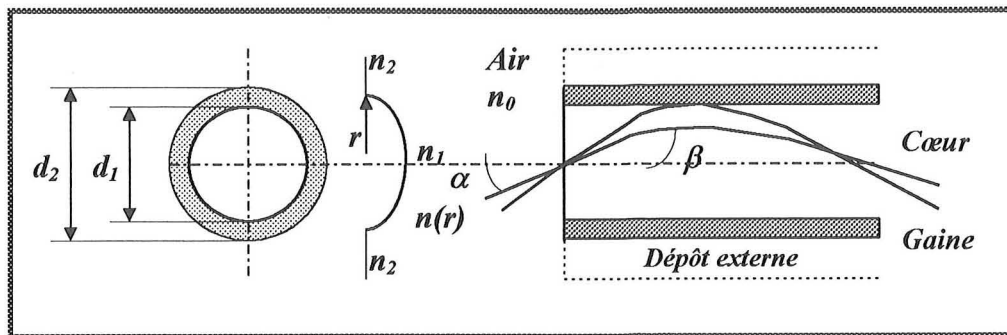


Figure 29 : Géométrie d'une fibre à gradient d'indice ($d_1 \geq 50 \mu\text{m}$ et $d_2 = 125 \mu\text{m}$)

L'angle d'ouverture de la fibre à gradient d'indice dépend de la distance du point d'entrée à l'axe. L'ouverture numérique est maximum sur cet axe et nulle sur les bords ($r=d_1/2$).

Sur l'axe, elle est donnée par la relation suivante [Halley 1985] :

$$O.N.(r=0) = \sqrt{n_1^2 - n_2^2}$$

En dehors de l'axe :

$$O.N.(2r/d_1) = O.N.(r=0) \cdot [1 - (2r/d_1)^2]^{1/2}$$

L'ouverture numérique effective de la section droite d'entrée est :

$$O.N._{eff} = O.N.(r=0)/\sqrt{2}$$

Elle est typiquement de l'ordre de 0,2. Pour les mêmes caractéristique d'ouverture numérique et d'indice, la quantité de lumière que peut accepter la fibre inhomogène à gradient d'indice est la moitié de celle que peut accepter une fibre homogène à saut d'indice. Ce type de fibre est beaucoup plus difficile à réaliser et par conséquent plus coûteuse que la fibre à saut d'indice, mais elle offre de meilleures performances de transmission.

IV.1.3.3. Fibre monomode

La fibre monomode est une fibre à saut d'indice caractérisée par un diamètre du cœur $d_1 \ll d_2$, de l'ordre de quelques microns (Figure 30). Le fait qu'un seul mode se propage dans la fibre limite la dispersion chromatique qui se traduit par une variation de l'indice en fonction

de la longueur d'onde. Dans ce type de fibre optique, il est possible de choisir une fenêtre spectrale permettant d'obtenir une bande de fréquences supérieures à 10GHz/km. De plus, en ajustant les paramètres optoélectroniques des guides diélectriques, il est possible d'optimiser la transmission d'une longueur d'onde donnée [Ungar 1989].

Le caractère modal V de ce type de fibre est lié à la longueur d'onde de la lumière essentiellement transmise, au diamètre du cœur et à l'ouverture numérique, par la relation suivante [Girardeau-Montaut 1987] :

$$V=2\pi[d_1/\lambda]O.N.$$

Le nombre de modes est donné par $V^2/2$. La fibre est dite monomode quand $V < 2,4$. C'est à dire que l'angle maximum d'acceptance est inférieur à l'angle de diffraction créé par l'ouverture numérique du cœur. A titre d'exemple, pour $\lambda=633 \text{ nm}$, la fibre sera monomode si $d_1 \cong 5 \mu\text{m}$ et $\Delta n=n_1 - n_2=3.10^{-3}$.

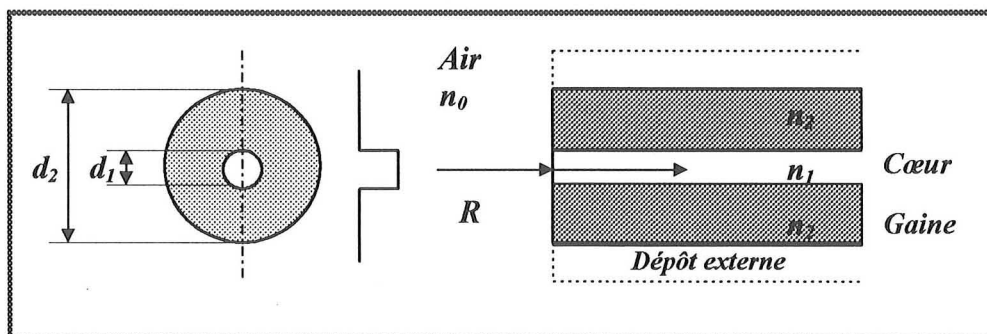


Figure 30 : Géométrie d'une fibre monomode

L'avantage principal de ce type de fibres optiques est la large bande passante et la faible atténuation en fonction de la longueur d'onde. Cependant, le raccordement de ces fibres aux sources de lumière est techniquement difficile en raison du faible diamètre de cœur.

IV.1.4. Connecteurs

Ce sont des éléments de raccordement entre l'interface émetteur - fibre ou fibre - récepteur. Le connecteur est composé d'un cœur dans lequel la fibre est précisément positionnée, d'une

enveloppe qui comprend le moyen de fixation de la fibre et d'un système de verrouillage (Figure 31).

Le montage d'un connecteur sur une fibre optique est réalisé de la façon suivante : la fibre dénudée jusqu'à la gaine est enduite de colle puis introduite dans le connecteur équipé d'un cône de guidage qui bloque la partie non dénudée du revêtement. La fibre arrivant en butée est ensuite sertie au connecteur avant d'être maintenue par une gaine thermorétractable. En chauffant l'adhésif jusqu'à sa polymérisation, on assure la fixation de la fibre dans le connecteur. A l'extrémité du connecteur, la fibre est fracturée au niveau de la goutte de colle puis polie jusqu'à l'obtention d'une surface miroir. De tels connecteurs facilitent le montage et le démontage des liaisons optiques avec peu de perte au niveau de l'extrémité de la fibre [Ungar 1989].

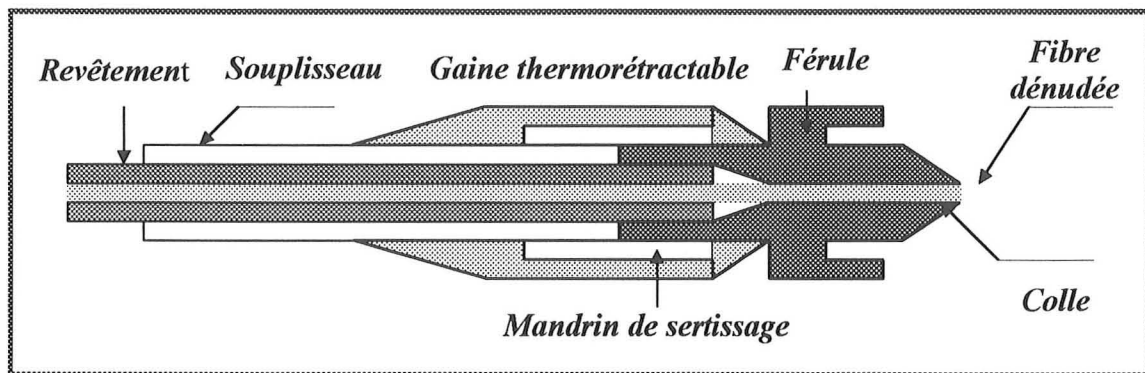


Figure 31 : Schéma d'un connecteur

On trouve d'autres types de connecteurs plus faciles à monter sur les fibres, sans utilisation de colle, comme les connecteurs SMA. L'embout d'un connecteur SMA se compose d'un cylindre en matériau inoxydable dans lequel est enchâssé en "face avant" un saphir annulaire de haute précision. Le rôle de ce saphir est double : il assure le positionnement mécanique de la fibre au centre de l'embout et le maintien des caractéristiques optiques de cette fibre par son indice. Dans l'autre extrémité de l'embout est glissé un manchon en plastique qui amortit les contraintes consécutives au sertissage de l'embout sur la fibre. Le montage de ce type de connecteur nécessite l'utilisation d'une machine spécifique à fracturer. D'abord, on dénude la fibre et on la glisse dans le connecteur puis on sertit le connecteur sur la fibre. L'ensemble est ensuite introduit dans la machine à fracturer dont le diamant provoque la rupture de la fibre. En appliquant une traction sur la fibre, on obtient une face optique

parfaitement plane et lisse. Les pertes dans ce type de connecteurs sont d'environ 2-4 dB [Documentation SEDI 1994]. Dans les applications de la détection de fluorescence on doit veiller à ce que toutes les composantes de positionnement de la fibre nue dans le connecteur ne soient pas fluorescentes. Le connecteur SMA à saphir est bien adapté à ces applications.

IV.1.5. Coupleurs

Les coupleurs sont des éléments passifs qui permettent la séparation ou le raccordement de plusieurs signaux optiques transmis au moyen des fibres optiques. Avec des ratios de couplage bien définis, l'utilisateur peut automatiquement contrôler l'amplitude de départ de chaque signal issu du coupleur.

Les techniques de réalisation des coupleurs passifs sont nombreuses ; nous présentons ici la technique la plus courante et qui a l'avantage d'être applicable à tous les types de fibres optiques. Le principe de cette technique consiste à courber deux fibres et à les polir latéralement jusqu'à une certaine profondeur de réduction du cœur d plus ou moins importante (Figure 32). Pour un coupleur 50/50, l'extrémité de chaque fibre est réduite de moitié. Les fibres biseautées par polissage avec un angle très faible sont montées l'une en face de l'autre avec un liquide d'indice. Après alignement des fibres au moyen d'un moule spécifique (rainure déformable d'un centreur en élastomère), les deux fibres sont rendues monobloc par collage en couche mince. Elles sont ensuite solidarisées dans une plaquette par polymérisation. La résine polymérisée est ensuite démoulée pour construire un coupleur élémentaire 1 vers 2. La protection du coupleur élémentaire est obtenue par collage dans un berceau en métal inoxydable. Les fibres issues des deux côtés du coupleur sont protégées par un souplisseau ou un câble solidarisé au berceau. Les coupleurs du type 1 entrée, n sorties ($n=2-16$) sont obtenus par cascades successives de coupleurs 1 vers 2. En agissant sur le taux de réduction de chaque fibre par polissage on peut obtenir des coupleurs avec des ratios différents (50/50, 40/60, 30/70, 20/80 ou 10/90). Les pertes dans un coupleur 50/50 sont d'environ 1-4 dB [Ungar 1989, Documentation SEDI 1994].

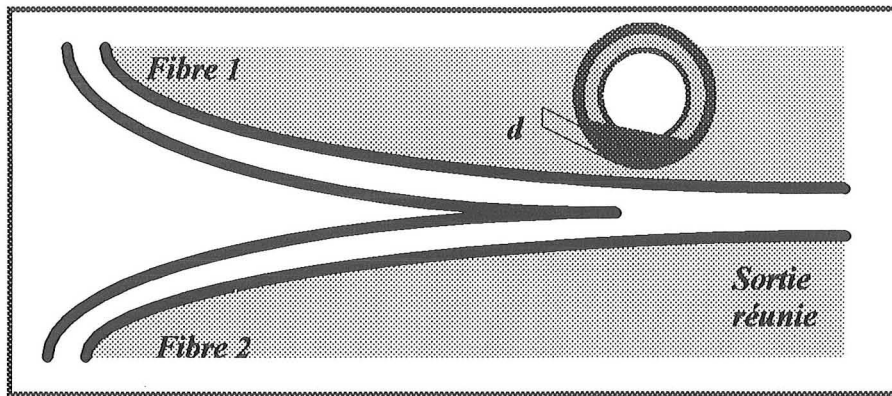


Figure 32 : Coupleur passif 2×1 obtenu par polissage

IV.1.6. Pertes dans les fibres optiques

Les différents modes propagés dans la fibre optique ne s'affaiblissent pas dans les mêmes proportions, sur l'unité de distance. Cependant, il se produit un mélange des énergies propagées par les modes, provoqué par les imperfections de réalisation du guide, qui sont inévitables. Le résultat de ce mélange est la formation, à partir d'une certaine distance de l'entrée, d'une séquence équilibrée de modes, dont l'affaiblissement par unité de distance est constant [Halley 1985]. L'atténuation du signal lumineux dépend du matériau, de la longueur d'onde de la lumière guidée et de la longueur du guide. Elle peut être attribuée à deux phénomènes essentiels : l'atténuation par absorption et diffusion des photons, et la réfraction par courbure.

L'absorption de la lumière se produit chaque fois qu'un photon entre en interaction avec un atome, une molécule ou un solide dans le verre constituant le cœur ou dans la gaine. L'absorption dans le verre peut être décomposée en deux parties : absorption dite intrinsèque, attribuable au verre lui-même et absorption dite extrinsèque, due à la présence d'atomes et d'ions étrangers [Abdul-Nour 1994].

La diffusion de la lumière se produit à chaque fois que la lumière traversant la fibre rencontre une irrégularité de dimension inférieure à sa longueur d'onde. La lumière est ainsi remise dans toutes les directions. Ce phénomène, appelé la diffusion Rayleigh, produit dans certaines directions, un changement de l'angle d'incidence θ_c . Par conséquent, la condition de réflexion totale à l'interface cœur-gaine n'est plus remplie. Une partie de la lumière sera

réfractée dans la gaine et absorbée ou transmise. La probabilité de perte par réfraction augmente quand la fibre subit une courbure.

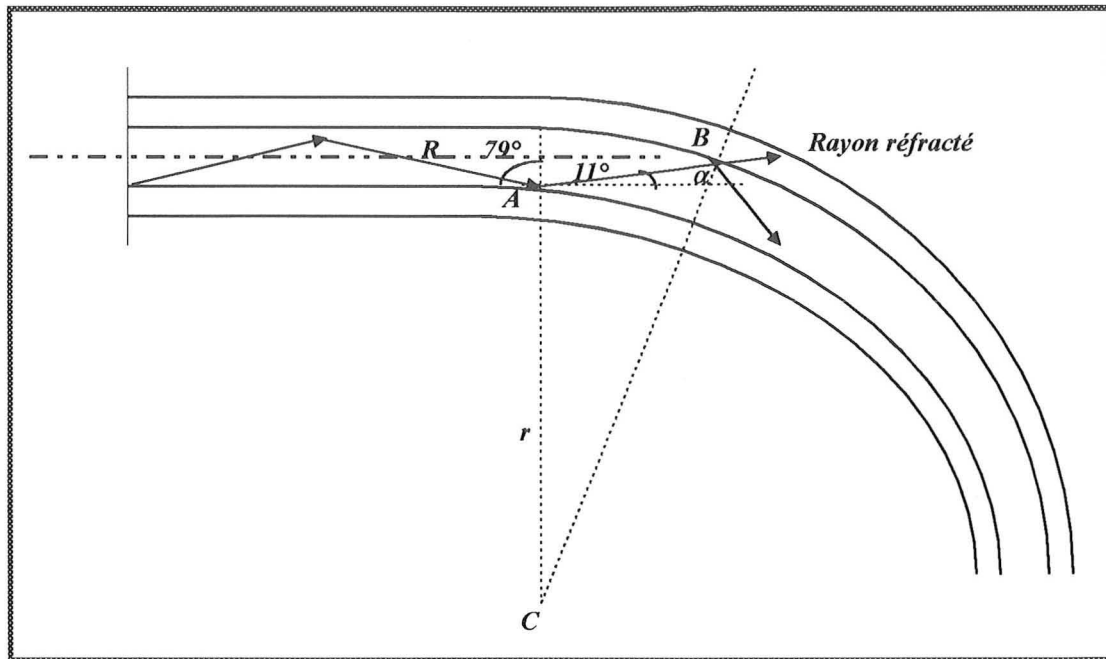


Figure 33 : Perte de courbure - perte par réfraction

En effet, la courbure de la fibre constitue un phénomène d'atténuation variable. Les pertes par courbure dépendent des conditions d'injection des rayons. Dans la partie courbée, les rayons de cœur, qui sont au voisinage de l'indice de l'angle d'incidence critique, sont partiellement réfractés et perdent une partie de l'énergie guidée (Figure 33). Sur la longueur du trajet courbe, l'affaiblissement linéique α augmente de $\Delta\alpha$. La quantité $\Delta\alpha$ [dB/km] est donnée approximativement par [Halley 1985] :

$$\Delta\alpha = 10 \log \{ 1 - [2dn_1^2 / (O.N.)^2 \cdot r] \}$$

où r est le rayon de courbure et d est le diamètre de cœur de la fibre optique. Cependant, pour un rayon de courbure $r \geq 1$ cm, la fibre optique peut être courbée sans grand inconvénient.

Dans tous les cas, bien qu'il n'y ait pas une perte totale de lumière, il y a atténuation dans la fibre caractérisée par son affaiblissement linéique de puissance optique (**A**) :

$$A = -10/L \log_{10} [P_t/P_0] \quad [dB/km]$$

où **P₀** est la puissance initiale à l'entrée de la fibre optique et **P_t** est la puissance transmise à une distance **L**.

V. INSTRUMENTATION SPECTROSCOPIQUE

Le meilleur choix d'une instrumentation spectroscopique pour une application particulière est guidé par certains critères qui sont d'une importance primordiale dans l'analyse des signaux optiques. L'objectif de ce chapitre est de présenter le principe de fonctionnement des différents éléments optiques et optoélectroniques qui composent le système spectroscopique. Les caractéristiques spectrales et quantiques de ces éléments nous permettront d'adapter le système de mesure aux propriétés physiques (amplitude et étendue spectrale) du signal mesuré.

V.1.1. Spectrographe à réseau dispersif

Le spectrographe est un instrument optique composé d'une fente d'entrée, d'un système dispersif et d'une fente de sortie. Il produit en sa fente de sortie une image de la fente d'entrée dans laquelle les radiations sont séparées, selon leurs longueurs d'onde, au moyen d'un réseau dispersif, par un mécanisme de réflexion ou de transmission. Le réseau dispersif peut être vu comme une surface réfléchissante (miroir plan ou concave) composée d'un très grand nombre de traits ($\approx 10^5$). Les traits sont gravés sur la surface au moyen d'un diamant très précis ou réalisés par une technique holographique (hologramme d'interférence) [Walker 1962, Demtröder 1995].

Quelque soit la méthode de réalisation, la diffraction de la lumière dans les réseaux est régie par l'équation fondamentale suivante (Figure 34) :

$$\sin \alpha + \sin \beta = 10^6 \cdot k \cdot n \cdot \lambda$$

où :

α : angle d'incidence

β : angle de diffraction

k : ordre de diffraction (nombre entier)

n : densité du réseau, nombre de traits par millimètre [Trait/mm]

λ : longueur d'onde [nm]

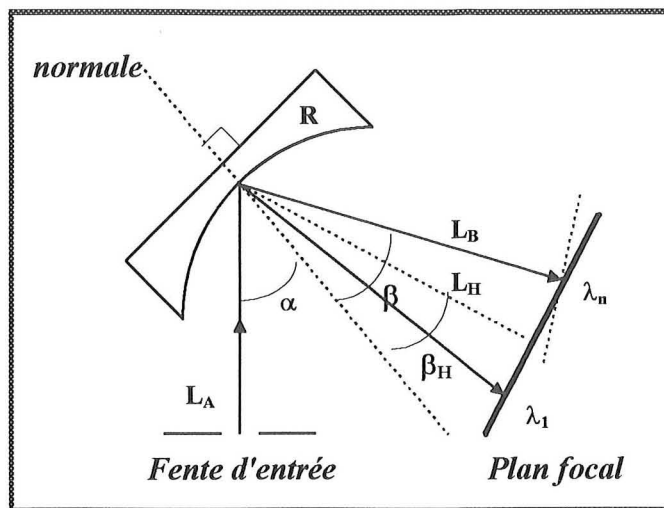


Figure 34 : Dispersion de la lumière dans un réseau concave.

$L_A=L_B=F$ est la distance focale.

Les caractéristiques spectrales et énergétiques que nous présentons ci-après découlent de cette équation fondamentale.

V.1.1.1. Dispersion angulaire

La dispersion angulaire est définie comme le changement de l'angle de diffraction correspondant à un faible changement en longueur d'onde. Elle est donnée par le rapport de la séparation angulaire $d\beta$ entre deux longueurs d'onde distantes de $d\lambda$:

$$d\beta/d\lambda = k \cdot n \cdot 10^6 / \cos \beta \quad [\text{rad/nm}]$$

Ce paramètre dépend de l'angle de diffraction β , de l'ordre dans lequel on se place k et de la densité du réseau n .

V.1.1.2. Dispersion linéaire

La dispersion linéaire définit l'étendue de l'intervalle spectral sur le plan focal et caractérise la capacité du spectrographe à séparer les détails spectraux des radiations mesurées. Elle s'exprime par :

$$D_f = d\lambda/dx = 10^6 \cos \beta / kn \cdot L_B \quad [nm/mm]$$

La dispersion linéaire en sortie du spectrographe varie en fonction de la distance focale L_B (réseau - plan focal) et de l'angle de diffraction β . Plus la dispersion linéaire du spectrographe est faible plus les raies spectrales sont affinées et plus l'identification est simple.

V.1.1.3. Résolution spectrale et bande passante

En pratique, les raies spectrales sont généralement des structures larges. L'élargissement spectral que subit les raies est dû à des phénomènes physiques et instrumentaux. A la largeur spectrale naturelle très faible due à la durée de vie limitée de l'émission se superposent des élargissements plus importants dus à l'environnement (effet Doppler, collisions, ...).

Pour caractériser le profil de l'instrument spectroscopique, on définit deux paramètres fondamentaux :

- la résolution spectrale qui est le plus petit intervalle entre deux raies adjacentes que l'instrument est capable de séparer ;
- la bande passante qui est la largeur à mi-hauteur (Full width at half maximum, FWHM) du profil spectral que produit l'instrument pour une raie parfaitement monochromatique.

Ainsi, pour une source lumineuse à spectre continu de répartition énergétique variable, la bande passante correspond à l'intervalle spectral que l'instrument est capable d'isoler. Elle dépend de la largeur du réseau, de phénomènes d'aberration comme la coma, de la résolution spatiale du détecteur (la taille du pixel d'un détecteur multicanal et l'espacement entre deux pixels), de la largeur de la fente d'entrée et de la fente de sortie.

Pour mettre en évidence l'influence du profil instrumental sur l'allure du spectre mesuré, on considère une source de lumière monochromatique de longueur d'onde λ_p . Si la lumière de cette source est mesurée par un instrument parfait, le spectre constituera une raie située à

λ_p . Par contre, si le spectre est mesuré par un instrument réel, le spectre subit un élargissement dû au profil instrumental (Figure 35).

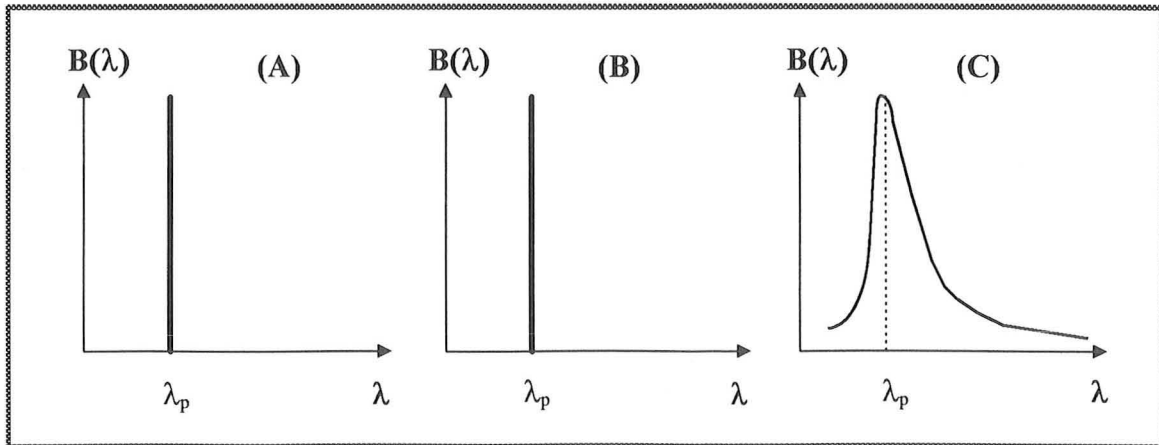


Figure 35: Profil instrumental. A : spectre réel d'une source monochromatique, B: spectre mesuré par un instrument parfait, C: spectre mesuré par instrument réel.

Comme toute structure spectrale continue peut être considérée comme la somme d'un nombre infini de raies monochromatiques situées à des longueurs d'ondes différentes, on peut définir une relation entre le spectre mesuré par l'instrument $F(\lambda)$, le spectre réel de la source à analyser $B(\lambda)$ et le profil de l'instrument $P(\lambda)$, telle que :

$$F(\lambda) = B(\lambda) * P(\lambda)$$

Le spectre mesuré par l'instrument $F(\lambda)$ constitue la convolution du spectre réel et du profil de l'instrument.

L'allure du profil instrumental dépend de plusieurs facteurs :

- de la largeur de la fente d'entrée du spectrographe w_e ;
- de la largeur de la fente de sortie du spectrographe w_s ou de la taille du pixel dans le cas d'un détecteur multicanal ;
- des phénomènes d'aberration ;
- de la qualité du réseau et de l'alignement des éléments optiques.

Ainsi, le profil de l'instrument constitue la convolution des profils d'élargissement produits par chacun de ces facteurs :

$$P(\lambda) = P(\lambda)_{w_e} * P(\lambda)_{w_s} * \dots$$

Le profil d'élargissement que produit chaque fente est donnée par :

$$P(\lambda)_{w_e} = \Delta\lambda_e = w_e \cdot D_l$$

$$P(\lambda)_{w_s} = \Delta\lambda_s = w_s \cdot D_l$$

où $D_l = d\lambda/dx$ est la dispersion linéaire du spectrographe.

Les phénomènes d'aberration peuvent être négligés si les conditions du couplage optimal (principe de conservation de l'étendue géométrique d'Abbe) entre la source et la fente d'entrée du spectrographe sont respectées. En général, on peut les inclure dans la résolution spectrale de l'instrument $d\lambda$. Nous reviendrons sur ce point ultérieurement.

Pour déterminer, approximativement, la bande passante **BP** (la largeur à mi-hauteur) du profil instrumental, on distingue deux cas liés aux caractéristiques spectrales des sources lumineuses à analyser :

- Source monochromatique dont la largeur spectrale de la raie à mi-hauteur $d\lambda(\text{raie})$ est très étroite, de l'ordre de la résolution théorique de l'instrument $d\lambda(\text{résolution})$. Dans ce cas la bande passante du profil instrumental est donnée par la relation suivante :

$$BP \cong \sqrt{\Delta\lambda^2(\text{fentes}) + d\lambda^2(\text{résolution}) + d\lambda^2(\text{raie})}$$

- Source à spectre continu, comme c'est le cas de la fluorescence tissulaire. La largeur à mi-hauteur du spectre est beaucoup plus étendue que la résolution théorique de l'instrument. Par conséquent, les fentes d'entrée et de sortie sont dominantes pour la

détermination de la bande passante du profil instrumental. Ainsi, elle peut être donnée par :

$$BP = 10^6 \max(w_e, w_s) \cdot \cos\alpha / k \cdot n \cdot L_A$$

ou encore :

$$BP \cong \max(\Delta\lambda_e, \Delta\lambda_s)$$

La figure 36 montre une schématisation du profil instrumental correspondant à la convolution des profils de la fente d'entrée et de la fente de sortie. Dans ce schéma la bande passante du spectrographe est régie par le profil de la fente d'entrée ($BP = \Delta\lambda_e$)

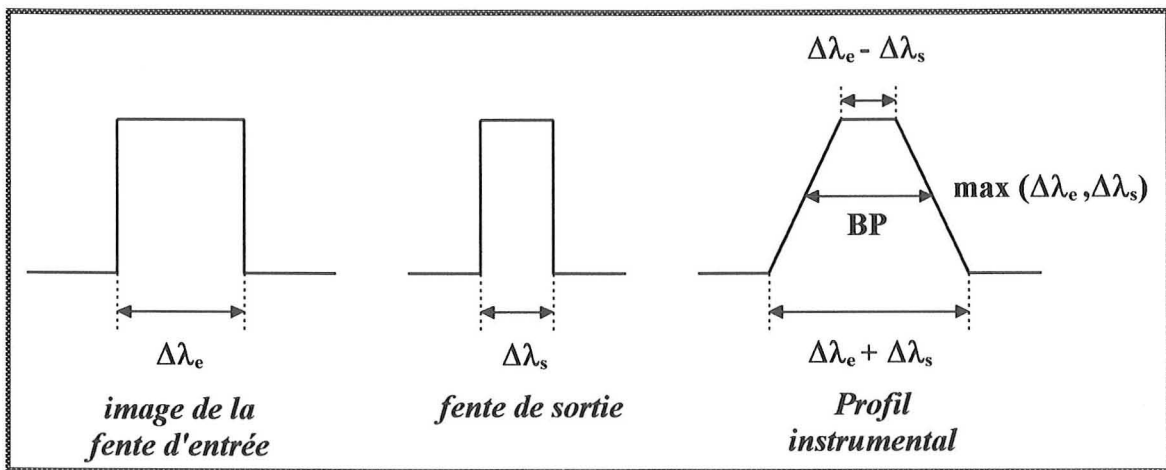


Figure 36 : Convolution des profils d'entrée et de sortie du spectrographe

Dans les analyseurs optiques multicanaux, la taille de la fente de sortie est davantage optimisée car elle correspond à la taille d'un pixel (élément photosensible). Par conséquent, la meilleure approche permettant d'avoir un bon débit du flux lumineux à la sortie du spectrographe, sans perte de résolution, consiste à optimiser la largeur de la fente d'entrée.

V.1.1.4. Puissance ou pouvoir de résolution

La pouvoir de résolution est un critère théorique qui reflète la capacité d'un spectrographe à séparer les radiations lumineuses. Elle est définie par :

$$R = \lambda / d\lambda = k.N$$

où :

$d\lambda = \lambda_1 - \lambda_2$ est la différence en longueur d'onde entre deux raies d'intensité équivalente (résolution) ;

N est le nombre total des traits du réseau de diffraction (**$n \times$ largeur illuminée du réseau**).

V.1.1.5. Efficacité spectrale

L'efficacité spectrale est définie comme le rapport de l'énergie de la lumière à la fente de sortie du spectrographe par l'énergie de la lumière à la fente d'entrée. Elle caractérise la distribution de l'intensité lumineuse sur l'étendue spectrale du spectrographe en fonction de la longueur d'onde.

$$E(\lambda) = \frac{E_s(\lambda)}{E_e(\lambda)} \times 100\%$$

L'efficacité spectrale dépend de la densité du réseau et du nombre total de traits. La densité du réseau est une caractéristique très importante pour la détermination de l'efficacité sur l'étendue spectrale que le spectrographe est destiné à analyser.

V.1.1.6. Etendue géométrique

L'étendue géométrique G caractérise la capacité d'un système optique à accepter la lumière.

$$G = \pi S \sin^2 \alpha$$

L'étendue géométrique d'un spectrographe peut être vue comme la taille maximale du faisceau lumineux qui peut être accepté sur sa fente d'entrée. Ainsi, pour que le spectrographe accepte le maximum de lumière sans produire de phénomène d'aberration, le couplage avec la source doit satisfaire au principe de conservation de l'étendue géométrique d'Abbe. C'est à dire :

$$S_e \Omega_e = S_s \Omega_s$$

où :

S_e , Ω_e sont respectivement la surface de fente d'entrée du spectrographe et l'angle solide d'acceptance ;

S_s , Ω_s sont respectivement la surface de la source et l'angle solide de propagation.

En général, on exprime la capacité d'acceptance du spectrographe (cône ou pyramide d'acceptance) par l'intermédiaire du nombre d'ouverture " $F/\#$ ".

$$F/\# = 1/2 \sin \alpha = 1/2 O. N.$$

Ainsi, pour de faibles angles d'incidence ($\alpha \cong \sin \alpha$), on peut approximativement donner l'étendue géométrique en fonction du nombre d'ouverture, telle que:

$$G = \pi. S. (O.N)^2 = \pi. S. [1/(2F/\#)]^2$$

V.1.1.7. Flux lumineux

Le flux lumineux en sortie du spectrographe est proportionnel à la bande passante des fentes d'entrée et de sortie ($\Delta\lambda_e$, $\Delta\lambda_s$), à la hauteur des fentes h et à la surface du réseau S_R . Dans le cas d'une source lumineuse de large structure spectrale comme la fluorescence, le flux lumineux peut être donné par :

$$\Phi = S_R . h . \Phi_s . E(\lambda) . N . \Delta\lambda_e . \Delta\lambda_s$$

où, $E(\lambda)$ est l'efficacité spectrale du réseau et Φ_s est le flux lumineux de la source.

V.2. FILTRES INTERFERENTIELS

Les filtres interférentiels sont conçus pour transmettre une bande étroite de longueurs d'onde sélectionnée à partir d'un large spectre lumineux (lampes). La lumière incidente de longueurs d'onde situées en dehors de la bande passante du filtre est éliminée par un phénomène d'interférence dû aux réflexions multiples. La réalisation de tels filtres est basée sur le principe de l'interféromètre de Fabry-Pérot.

Un interféromètre de Fabry-Pérot est composé de deux lamelles diélectriques transparentes, parfaitement parallèles, sur les deux surfaces desquelles une couche semi-réfléchissante (aluminium ou argent) est appliquée. La distance entre les deux lamelles appelée épaisseur optique de la cavité (e) est le paramètre qui détermine les bandes lumineuses transmises.

Un maximum de transmission lumineuse (T^*_{max}) pour une longueur d'onde λ correspond à une épaisseur de la cavité $e=k\lambda/2n$, où k est un entier et n l'indice du milieu qui constitue la lame (cavité). A titre d'exemple, pour une épaisseur $e=500 \text{ nm}$, les bandes centrées aux longueurs d'onde $\lambda_1=1000 \text{ nm}$, $\lambda_2=500 \text{ nm}$, $\lambda_3=330 \text{ nm}$, ... sont transmises. Grâce aux réflexions multiples et à l'absorption par les matériaux de la cavité (verre, filtre coloré,...), les harmoniques inférieures à λ_1 peuvent être éliminées.

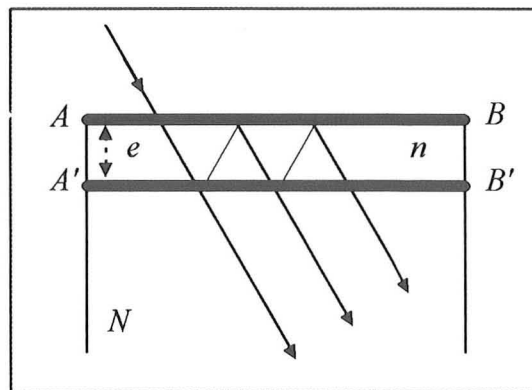


Figure 37 : Principe d'un filtre interférentiel de Fabry-Pérot

La réalisation pratique de filtres interférentiels consiste à utiliser une lame en verre d'indice N sur lequel on dépose, par évaporation, une couche semi-réfléchissante (aluminium) très mince $A'B'$ (Figure 37). On dépose ensuite une couche diélectrique mince d'épaisseur e et

d'indice n , puis une couche semi-réfléchissante **AB** identique à **A'B'**. Les couches **AB** et **A'B'** jouent le rôle des miroirs semi-réfléchissants de l'interféromètre Fabry-Pérot. La combinaison en série de plusieurs cavités (multicouches diélectriques) de même épaisseur optique permet de réduire la bande passante des filtres réalisés ainsi [Françon 1992, Demtröder 1995].

Le filtre interférentiel est caractérisé par une bande passante et une transmittance maximale T^*_{max} . La largeur spectrale de la bande passante à mi-hauteur (FWHM) est déterminée par un paramètre appelé finesse F^* qui est par définition le rapport de largeur entre deux sur la largeur d'un pic.

$$T^*_{max} = T^2 / (1 - R)$$

$$F^* = \pi\sqrt{R} / (1 - R)$$

où, T et R sont respectivement la transmittance et la réflectance des couches déposées sur les lamelles.

Les filtres interférentiels ont le grand avantage de permettre de choisir à volonté la longueur d'onde (ultraviolet, visible et infrarouge) et la largeur de la bande passante qui peut atteindre l'ordre de quelques nanomètres. La puissance lumineuse nécessaire pour induire la fluorescence, vis à vis de la sensibilité de l'analyseur optique multicanal, est relativement faible (≈ 1 mW). Ainsi, on peut choisir des filtres interférentiels avec de faibles bandes passantes (< 10 nm) pour obtenir une lumière d'excitation assez monochromatique facilement séparable de la lumière de fluorescence.

V.3. PHOTODETECTEURS

Le photodétecteur est un élément passif ou actif qui transforme l'énergie lumineuse en énergie électrique. Cette transformation peut se faire de trois façons distinctes : par effet thermique, par effet photoémissif et par effet photoélectrique [Asch 1982, Girardeau-Montaut 1987].

Effet thermique : lorsque les photons incidents sont absorbés par la surface d'un détecteur, l'augmentation de température qui en résulte produit un changement des caractéristiques thermiques de ce détecteur. Selon le type de détecteur, ce changement engendre l'un des effets suivants :

- modification d'une résistance de mesure (bolomètre);
- provocation d'une force électromotrice dans la soudure d'un thermocouple (thermopiles);
- variation de la polarisation diélectrique permanente d'un cristal (effet pyroélectrique);
- modification de la température au corps interne d'un calorimètre.

Effet photoémissif : dans ce cas où le capteur est une surface de matériau photoémissif placé dans un vide poussé. Les électrons émis sont collectés par l'anode polarisée et créent un courant électrique (Photomultiplicateur).

Effet photoélectrique : cet effet se produit dans le cas des photodiodes dont la partie sensible de matériau est la jonction entre deux semi-conducteurs différents. Les photons pénètrent dans la zone de jonction et modifient les conditions d'équilibre électrique en produisant des paires électron-trou. Cette modification d'équilibre électrique provoque soit une variation de courant en mode photoconducteur, soit une variation de tension en mode photovoltaïque.

La réponse de photodétecteurs qui fonctionnent par effet thermique est indépendante de la longueur d'onde. Par contre, la réponse des détecteurs photoémissifs et photoélectriques est fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente [Demtröder 1995].

V.3.1. Paramètres des détecteurs optiques

Pour la majorité des applications spectroscopiques, la sensibilité de détection de la lumière et la fidélité de mesure de l'intensité spectrale sont des paramètres de première importance dans la détermination des caractéristiques du signal mesuré. Le bon choix d'un photodétecteur adapté à une application précise repose essentiellement sur ses paramètres optique.

V.3.1.1. L'efficacité quantique

On appelle efficacité ou rendement quantique ρ le rapport du nombre de paires d'électron-trou ou électrons créés par le détecteur sur le nombre de photons reçus :

$$\rho = I_{ph} \cdot h\nu / \phi \cdot q$$

où :

I_{ph} : photocourant du détecteur ;

q : charge de l'électron ;

ϕ : flux incident, par rapport à la surface active du détecteur ;

$h\nu$: énergie d'un photon ;

Ce paramètre dépend de la longueur d'onde et du type de matériau photosensible.

V.3.1.2. Sensibilité

Elle s'exprime en ampère par Watt ou en Volt par Watt et découle du rendement quantique. C'est, par définition, le rapport du photocourant I_{ph} (photoconduction) ou de la tension V_{ph} (photovoltaïque) créé par le détecteur par la valeur du flux énergétique incident :

$$S_{\lambda} = I_{ph} / \phi = V_{ph} / \phi$$

Ce paramètre détermine le seuil de détection et est généralement lié au rapport signal/bruit.

V.3.1.3. Réponse spectrale

La réponse spectrale caractérise la sensibilité du détecteur en fonction de la longueur d'onde du rayonnement mesuré. Elle dépend essentiellement de l'absorbance du matériau qui compose la surface active du détecteur. Par conséquent, elle détermine la bande spectrale pour laquelle le détecteur est adapté. Le silicium est généralement utilisé dans la construction des détecteurs destinés à la mesure des radiations lumineuses du proche ultraviolet au proche infrarouge.

V.3.1.4. Le rapport signal-bruit

Le rapport signal/bruit d'un photodétecteur caractérise l'importance du signal par rapport au bruit. Il est principalement lié aux bruits externes que produit la lumière incidente (signal mesuré) et aux bruits internes inhérents au photodétecteur lui-même :

- bruit de fond qui est lié à la répartition aléatoire de photons incidents et au couplage source - détecteur ;
- bruit de battement qui se produit dans le détecteur du fait des différentes composantes spectrales de la lumière mesurée ;
- bruit du courant d'obscurité dû à l'agitation thermique des porteurs dans le semi-conducteur ;
- bruit thermique (Johnson) qui se produit dans la résistance de charge du détecteur et dans les éléments actifs de l'amplificateur électronique associé ;
- bruit quantique (Shot noise) qui provient des fluctuations intrinsèques de la photoproduction des paires électriques porteuses ;
- bruit de lecture cyclique des détecteurs multicanaux.

Le bruit d'un photodétecteur est généralement exprimé par le bruit équivalent d'une puissance lumineuse incidente (Noise Equivalent Input Power, NEP). C'est la puissance lumineuse d'entrée qui engendre le même signal de sortie que le bruit du photodétecteur. Autrement dit, c'est le signal d'entrée pour lequel le rapport signal/bruit est égal à 1 (S/N=1).

Pour caractériser la détectivité d'un photodétecteur vis à vis de son bruit interne, on définit un paramètre de détectivité D^* . Ce paramètre caractérise le rapport signal/bruit d'un photodétecteur d'une surface photosensible efficace A et d'une bande fréquentielle de fonctionnement Δf pour une puissance lumineuse incidente $P=1$ W, tel que :

$$D^* = \frac{\sqrt{A\Delta f}}{P} \frac{V_s}{V_n} = \frac{\sqrt{A\Delta f}}{NEP} [\text{cm.Hz}^{1/2} \text{ W}^{-1}]$$

Pour assurer une bonne détection, la puissance du signal mesuré ne doit pas être inférieure à la puissance que produit le bruit.

V.3.1.5. Champ dynamique

Ce paramètre caractérise l'intervalle maximal des intensités, à une longueur d'onde donnée, dans lequel la réponse d'un photodétecteur est linéaire et non saturée. C'est à dire, la gamme des intensités dans lequel le signal de réponse V_s est proportionnel à la puissance de la lumière incidente P . La linéarité du photodétecteur dépend essentiellement de la réponse de l'amplificateur associé. Ce paramètre est très important quand le photodétecteur est destiné à mesurer une large gamme d'intensités.

V.3.1.6. Rapidité

La rapidité d'un détecteur est définie par son temps de réponse (temps de réaction) qui caractérise le temps séparant le début de l'impulsion où il quitte son niveau de repos et le moment où il le retrouve.

V.3.2. Détecteurs monocanaux

Les photodétecteurs monocanaux destinés à la mesure de faible puissance lumineuse appartiennent essentiellement à deux catégories. Les photodiodes qui transforment la lumière en signal électrique par effet photoélectrique comme les photodiodes à avalanche (APD) et les photocathodes qui transforment la lumière en signal électrique par effet photoémissif comme dans les tubes photomultiplicateurs (PMT).

V.3.2.1. Photodiode à avalanche (APD)

Le principe des photodiodes à avalanche repose sur l'amplification interne du photocourant généré lors de l'absorption d'un photon dans la jonction entre deux semi-conducteurs différents. En effet, l'absorption d'un photon par un semi-conducteur génère la création d'une paire électron - trou qui est séparée dans la jonction **p-n**. L'électron se dirige vers la zone **n** et le trou vers la zone **p**. La séparation de la paire électron - trou est facilitée lorsque

les zones **n** et **p** sont soumises à un champ électrique extérieur. La présence d'un champ électrique inverse aux bornes de la jonction attire les électrons vers la partie positive et les trous vers la partie négative ce qui crée autour de la jonction une zone désertée (Figure 38). Toute paire créée dans la zone désertée est dissociée par le champ électrique et participe au courant, par le passage d'un électron dans le circuit électrique extérieur [Halley 1985, Ungar 1989].

Si le champ électrique est suffisamment fort ($V > 10^5$ V/cm), les porteurs électriques entraînés dans la zone désertée peuvent acquérir une énergie cinétique suffisante pour aboutir à l'ionisation du matériau et créer par collision avec les atomes du semi-conducteur de nouvelles paires électron - trou. Lorsque celles-ci, à leur tour, atteignent le seuil d'ionisation, elles créent d'autres porteurs, et ainsi de suite. Le phénomène devient cumulatif et la conduction se fait par avalanche. La tension d'avalanche est approximativement proportionnelle à l'épaisseur de la zone désertée. Les photodiodes à avalanche en silicium peuvent potentiellement remplacer les photomultiplicateurs, car elles ont une sensibilité comparable à celle des PMT et une efficacité quantique supérieure à 40%. Leur facteur d'amplification peut atteindre 10^6 . De plus, la tension de polarisation des APD est beaucoup plus faible que celle des PMT, elle est d'environ 10-20 V. L'inconvénient principal des APD pour la détection de fluorescence par rapport aux PMT est leur petite surface active de détection [Demtröder 1995].

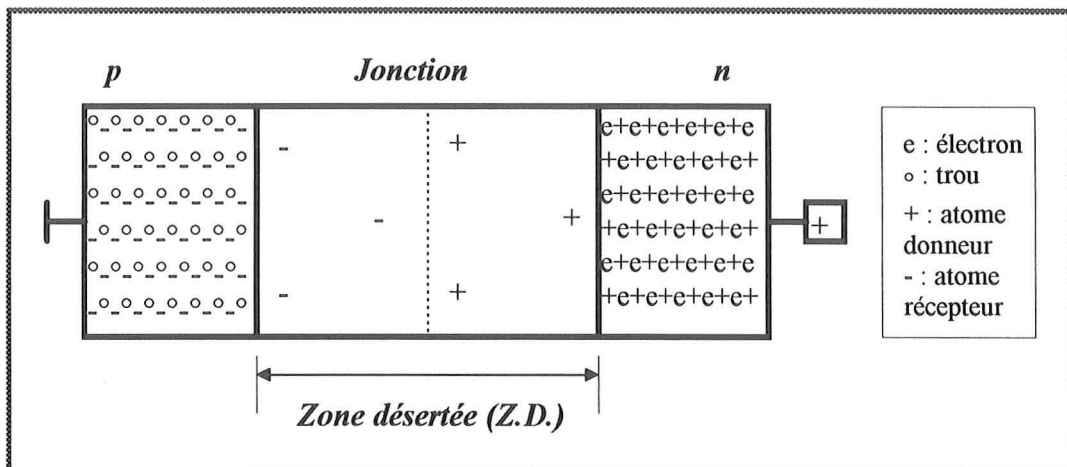


Figure 38 : Principe d'une diode à avalanche

V.3.2.2. Tube photomultiplicateur (PMT)

Les tubes photomultiplicateurs sont les détecteurs les plus utilisés en spectroscopie monocanale. Ils sont plus sensibles dans l'UV et le visible que les photodiodes. La figure 39 schématise la structure du tube photomultiplicateur dont le principe de fonctionnement est le suivant [Demtröder 1995] :

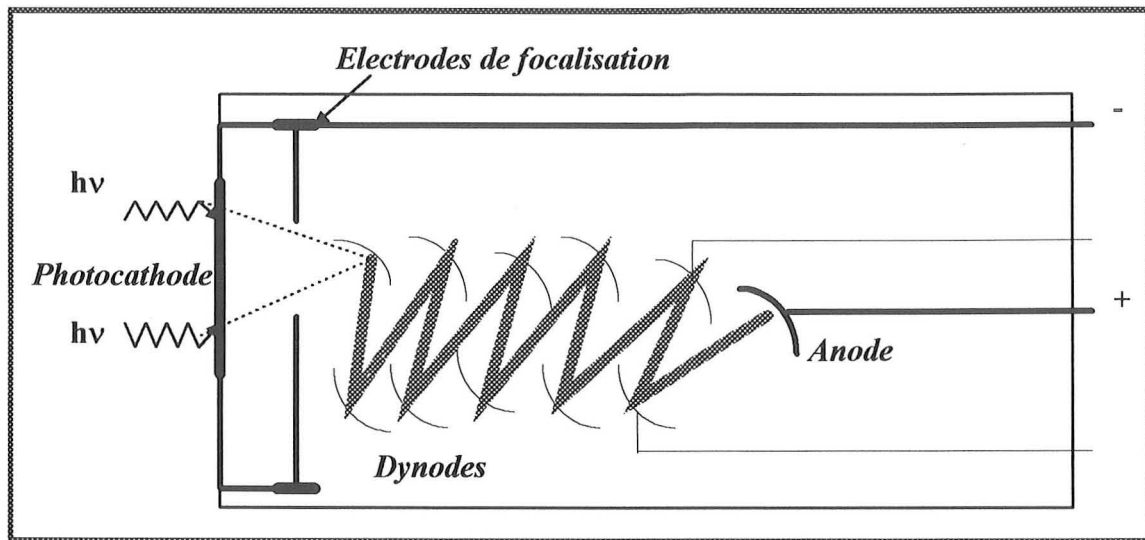


Figure 39 : Structure d'un tube Photomultiplicateur

La surface photosensible des PMT est la phot cathode qui est composée d'un conducteur couvert d'une ou de plusieurs couches de matériau photoémissif (métal alcalin ou semi-conducteur) opaque ou semi-transparent. La lumière incidente interagit directement avec les électrons de ce matériau. Un photon absorbé par la phot cathode libère un électron. Le surplus de l'énergie photonique se convertit en énergie cinétique de l'électron. Les électrons ayant une énergie cinétique suffisante quittent la surface du matériau et produisent le photocourant de la cathode dans le tube photomultiplicateur. Le potentiel positif de la première dynode dans le tube attire les électrons vers celle-ci, ce qui libère d'autres électrons. L'ensemble d'électrons se dirige vers la deuxième dynode en libérant d'autres électrons, et ainsi de suite jusqu'à ce qu'ils atteignent l'anode où le courant est mesuré. Le courant créé dans le tube est proportionnel à la puissance de la lumière incidente. Ce courant est amplifié par un facteur allant jusqu'à 10^7 , en une durée de l'ordre de la nanoseconde. L'inconvénient majeur des PMT réside dans la nécessité d'appliquer une haute

tension de polarisation entre l'anode et la cathode (≈ 1 kV) pour avoir un gain d'amplification important du photocourant.

V.3.3. Détecteurs multicanaux

Dans la catégorie des photodétecteurs multicanaux on distingue : la barrette de photodiodes (Photodiode Array, PDA) et la batterie de détecteurs à transfert de charges (Charge-Coupled Devices, CCD). La différence principale entre les deux types de photodétecteurs réside dans la taille d'éléments photosensibles, le mode de fonctionnement et la méthode de lecture. Dans le principe, une PDA ou une CCD consiste en un ensemble d'éléments (Pixels) photosensibles déposés sur une plaque de semi-conducteur (Silicium), qui transforment les photons incidents en charges électriques par effet optoélectrique (photovoltaïque). Chaque pixel constitue une photodiode indépendante qui intègre la lumière incidente durant un intervalle de temps et la convertit en photocourant. Le photocourant, proportionnel à l'intensité de la lumière incidente, est emmagasiné séparément dans les capacités individuelles des photodiodes. Par une polarisation cyclique, la charge est transférée dans une ligne de stockage appelée ligne vidéo et conservée jusqu'à lecture.

Les PDA et les CCD standards, en silicium, sont sensibles dans la région spectrale allant de 350 à 1100 nm. Leur efficacité quantique est maximale à 750 nm, elle est d'environ 45-50%. La sensibilité et l'efficacité quantique de ces détecteurs peuvent être rehaussées dans l'UV jusqu'à 200 nm en appliquant des couches fluorescentes sur la surface active des détecteurs.

Tous les paramètres de détecteurs monocanaux s'appliquent aux détecteurs multicanaux. On y ajoute le temps d'intégration qui agit directement sur l'amplitude du signal mesuré. Dans les systèmes spectroscopiques, on mesure l'intensité spectrale en coups par seconde. Par exemple, si 100 coups ont été mesurés pendant une seconde, 200 coups sont mesurés pendant un temps d'intégration de 2 secondes. Le fait de doubler le temps d'intégration du signal lumineux améliore le rapport signal / bruit de 1.44 ($\sqrt{2}$) [Guide for spectroscopy 1994].

V.3.3.1. Barrette de photodiodes « PDA »

Une barrette PDA constitue un ensemble de diodes arrangées en ligne et qui réagissent indépendamment avec la lumière incidente. Par exemple, 1024 diodes peuvent être intégrées en une barrette de longueur standard de 25 mm (pixel=15x15 µm, avec un espacement 10 µm entre deux pixels) et de hauteur totale de 40 µm. Chacune des diodes inversement polarisée, par une tension de polarisation U_0 appliquée aux bornes de sa jonction **p-n**, est caractérisée par sa surface active A et sa capacité interne C_s (Figure 40A). La capacité interne de la diode est chargée lors de l'application de la tension de polarisation U_0 . Sous l'action d'une lumière d'intensité I , le photocourant engendré $I_{ph} = \rho AI$ (où ρ est l'efficacité quantique de la diode) se superpose avec le courant d'obscurité I_D . Le courant résultant décharge la capacité interne de la diode (désertion) durant le temps l'illumination ΔT par :

$$\Delta Q = \int_t^{t+\Delta t} (I_D + \rho AI) dt = C_s \Delta U$$

En cycle de lecture, chaque diode est alternativement connectée par l'intermédiaire d'un interrupteur multiplex de type MOS à la ligne d'alimentation (Figure 40B). La capacité interne de la diode est ainsi rechargée jusqu'à ce qu'elle atteigne sa tension de polarisation originale U_0 . L'impulsion de recharge $\Delta U = \Delta Q / C_s$, est transférée à ligne vidéo (ligne de stockage), qui est connectée à toutes les photodiodes. L'impulsion ΔU est égale au signal électrique nécessaire pour le rafraîchissement de la diode et elle est proportionnelle au photocourant produit par la charge accumulée dans la capacité interne de la diode. Ainsi, si le courant d'obscurité est soustrait, la mesure de ΔU donne le flux lumineux tombant sur la diode [Demtröder 1995]. La lecture de 1024 éléments ne dure environ que 13 ms.

Le temps d'intégration ΔT ne peut dépasser un certain seuil (1 ms en température ambiante) à cause de l'amplification du courant d'obscurité qui affaiblit le rapport signal/bruit. Dans ces conditions, la sensibilité de détection est limitée à 5000 photons/s/diode. Pour détecter de plus faibles puissances lumineuses, des temps d'intégration plus longs sont nécessaires. Le refroidissement thermoélectrique de PDA (< -40 C°) permet de prolonger le temps d'intégration jusqu'au l'ordre de la minute et d'améliorer, par conséquent, le rapport signal bruit.

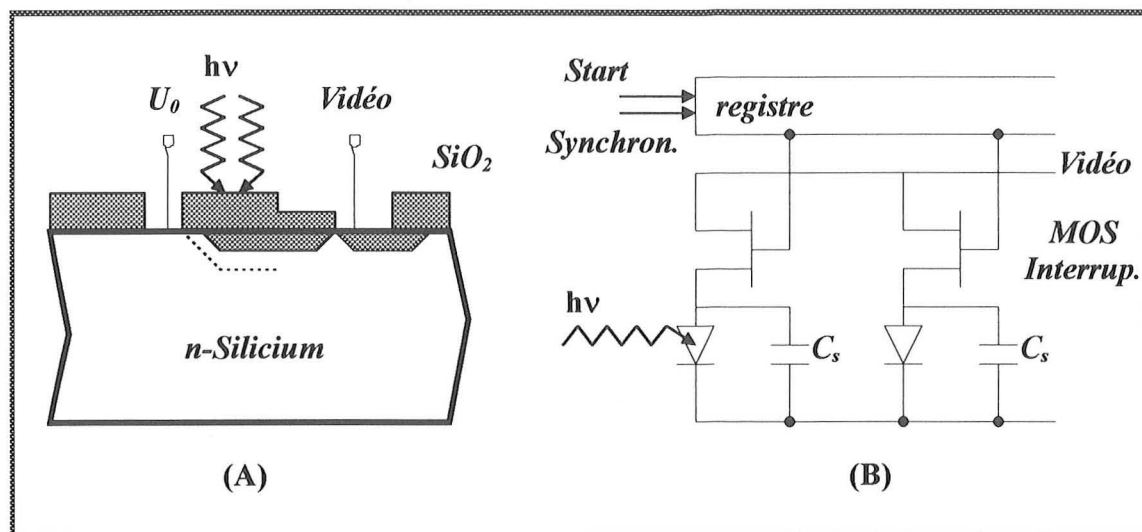


Figure 40 : Structure et diagramme électronique d'une diode de la barrette PDA

V.3.3.2. Batterie de détecteurs à transferts des charges « CCD »

Dans les systèmes spectroscopiques, les barrettes de photodiodes sont de plus en plus remplacées par des batteries à transferts de charges CCD. Une CCD constitue un dispositif, de faible dimension, composé de centaines de milliers d'éléments photosensibles déposés sous forme de matrice sur une plaque de semi-conducteur de silicium dopé (jonctions de type MOS). La lumière incidente génère des électrons et des trous, en nombre proportionnel à l'intensité lumineuse, dans les types **n** et **p** du semi-conducteur (Figure 41A). Les électrons ou les trous générés changent la charge des capacités MOS. Les charges accumulées sont ensuite transférées à la capacité MOS suivante par l'application d'une séquence de tension adaptée sur les électrodes des diodes (Figure 41B). Les charges électriques sont ainsi transférées d'une diode à la diode suivante dans la même colonne (de proche en proche, colonne par colonne) jusqu'aux éléments de stockage d'une ligne vidéo où un changement de tension ΔU est provoqué [Demtröder 1995]. Ainsi, les éléments photosensibles reprennent très rapidement leur travail d'accumulation pendant que la ligne vidéo se vide de son contenu par une jonction de sortie.

L'efficacité quantique des CCD dépend essentiellement du matériau utilisé dans la réalisation du substrat, elle peut atteindre 50%. L'efficacité est souvent supérieure à 10% entre 350 et 900 nm. Cette technologie présente de nombreux avantages par rapport aux PDA. La

séparation entre les canaux et le rapport signal / bruit des CCD sont meilleurs. Les pertes de charge d'un élément à l'autre peuvent être considérées comme négligeables. Le courant d'obscurité d'une CCD refroidie à l'azote liquide est inférieur à 10^{-2} électrons /seconde/diode. Ainsi, la sensibilité de détection est élevée et peut atteindre la sensibilité des PMT. Le champ dynamique des CCD peut couvrir cinq gammes de magnitude (gain variable). De plus, les CCD peuvent être divisées en plusieurs régions horizontales permettant ainsi la détection multispectrale simultanée avec visualisation en temps réel.

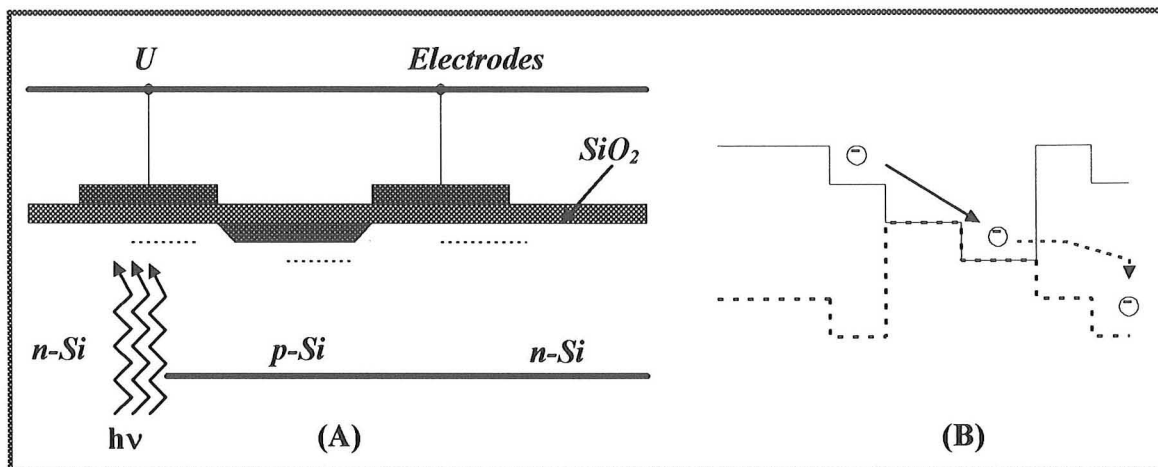


Figure 41 : Principe des batteries CCD. (A) Tension appliquée alternativement sur les électrodes (... négative ; --- positive). (B) Transfert de la charge générée par les photons à la diode suivante.

Si une PDA ou une CCD est placée dans le plan focal d'un spectrographe, l'étendue spectrale (coverage) détectée, simultanément, est donnée par :

$$\delta\lambda = (d\lambda/dx) \cdot L$$

où $d\lambda/dx$ est la dispersion linéaire du spectrographe et L est la largeur de la PDA ou de la CCD.

La résolution spectrale est :

$$\Delta\lambda = \delta\lambda/N$$

où N est le nombre de pixels dans une ligne.

V.3.3.3. Intensificateur à galette de microcanaux « CCD Intensifiée »

L'intensification de la lumière dans ce dispositif est réalisée par un multiplicateur d'électron placé devant une CCD (Figure 42). La transformation de la lumière en électrons se fait à l'aide d'une photocathode du matériau photoémissif, comme c'est le cas dans un PMT. Le faisceau d'électrons créés par la photocathode entre dans un multiplicateur tubulaire, appelé multiplicateur à galette de microcanaux (Micro Channel Plate, MCP). Il est constitué par un très grand nombre de tubes de verre ($2 \cdot 10^6$) assemblés de façon géométrique, dont les parois intérieures sont recouvertes d'une couche de matériaux à facteur d'émission secondaire élevé et faiblement conducteur. En appliquant un champ électrique intense entre les faces de la galette de microcanaux, on fait accélérer les électrons incidents dans les tubes. Lorsque les électrons frappent les parois des tubes, ils libèrent des électrons secondaires [Falcoz-Vigne 1992]. Les électrons multipliés et accélérés dans les tubes frappent un écran au phosphore, où ils sont transformés en photons. Les photons créés sont transmis par un faisceau de fibres optiques, jusqu'aux éléments photosensibles d'une CCD où ils induisent des charges électriques. Le gain de cet intensificateur peut atteindre $1,8 \cdot 10^4$ à une luminescence de $2 \cdot 10^{-5}$ lux.

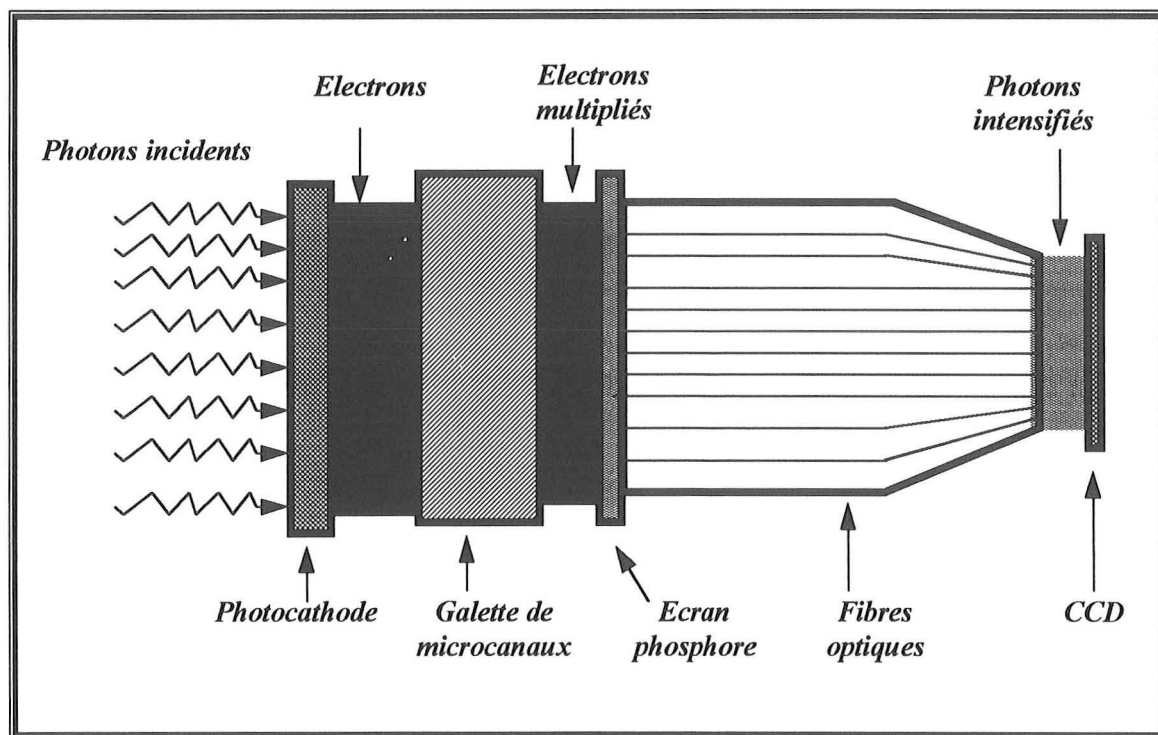


Figure 42 : Principe d'un intensificateur à galette de microcanaux

VI. SYSTEME EXPERIMENTAL

La fluorescence tissulaire peut être assimilée à une source lumineuse isotrope de très faible énergie. Cette source est caractérisée par un spectre continu dont la densité photonique est répartie en fonction de la longueur d'onde dans la région spectrale allant du proche ultra violet au proche infrarouge. Ainsi, tout élément de la chaîne d'acquisition spectroscopique doit avoir des caractéristiques optimales (transmission des fibres, efficacité du réseau, sensibilité du photodétecteur,...) dans cette région spectrale.

D'autre part, comme la majorité des mesures expérimentales sont réalisées à l'occasion d'une exploration endoscopique, le capteur à fibres optiques employé pour la détection de la fluorescence tissulaire doit être conçu pour passer dans le canal de biopsie de l'endoscope souple ou rigide. De plus, le système expérimental doit respecter les normes ergonomiques d'un matériel hospitalier. Il doit être compact et mobile.

VI.1. SCHEMA DU SYSTEME EXPERIMENTAL

La figure 41 montre le schéma détaillé du système expérimental que nous avons réalisé pour la mesure de la fluorescence tissulaire. Comme tout système destiné à l'analyse spectrale de la fluorescence *in vivo*, il comporte trois unités indispensables : la source d'excitation lumineuse, le capteur à fibres optiques et l'analyseur optique multicanal.

Chaque unité de ce système est composée d'éléments plus ou moins dépendants de la longueur d'onde. Certains éléments déjà disponibles au laboratoire ont été adaptés à la mesure de la fluorescence. Les autres éléments ont été choisis en fonction de leur performance et leur coût.

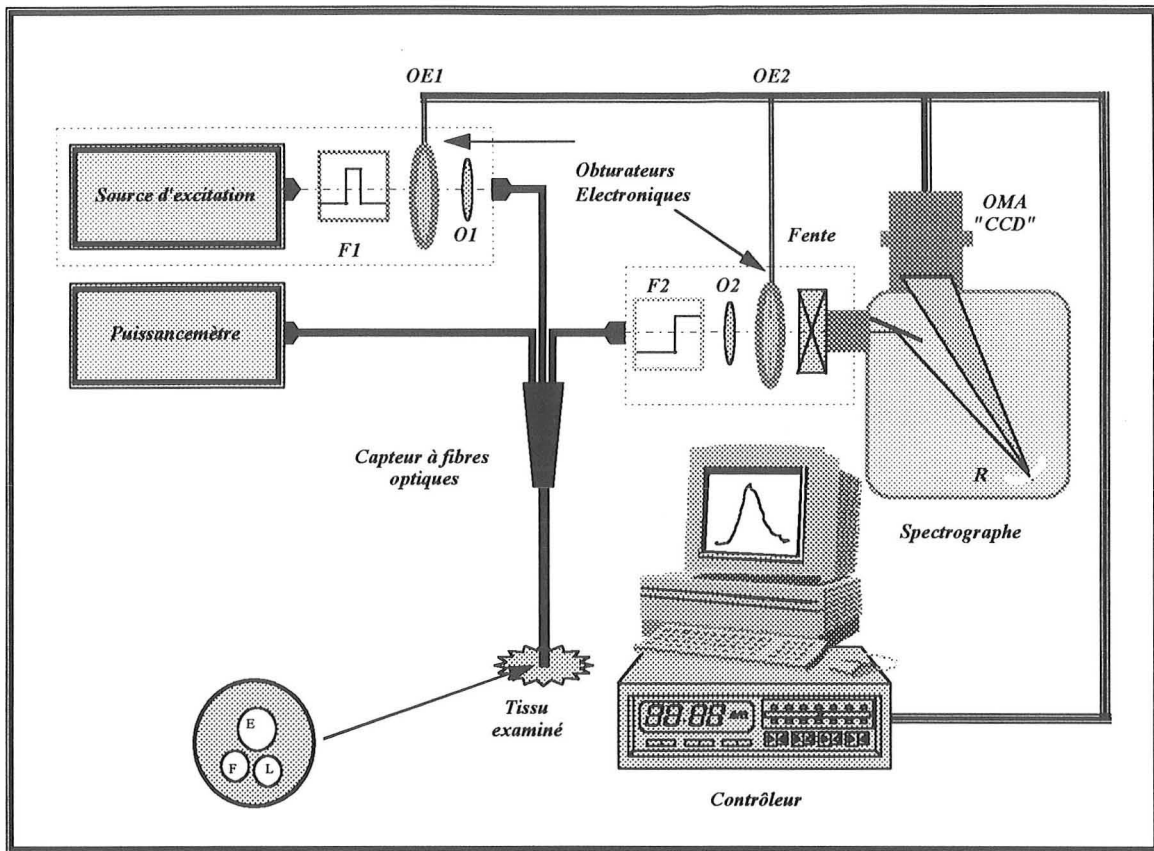


Figure 43 : Schéma du système expérimental

Comme le montre le schéma, la lumière d'excitation traverse un filtre interférentiel F_1 et un obturateur électronique OE_1 synchronisé avec l'obturateur OE_2 de l'analyseur optique multicanal. En sortie de l'obturateur d'excitation, en position d'ouverture, la lumière monochromatique est focalisée au moyen d'un objectif O_1 et est injectée dans la voie E d'un capteur à trois fibres optiques. Elle est ainsi acheminée jusqu'au tissu à examiner. Une partie de la fluorescence émise simultanément à l'excitation est guidée par la voie F du capteur et traverse un filtre passe-haut F_2 où la lumière d'excitation est fortement atténuée. La lumière transmise (lumière de fluorescence et une partie de la lumière d'excitation) est ensuite focalisée au moyen d'un objectif O_2 sur la fente d'entrée du spectrographe, à travers l'obturateur OE_2 . La fluorescence entrant dans le spectrographe est ainsi réfléchi sur le réseau de diffraction concave R . Elle est ensuite dispersée et projetée sur un plan focal d'une étendue équivalente à la largeur active de la CCD. Par l'intermédiaire d'un contrôleur et d'une interface, le logiciel installé sur le micro-ordinateur permet de gérer le temps d'intégration (le temps d'ouverture des obturateurs électroniques) de la lumière de fluorescence projetée sur la CCD, ainsi que le traitement du signal et l'affichage.

Simultanément à l'acquisition de fluorescence, une partie de la lumière d'excitation rétrodiffusée est guidée par la voie L du capteur et mesurée par un puissance-mètre calibré en énergie et en longueur d'onde. Cette mesure de puissance permet de calibrer la réponse énergétique de la CCD.

VI.2. SOURCES D'EXCITATION LUMINEUSE

La première démarche que nous avons réalisée lors du choix de la source d'excitation était de déterminer les longueurs d'onde qui permettaient une distinction maximale entre les tissus sains et les tissus pathologiques vis à vis des caractéristiques de fluorescence. La monochromaticité de la lumière était également un critère que nous avons pris en considération. En effet, puisque les spectres d'absorption des fluorophores endogènes et exogènes sont de structures larges, la monochromaticité de la lumière d'excitation ne constitue pas un critère crucial. Néanmoins, la largeur maximale à mi-hauteur de la raie lumineuse ne doit pas dépasser certaine limite pour pouvoir séparer la lumière d'excitation de la lumière de fluorescence. Ainsi, la largeur à mi-hauteur doit être inférieure au décalage naturel du spectre de fluorescence par rapport à la raie d'une lumière d'excitation monochromatique comme le laser.

La puissance de la lumière d'excitation était le troisième critère du choix. Cette puissance est déterminée en fonction du rendement quantique de fluorescence, du phénomène de photoblanchiment, de l'efficacité du réseau de diffraction, de la sensibilité du détecteur et du temps d'intégration. L'idée était de choisir une puissance lumineuse à laquelle l'intensité de fluorescence en sortie du spectrographe soit supérieure au bruit de fond du photodétecteur et inférieure à l'intensité qui provoque une saturation ou un dépassement du champ dynamique linéaire du photodétecteur. Vu la sensibilité des CCD refroidies à l'azote liquide et leur faible bruit interne (0,5 électron/pixel/heure), le signal de fluorescence peut être intégré sur un large intervalle de temps. Ainsi, de faibles puissances d'excitation sont suffisantes pour avoir un bon rapport signal/bruit. Si on privilégie la rapidité de l'acquisition (< 1 s) et le débit du flux lumineux à la sortie du spectrographe à la résolution spectrale, on peut exciter le tissu à de faibles puissances lumineuses (< 1 mW). Dans ce cas, on utilise des fentes d'entrée relativement larges (> 100 μ m). Si on s'intéresse à la fois, à la rapidité, au débit du flux lumineux et à la résolution spectrale, on doit utiliser des puissances plus

importantes ($\cong 10$ mW) avec une fente d'entrée plus faible (par exemple 50 μm). Ainsi, la meilleure approche consistait à trouver un compromis entre ces différents paramètres. Dans ce travail, nous avons empiriquement déterminé ces paramètres comme suit :

- un intervalle de temps d'acquisition compris entre 0,1 et 2 secondes ;
- deux fentes d'entrée de 50 et 100 μm ;
- une gamme de puissances d'excitation en sortie de fibre optique comprise entre 0,5 et 10 mW.

Avec ce choix, l'énergie maximale que reçoit le tissu est de l'ordre de 1-2 mJ. A cette énergie, le phénomène de photoblanchiment peut être négligé. D'autre part, comme le spectre de la fluorescence tissulaire est assez large, l'utilisation d'une fente de 100 μm n'altère pas significativement la résolution spectrale.

VI.2.1. choix de la longueur d'onde d'excitation

Les critères qui déterminent le choix de la longueur d'onde d'excitation dépendent du signal de fluorescence à analyser. On distingue deux cas :

La fluorescence induite : la longueur d'onde d'excitation correspond au maximum d'absorption du fluorophore exogène. Dans le présent travail, pour étudier la pharmacocinétique de la mTHPC et de l'HpD, respectivement excitable à 415 ± 5 nm et 405 ± 5 nm, nous avons utilisé la longueur d'onde d'excitation 410 ± 5 nm.

L'autofluorescence tissulaire : la longueur d'onde d'excitation a été choisie en fonction des critères suivants :

- spectres d'absorption et de fluorescence des fluorophores endogènes à intérêt diagnostique ;
- profondeur de pénétration de la lumière d'excitation ;
- influence de l'environnement tissulaire sur le signal de fluorescence.

Pour réaliser un choix judicieux de la longueur d'onde d'excitation, nous devons trouver un compromis entre la profondeur de pénétration de la lumière d'excitation, l'intensité de fluorescence émise et la préservation des caractéristiques spectrales de fluorescence vis à vis de la réabsorption des chromophores tissulaires et notamment de l'oxyhémoglobine.

Pour ce faire, nous avons mesuré en solutions les spectres d'absorption et de fluorescence de certains fluorophores à intérêt diagnostique et de l'oxyhémoglobine. La NADH « α -Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite » (N-6879, SIGMA) et la flavine mononucléotide « FMN riboflavin-5'-phosphate » (F-8399, SIGMA) ont été obtenues sous forme de poudre. Elles sont dissoutes et diluées dans du PBS « Phosphate Buffered Saline » (BIO-WHITTAKER). Le collagène de type I (C-7661, SIGMA) également obtenue sous forme de lyophilisé, est dissout dans une solution d'acide acétique 0,1M (1mg/ml) et est dilué dans du PBS. L'HpD (Queen Elizabeth Hospital, Australie) "abusivement" utilisée pour simuler l'absorption et l'émission de fluorescence des porphyrines endogènes a été diluée dans du PBS à partir d'une solution à 5mg/ml. L'oxyhémoglobine est obtenue à partir du sang humain.

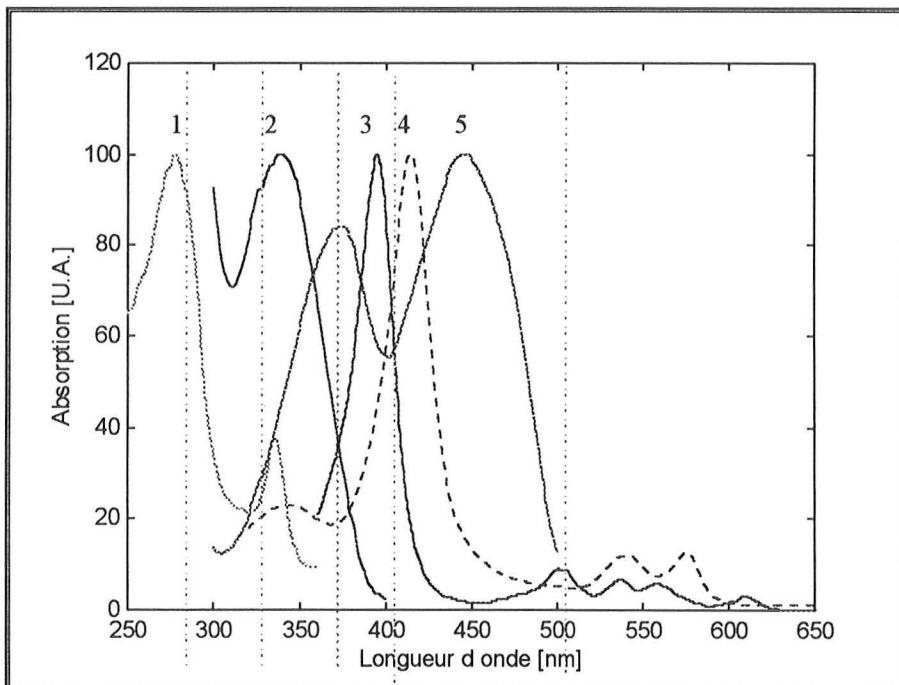


Figure 44 : Spectre d'absorption de fluorophores endogènes, de l'HpD et de l'oxyhémoglobine. 1 : collagène ; 2 : NADH ; 3: HpD ; 4: oxyhémoglobine ; 5: flavine

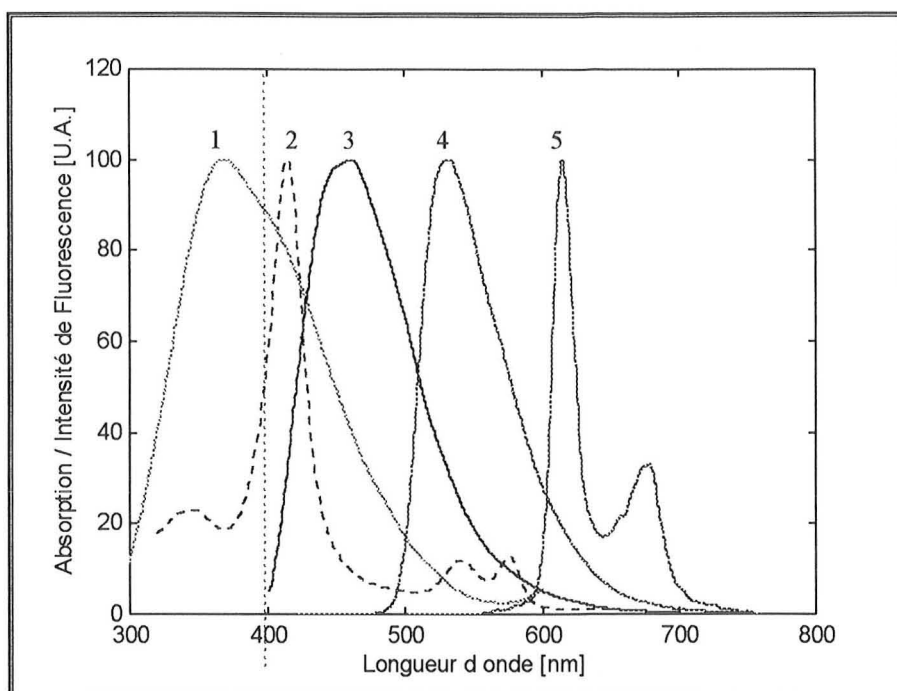


Figure 45 : Spectres de fluorescence de fluorophores endogènes et spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine. 1 : collagène, 2: oxyhémoglobine, 3: NADH, 4: flavine, 5 : HpD

Les mesures des spectres d'absorption et de fluorescence ont été réalisés respectivement, au moyen d'un spectrophotomètre Lambda Bio (U.V./Visible, Perkin Elmer) et d'un spectromètre (Luminescence Spectromètre LS50B, Perkin Elmer). Ils sont mesurés à leur maximum d'excitation (collagène : 280 nm ; NADH : 340 nm ; flavine : 440 nm, HpD : 405 nm). Les spectres d'absorption et de fluorescence, comparés au spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine, sont présentés sur les figures 44 et 45.

Les longueurs d'ondes d'excitation inférieures à 300 nm ont été exclues en raison de la forte atténuation dans les fibres optiques et de la faible profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus (5-40 μm).

Pour les longueurs d'ondes d'excitation supérieures à 500 nm, seules les porphyrines endogènes sont excitables ; le signal de fluorescence est trop faible.

Ainsi, la longueur d'onde d'excitation doit se situer entre 300 et 500 nm. Dans cette fenêtre spectrale les longueurs d'onde qui excitent un maximum de fluorophores sont situées approximativement à 340, 370, 400, 410 et 420 nm. A 340 nm, le fluorophore le plus excité

est le NADH (excitable à 100%). Le collagène et les flavines sont quant à eux moins excités (excitables à 40%). Si on utilise cette longueur d'onde d'excitation, les porphyrines ne seront pas excitées. De plus, une grande partie du spectre de fluorescence du NADH coïnciderait avec le spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine. Dans ce cas, on ne peut pas distinguer si les différences spectrales entre tissus sains et tissus pathologiques sont dues aux changements des caractéristiques de fluorescence ou à la réabsorption de l'oxyhémoglobine. De plus, cette longueur d'onde n'explore qu'une couche très superficielle du tissu (< 100 μm).

La longueur d'onde d'excitation de 370 nm paraît plus adéquate que 340 nm, car elle excite les flavines à plus de 80%, et les porphyrines et le NADH à environ 40%. Cependant, à cette longueur d'onde, une partie de la fluorescence du NADH est également réabsorbée par l'oxyhémoglobine. Au voisinage de cette longueur d'onde le rendement relatif de la fluorescence des flavines et des porphyrines par rapport au NADH, est respectivement de 16 : 1 et 0,9 : 1.

Vu les longueurs d'onde d'émission des flavines et des porphyrines, les longueurs d'onde d'excitation de 400, 410 et 420 nm sont particulièrement intéressantes, car elles permettent de s'affranchir de la réabsorption de l'oxyhémoglobine. Les caractéristiques spectrales de la fluorescence sont quasi intactes, sauf vers 540 et 580 nm. Cependant, la lumière d'excitation sera plus absorbée par les tissus vascularisés que par les tissus non vascularisés. La conséquence de cette absorption sera une diminution de l'intensité de fluorescence, mais sans modifications majeures de la structure spectrale. Comme l'objectif de ce travail était de caractériser les tissus par leur fluorescence, nous avons privilégié l'utilisation d'une longueur d'onde pour laquelle les caractéristiques spectrales de fluorescence restent inchangées.

Ainsi, dans la majorité des applications de diagnostic, nous avons choisi la longueur d'onde d'excitation de 410 ± 5 nm. Dans certaines applications, nous avons utilisé la longueur d'onde de 364 nm afin d'induire la fluorescence du NADH.

Trois sources lumineuses ont été utilisées pour obtenir ces longueurs d'onde d'excitation : un laser Krypton, un laser Argon et une lampe Xénon filtrée.

VI.2.2. Laser Krypton

C'est un laser Spectra-Physics modèle 2020 fonctionnant en mode continu (cw). Les raies principales de 406 et 413 nm sont sélectionnées par un filtrage passe bas < 415 nm de la lumière laser. Ce filtrage permet d'éliminer toutes les raies de plasma dues à la fluorescence du tube laser qui sont plus intenses que la fluorescence tissulaire. Les longueurs d'onde émises par ce laser correspondent au maximum d'excitation de l'HpD et de la mTHPC. L'élastine, les flavines et les porphyrines endogènes sont également excitables à ces longueurs d'onde. La puissance lumineuse de ce laser, en sortie de fibre optique, a été maintenue à 10 mW, ce qui a permis de diminuer considérablement le temps d'intégration (0,1 s) d'un spectre de fluorescence saisi *in vivo*. A cette puissance, le laser est relativement stable ; les variations de la puissance peuvent être négligées.

VI.2.3. Laser Argon

Le laser Argon fonctionnant en mode continu (Spectra-Physics, 2030) émet plusieurs raies dans l'ultraviolet et le visible (275, 305, 334, 351, **364**, 458, 477, 488, 496, 514 et 529 nm). La raie de 364 nm a été sélectionnée en plaçant des miroirs appropriés dans la cavité résonnante du laser (avant UV2030-G3873-017, arrière UV2030-G3802-028). La fluorescence et les raies de plasma du tube laser ont été éliminés au moyen d'un filtre passe-bande 360 ± 25 nm (Oriel, 59810) placé dans le système optique entre la sortie du laser et la fibre optique. La longueur d'onde de 364 nm excite essentiellement le NADH, mais également les flavines, l'élastine et les porphyrines endogènes. La puissance lumineuse de ce laser, en sortie de fibre optique, a été maintenue à 1 mW.

VI.2.4. Lampe Xénon filtrée

C'est une source Xénon modèle 487 Karl Storz dont la puissance visuelle de la lampe (CX-2300, Cermax) est de 300 W. Par rapport aux lampes à arc de mercure, la radiance de cette lampe dans l'ultraviolet et le visible n'est pas limitée à des raies précises. La distribution spectrale homogène de la radiance permet de choisir à volonté la longueur d'onde d'excitation (Figure 46). L'émission lumineuse dans l'infrarouge a été supprimée à l'aide d'un filtre calorique liquide contenant de l'eau (6117, Oriel). Les longueurs d'onde de 400 et

410 nm ont été sélectionnées par l'intermédiaire de filtres interférentiels ($\varnothing=52$ mm ; 59280, 59285, Oriol) de bande passante de 9-10 nm et d'une transmission minimale au pic de 35%. Avec cette bande passante, la lumière d'excitation peut facilement être séparée de la fluorescence. La lumière à la sortie du filtre est focalisée par une lentille plan-convexe en silice (39322, $\varnothing=38,1$ mm, Focale=38 mm, Oriol) et injectée dans la fibre optique (Figure 47).

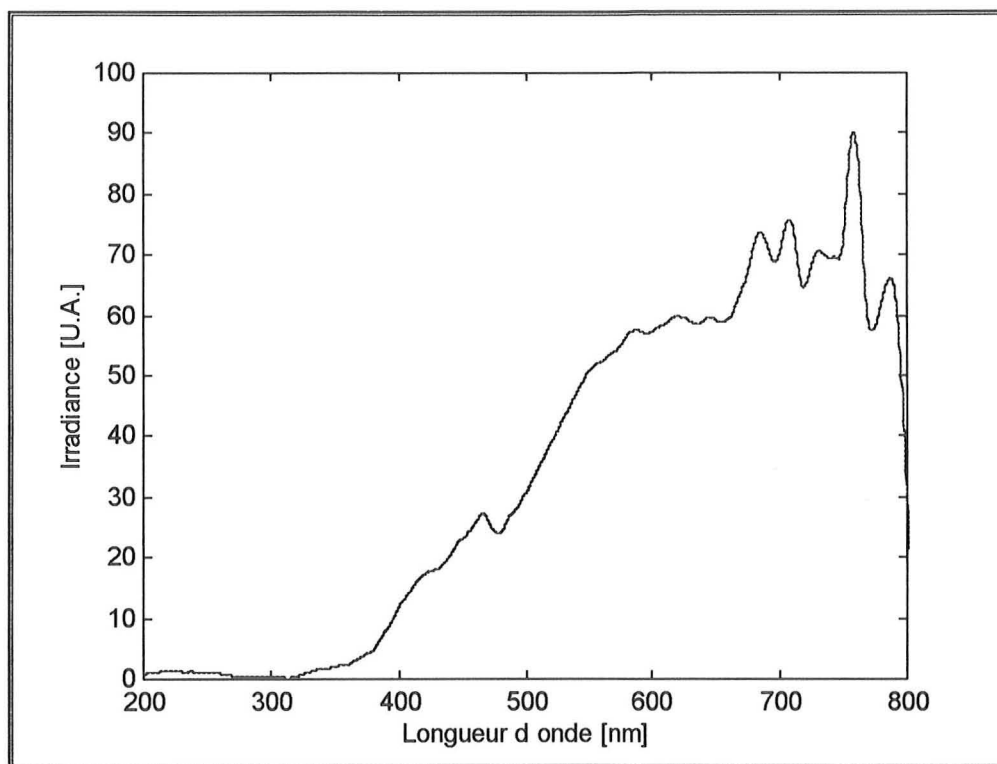


Figure 46 : Distribution spectrale UV - Visible de la lampe Xénon.

Un système mécanique de "rails" a été utilisé pour assurer la fixation et l'alignement des différents éléments optiques. Un positionneur à platines de translation avec 3 degrés de liberté (X, Y et Z), a permis d'optimiser l'injection de la lumière dans la fibre. La puissance lumineuse en sortie de fibre a été fixée à 1 mW.

L'avantage de l'utilisation d'une telle source d'excitation réside dans la possibilité de sélectionner la longueur d'onde nécessaire, pour des applications précises, simplement en plaçant un filtre interférentiel approprié dans le montage optique. Nous disposons d'un jeu de filtres permettant d'exciter un large éventail de fluorophores (350, 400, 410, 420, 480, 550 nm). De plus, les sources de lumière blanche sont beaucoup moins coûteuses que les

lasers. Grâce à leur petit volume, ces sources sont facilement intégrables dans des systèmes mobiles.

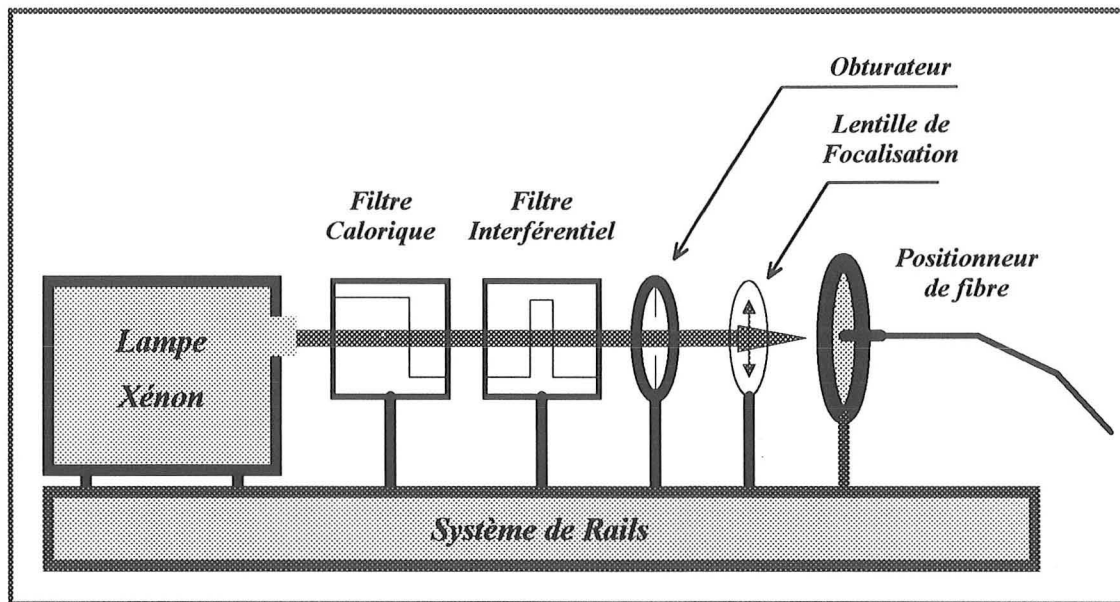


Figure 47 : Montage optique de la source d'excitation avec une lampe Xénon.

VI.3. DETECTION

Ce titre englobe l'ensemble des éléments passifs et actifs qui interviennent dans la détection de la fluorescence : capteur à fibres optiques, filtres passe-haut, spectrographe et CCD.

VI.3.1. Capteur à fibres optiques

D'après le principe de détection de la fluorescence tissulaire, le capteur à fibres optiques doit permettre de guider la lumière d'excitation vers le tissu et de récupérer une partie du signal de fluorescence. L'utilisation clinique du capteur nous a imposé certaines contraintes dans le choix des fibres optiques. En effet, le capteur devait avoir les dimensions les plus petites possibles. Il devait également être conçu pour aller dans le canal de biopsie d'un endoscope souple ou rigide, et assurer une bonne transmission lumineuse dans l'UV et dans le visible. La flexibilité du capteur était aussi un critère à respecter, car il devait s'adapter à toutes les courbures que le clinicien peut envisager au cours d'un examen endoscopique.

VI.3.1.1. Conception

L'utilisation d'un capteur à une ou à deux fibres optiques peut remplir les conditions nécessaires pour détecter le signal de fluorescence. Mais, la mesure de la fluorescence par spectroscopie ne permet pas une évaluation absolue de l'intensité spectrale. Celle-ci est dépendante de plusieurs paramètres peu commodes à déterminer. Une grande partie de ces paramètres est inhérente à l'instrumentation utilisée. Etant donné que la différenciation entre tissus sains et tissus pathologiques se fonde sur une étude comparative des spectres de ces tissus, une normalisation des données spectrales par rapport à un standard est donc nécessaire.

Comme nous l'avons présenté dans le paragraphe V.1.1.7, le flux lumineux en sortie du spectrographe est proportionnel à la largeur et à la hauteur des fentes d'entrée et de sortie, à la surface illuminée du réseau et à son efficacité spectrale. D'autre part, l'intensité spectrale mesurée par le détecteur multicanal dépend de l'efficacité quantique, du temps d'intégration et du champ dynamique (linéarité du détecteur en fonction de l'intensité incidente).

Avec la configuration de l'analyseur optique multicanal, la fente de sortie du spectrographe est fixe, c'est l'équivalent de la taille d'un pixel de la CCD. L'efficacité spectrale du réseau et l'efficacité quantique de la CCD sont des paramètres qui dépendent de la longueur d'onde, mais on peut les linéariser par des facteurs de correction. En raison de l'instabilité de certaines composantes des circuits électroniques d'amplification associés à la CCD, la réponse photovoltaïque est parfois non proportionnelle au flux lumineux incident, notamment pour des temps d'intégration courts ($< 0,5$ s). C'est un événement aléatoire, elle est donc incontrôlable. En fonction de l'intensité du signal de fluorescence mesurée et afin d'obtenir un bon rapport signal/bruit, nous étions souvent amenés à régler certains paramètres instrumentaux. Ainsi, dans les meilleures conditions de mesure, l'intensité de fluorescence I sera fonction de trois paramètres réglables qui sont :

- largeur de la fente d'entrée w_{ent} ;
- la hauteur de la fente d'entrée h_{ent} ;
- le temps intégration T_{int} .

Elle est également fonction d'un paramètre aléatoire lié au champ dynamique et à la non linéarité de l'amplificateur électronique, ainsi qu'aux conditions de refroidissement p :

$$I = f(w_{ent}, h_{ent}, T_{int}, p)$$

Pour s'affranchir de la dépendance de l'intensité de fluorescence de ces paramètres, nous avons lié l'intensité spectrale à une référence indépendante. L'exploitation de la rétrodiffusion lumineuse peut répondre à ce besoin. En effet, si le filtre passe haut placé à l'entrée du spectrographe transmet une faible quantité de lumière d'excitation rétrodiffusée vers le réseau de diffraction, cette lumière sera dispersée et représentée par une raie dans le spectre. Si la puissance de cette lumière est mesurée, parallèlement, par un détecteur calibré comme le puissancemètre, on aura constamment un standard qui tient compte des conditions de mesure. L'intensité spectrale de la lumière d'excitation rétrodiffusée variera en fonction des paramètres spectroscopiques, mais sa grandeur physique réelle reste constante. Ainsi, en linéarisant la réponse spectrale de l'instrument spectroscopique, la mesure de la puissance lumineuse à la longueur d'onde d'excitation permettrait d'évaluer la puissance lumineuse sur toute l'étendue spectrale.

La mise en œuvre de ce principe de standardisation nécessite un capteur symétrique permettant de guider les mêmes signaux optiques dans deux voies distinctes ; d'où l'idée de concevoir un capteur à trois fibres optiques. La fibre excitatrice sera entourée de deux fibres réceptrices de même diamètre.

Avec cette configuration les paramètres spectroscopiques peuvent être adaptés en fonction de l'intensité du signal de fluorescence mesurée sans que la valeur réelle de l'intensité soit modifiée. Tous les spectres mesurés par le système spectroscopique seront indépendants des paramètres de celui-ci, car ils seront normalisés. Le seul paramètre influençant les mesures sera la sensibilité de la cellule photovoltaïque du puissancemètre à la longueur d'onde d'excitation. Ainsi, pour la gamme de puissances d'excitation choisie, la puissance rétrodiffusée est faible. Par conséquent, le puissancemètre peut être réglé à un seul champ dynamique linéaire et à une seule longueur d'onde.

Dans certains endoscopes le canal de biopsie est de faible diamètre. L'utilisation d'un capteur à trois fibres optiques est parfois encombrant. Un capteur monofibre serait mieux adapté à la réalisation des mesures *via* ces endoscopes. Pour s'affranchir des difficultés liées au couplage optique entre les différentes composantes d'un montage monofibre et des pertes occasionnées par ce couplage, nous avons choisi un montage à coupleur 50/50. Certes, la lumière de fluorescence et la lumière d'excitation sont atténuées de 50% dans les deux sens de propagation, cependant c'est un ratio d'affaiblissement constant. Par contre, les pertes de couplage dans un montage composé de miroirs et de lentilles sont peu commodes à déterminer. Elles sont parfois supérieures à 50%. Avec un coupleur passif 50/50, on peut obtenir les mêmes avantages d'un capteur monofibre, concernant l'intensité de fluorescence recueillie, tout en contrôlant les pertes.

Ce capteur peut être destiné à la mesure de la fluorescence induite car en spectroscopie, la normalisation des spectres de fluorescence induite est plus simple que les spectres de l'autofluorescence. En effet, si le spectre de l'autofluorescence est mesuré avant l'injection du photosensibilisant, celui-ci peut servir comme référence. Ainsi, la fluorescence induite, qui se superpose à l'autofluorescence tissulaire, peut être facilement séparée. Ceci constitue la normalisation par rapport à l'autofluorescence. Dans le cas où on ne peut pas réaliser une mesure spectrale de l'autofluorescence préalable à l'injection, il suffit de rapporter la fluorescence induite à l'autofluorescence.

D'autre part, on peut mesurer l'autofluorescence avec un photodétecteur monocanal (PMT ou APD). Dans ce cas, l'intensité de l'autofluorescence à une longueur d'onde définie sera mesurée par un détecteur calibré en unités standard. Par conséquent, la normalisation ne sera plus nécessaire.

VI.3.1.2. Choix des fibres optiques

Parmi les différents types de fibres optiques, les fibres multimodes à saut d'indice sont les plus adaptées à la mesure de la fluorescence tissulaire. Elles offrent le meilleur rapport qualité/prix pour notre application. L'injection de la lumière d'excitation dans ces fibres est plus commode par rapport aux fibres multimodes à gradient d'indice ou monomodes à saut d'indice. Pour une même ouverture numérique, la puissance guidée par une fibre multimode

à saut d'indice est deux fois supérieure à celle guidée par une fibre à gradient d'indice. Par rapport aux fibres monomodes, les fibres multimodes à saut d'indice présentent des courbes de transmission lumineuse quasi linéaire sur une large étendue spectrale. Notre choix s'est porté sur une fibre multimode à saut d'indice silice/silice de type HCG (SEDI, France). Les caractéristiques de cette fibre optique sont les suivantes :

- cœur en silice pur ;
- cladding en silice dopé ;
- gaine primaire en polymère ;
- gaine secondaire (revêtement extérieur) en tefzel clair ;
- ouverture numérique de 0,22.

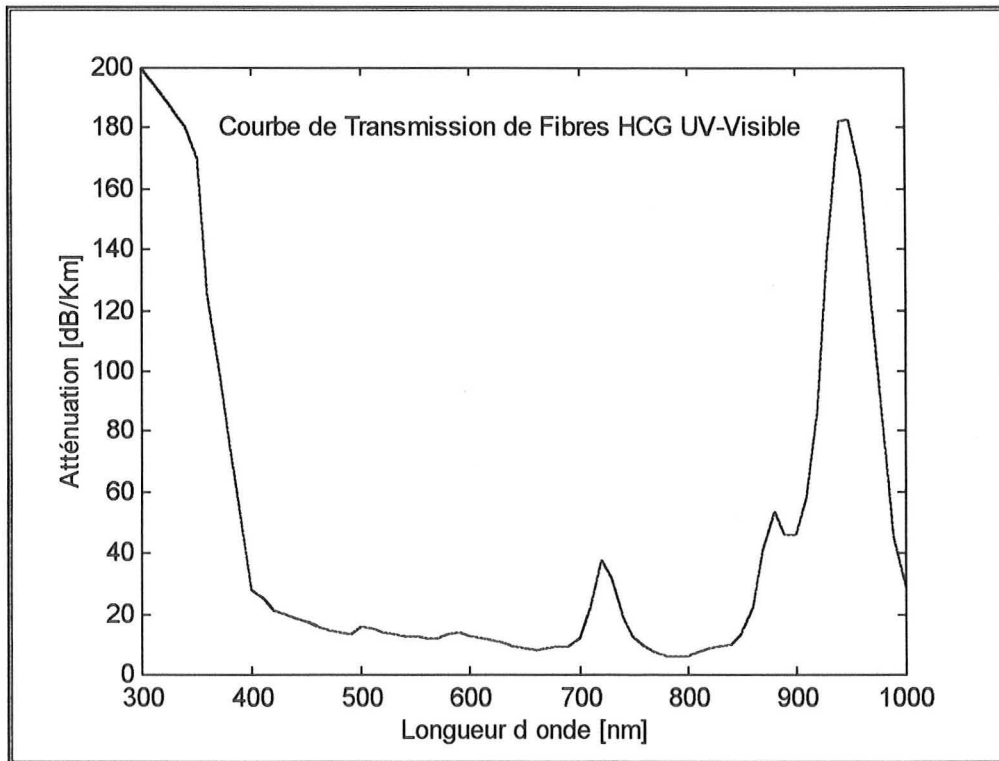


Figure 48 : Courbe de transmission des fibres HCG UV-visible à saut d'indice.

Les fibres HCG sont prévus pour une transmission optimale de la lumière du proche ultraviolet au proche infrarouge (Figure 48). Cette étendue spectrale correspond au spectre de fluorescence des tissus. Les pertes par atténuation linéique de la fluorescence sont relativement faibles. A titre d'exemple, l'affaiblissement dans la fibre est de 27,4 dB/Km à 400 nm, 16,1 dB/Km à 500 nm et 12,5 dB/Km à 600 nm. Ainsi, pour une fibre de 6 m de

longueur, correspondant à la longueur du capteur que nous avons réalisé, les puissances transmises en sortie de fibre pour les longueurs d'onde précédentes citées sont respectivement, de 0,97, 0,98 et 0,99 de la puissance initiale.

Ce type de fibres est recommandé pour des applications nécessitant une grande stabilité. Le faisceau en sortie de fibre est faiblement divergent et donc la densité lumineuse est importante. Le revêtement en polymère dur renforce la fibre et lui confère une très grande résistance mécanique. Cette résistance annule tous les risques de micro-fissures latérales lorsque la fibre est soumise à de petits rayons de courbure. Ce revêtement protège également le Cladding en silice dopée. Le choix du diamètre de cœur pour ces fibres pose parfois un problème d'arbitrage entre la flexibilité et la puissance transmise. En effet, plus le diamètre de cœur est gros, plus la puissance transmise est importante, mais moins la fibre est flexible. Pour un diamètre $\leq 550 \mu\text{m}$, ces fibres sont suffisamment flexibles dans notre application [SEDI, France].

VI.3.1.2.1. Capteur à trois fibres optiques

Pour réaliser ce capteur nous avons choisi une fibre de diamètre de cœur de $550 \mu\text{m}$ (HCG-0550T-08, SEDI) comme fibre excitatrice et deux fibres de diamètre de cœur de $200 \mu\text{m}$ (HCG-M0200T-08, SEDI) comme fibres réceptrices. Ces deux fibres permettent de récupérer une partie du signal de fluorescence et une partie de la lumière d'excitation rétrodiffusée. Le choix des diamètres des fibres est effectué de manière à avoir une bonne flexibilité et assurer une bonne transmission lumineuse.

Les trois fibres composant le capteur sont regroupées, sur trois mètres, dans une gaine de protection flexible (souplesse en polypropylène) de diamètre externe de 2,2 mm (Figure 49). A l'extrémité de cette gaine, les trois fibres assemblées sont introduites dans un tube rigide de 12 mm de longueur et de 2,2 mm de diamètre. Les extrémités des trois fibres sont maintenues sur le même plan et disposées en triangle. A l'autre extrémité, les trois fibres indépendantes sont protégées chacune sur une longueur de 3 m supplémentaires et sont munies de connecteurs SMA à saphir (905/512, SEDI, France), ce qui permet leur couplage respectif à la source d'excitation lumineuse, au spectrographe et au puissance-mètre. De plus,

ce capteur peut être stérilisé de la même manière qu'un endoscope classique. Ainsi, il peut être réutilisé sans risque d'infection.

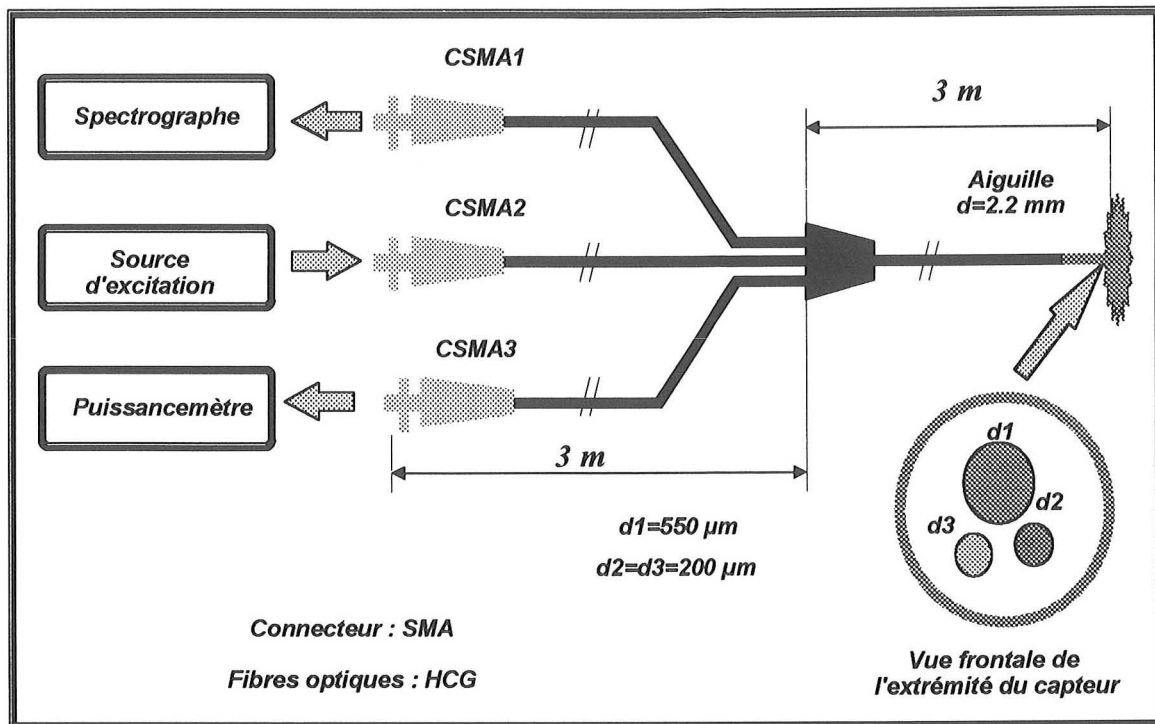


Figure 49 : Schéma du capteur à trois fibres optiques.
 $d1$: fibre excitatrice ; $d2$ et $d3$: fibres réceptrices

VI.3.1.2.2. Capteur monofibre à couplage 50/50

Ce capteur a été réalisé à partir d'une fibre de diamètre de cœur de $550 \mu\text{m}$ (HCG-0550T-08, SEDI) et d'un coupleur 1×2 HCG 50/50 de 3 m d'entrée (Figure 50). La longueur totale du capteur est de 5 m. Son diamètre externe est de $750 \pm 30 \mu\text{m}$. Les deux connecteurs permettant le couplage à la source d'excitation et au spectrographe sont de type SMA (905, SEDI). Les pertes dans le coupleur et les connecteurs sont respectivement d'environ 5 dB et 3,1 dB. Le capteur réalisé ainsi, assure une haute stabilité de transmission de la lumière. De plus, il est compact, robuste et bien adapté aux applications endoscopiques. Cependant, les puissances transmises *via* ce capteur ne doivent pas dépasser l'ordre d'une dizaine de milliwatt ; c'est la gamme des puissances employées dans la détection de la fluorescence par spectroscopie.

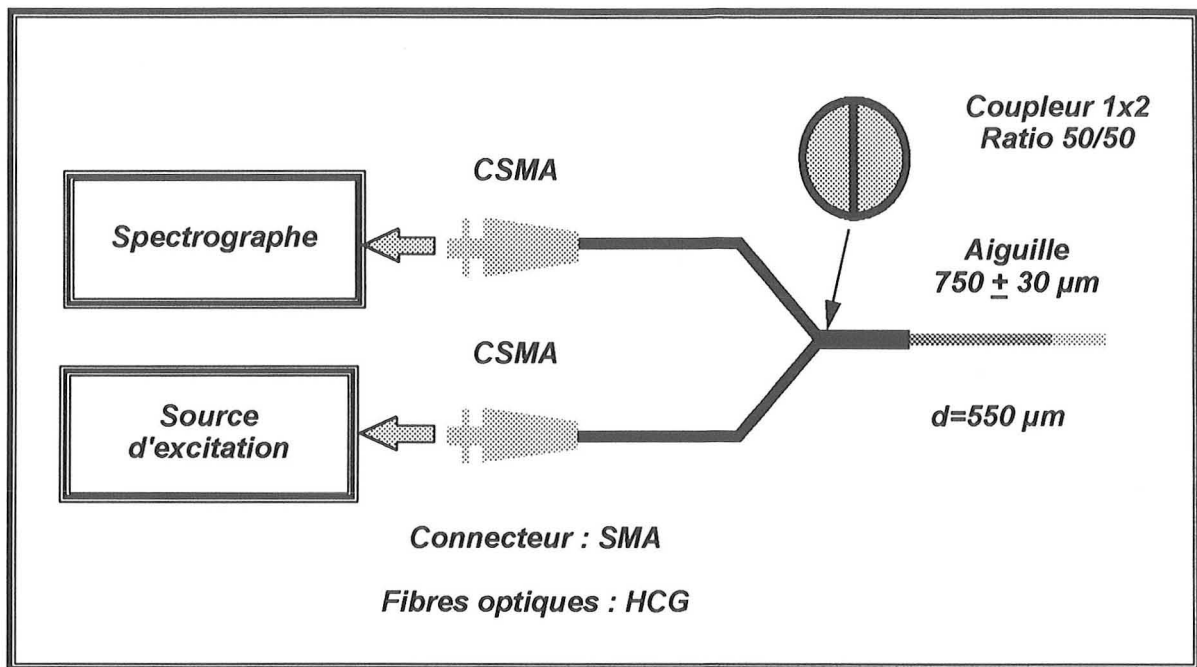


Figure 50 : Schéma du capteur à coupleur optique 50/50.

VI.3.1.3. Influence de la géométrie du capteur sur l'intensité spectrale

Trois facteurs liés à la géométrie du capteur peuvent être distingués :

- le diamètre de la fibre excitatrice ;
- le diamètre de la fibre réceptrice ;
- le positionnement de la fibre réceptrice par rapport à l'axe d'incidence de la lumière d'excitation (fibre excitatrice).

Sachant qu'un faisceau lumineux étroit pénètre plus profondément dans les tissus qu'un faisceau large, le fait d'élargir la géométrie d'excitation a pour conséquence d'élargir la zone tissulaire explorée et d'étaler les isodoses de l'énergie lumineuse dans le volume tissulaire. Toutefois, la densité lumineuse reste maximale autour de l'axe d'incidence [Jacques 1992]. En considérant que la distribution spatiale des fluorophores dans le tissu est uniforme, le nombre des molécules excitées près de la surface tissulaire sera proportionnel à la géométrie d'excitation. Pour une même irradiance lumineuse, plus le diamètre de cœur de la fibre excitatrice est grand plus le signal de fluorescence est grand. Ceci est également lié au fait que la détection de fluorescence est effectuée à la surface des tissus.

L'intensité de fluorescence détectée par un capteur est proportionnelle à sa surface active. Dans une fibre optique, l'intensité de lumière guidée est proportionnelle au carré de son diamètre de cœur. Par exemple, le signal de fluorescence guidé dans une fibre optique de 550 μm de diamètre de cœur est 7,56 fois plus grand que celui guidé dans une fibre de 200 μm de diamètre de cœur (les deux fibres possédant la même ouverture numérique).

Sachant que la lumière d'excitation est plus absorbée dans l'axe d'incidence, l'intensité de fluorescence détectée dans cet axe est maximale. Ainsi, l'utilisation d'un capteur monofibre pour l'excitation et la détection permet d'obtenir un maximum de fluorescence. Pour un capteur multifibre, l'intensité de fluorescence décroît en fonction de la distance axiale r entre la fibre excitatrice et la fibre réceptrice (Figure 51).

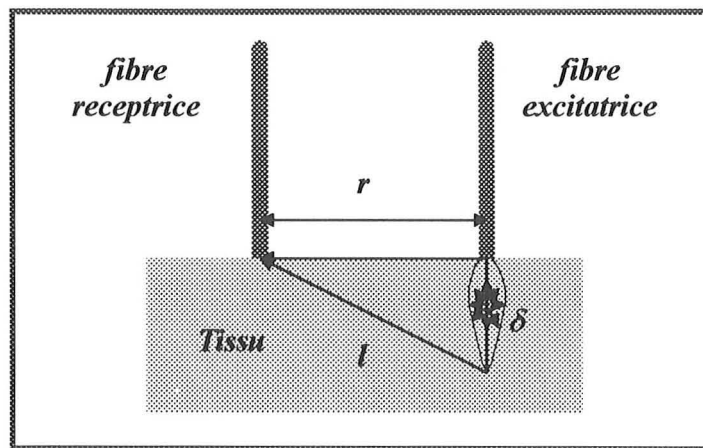


Figure 51 : Influence de la distance inter-fibres sur le signal de fluorescence.

La loi de Beer-Lambert peut approximativement être appliquée pour évaluer l'intensité d'une raie de fluorescence de longueur d'onde λ à une distance r , telle que :

$$I(r, \lambda) = I_0(\lambda) \exp(-\Sigma_{eff}(\lambda) r)$$

où $I_0(\lambda)$ représente l'intensité de fluorescence sur l'axe d'incidence.

A titre d'exemple, pour une longueur d'onde d'excitation de 410 nm, la profondeur de pénétration effective $\delta = 1/\Sigma_{teff}$ dans le tissu est d'environ 200 μm [Profio 1988]. Dans le cas d'une diffusion simple et pour une distance interfibre axiale r de 400 μm , la trajectoire la plus longue que parcourt la lumière de fluorescence, pour atteindre la fibre réceptrice, peut

être donnée par l'hypoténuse l du triangle formé avec r et δ . Dans ce cas particulier, on a $r=2\delta$, ce qui implique que $l=1,12r$. Avec une erreur approximative de 10,5% on peut considérer que $l \cong r$. On appliquant la loi de Beer-Lambert dans ces conditions, l'intensité lumineuse pour une raie de fluorescence de longueur d'onde λ mesurée à une distance $r=400 \mu\text{m}$ est donnée par :

$$I(r, \lambda) = I_0(\lambda) \exp(-r/\delta) = 0.135 I_0(\lambda)$$

Pour étudier expérimentalement l'influence de la géométrie de détection sur l'intensité et l'allure du signal de fluorescence, nous avons utilisé trois capteurs optiques :

- monofibres à coupleur 2x1 - 50/50, $\varnothing=550 \mu\text{m}$;
- multifibre 2x($\varnothing=200 \mu\text{m}$)+1x($\varnothing=550 \mu\text{m}$) ;
- multifibre 3x($\varnothing=550 \mu\text{m}$).

La fibre excitatrice des trois capteurs est de $550 \mu\text{m}$ de diamètre de cœur. Trois puissances en sortie de fibre (0,5, 0,75 et 1 mW) sont utilisées pour l'excitation d'un même tissu (paume de la main). La longueur d'onde d'excitation est de 410 nm. A l'extrémité du capteur les fibres sont nues. Ainsi, la distance axiale r entre la fibre excitatrice et la fibre réceptrice constitue la somme des rayons des fibres plus la somme des épaisseurs de cladding (gaine). Pour le premier capteur $r=0$, pour le deuxième $r=420\pm 10$ et pour le troisième capteur $r=600\pm 10$.

L'intensité spectrale de fluorescence avec chaque capteur a été mesurée à 520 nm pour les trois puissances d'excitation. Afin de déterminer l'influence de la distance interfibre et de la géométrie de détection, nous avons rapporté les intensités mesurées, à chaque puissance avec le premier capteur ($r=0$) aux intensités mesurées avec le deuxième et le troisième capteur. L'affaiblissement dû au ratio du couplage pour le premier capteur a été corrigé en multipliant l'intensité de fluorescence par un facteur de 2. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Détermination de l'influence de la distance interfibre sur le signal de fluorescence. Données expérimentales comparatives de l'intensité spectrale mesurée avec les différents capteurs.

Puissance d'excitation [mW]	$I[r=0]/I[r=420\mu\text{m}]$ $\varnothing_1=550\mu\text{m}, \varnothing_2=200\mu\text{m}$	$I[r=0]/I[r=600\mu\text{m}]$ $\varnothing_1=550\mu\text{m}, \varnothing_2=550\mu\text{m}$
0,5	32,50	6,13
0,75	34,25	6,83
1	32,10	6,45
Moyenne±Ecart type	32,95±1,14	6,44±0,35

Dans le premier cas, du fait que le diamètre de détection du deuxième capteur soit de 200 μm et la distance interfibre de 420 μm , l'intensité de fluorescence a été affaiblie de $32,95\pm 1,14$ fois par rapport à celle mesurée avec le premier capteur. Dans le deuxième cas, seule la distance interfibre était différente (600 μm), l'intensité a été affaiblie de $6,44\pm 0,35$ fois par rapport à celle mesurée avec le premier capteur. Malgré que la distance interfibre est plus importante, dans ce cas, le signal capté est 5,10 fois plus puissant par rapport au premier cas. Ceci peut être expliqué par le fait que la surface de détection du troisième capteur est 7,56 fois plus grande que celle du deuxième capteur.

D'autre part, le spectre de fluorescence mesuré au moyen du premier capteur était relativement plus large que celui mesuré au moyen des deux autres capteurs (Figure 52). En effet, comme la détection de fluorescence était réalisée dans l'axe d'incidence de la lumière d'excitation, le débit des photons détectés par le capteur était important. Cependant, les photons de fluorescence émis en profondeur subissent plusieurs diffusions avant d'atteindre la surface tissulaire. Keijzer *et al.* ont montré avec une simulation de Monte Carlo que le spectre du signal de fluorescence détecté en profondeur, dans l'axe d'incidence, était plus large que celui du signal détecté sur la surface. Par ailleurs, du fait du flux lumineux relativement important à l'entrée du spectrographe, cet élargissement de ≈ 10 nm, peut être lié à des phénomènes d'aberration. Toutefois, vu la largeur du spectre de fluorescence mesuré avec les autres capteurs, un élargissement de 10 nm ne constitue que 3% de la largeur globale du spectre, il peut être donc négligé.

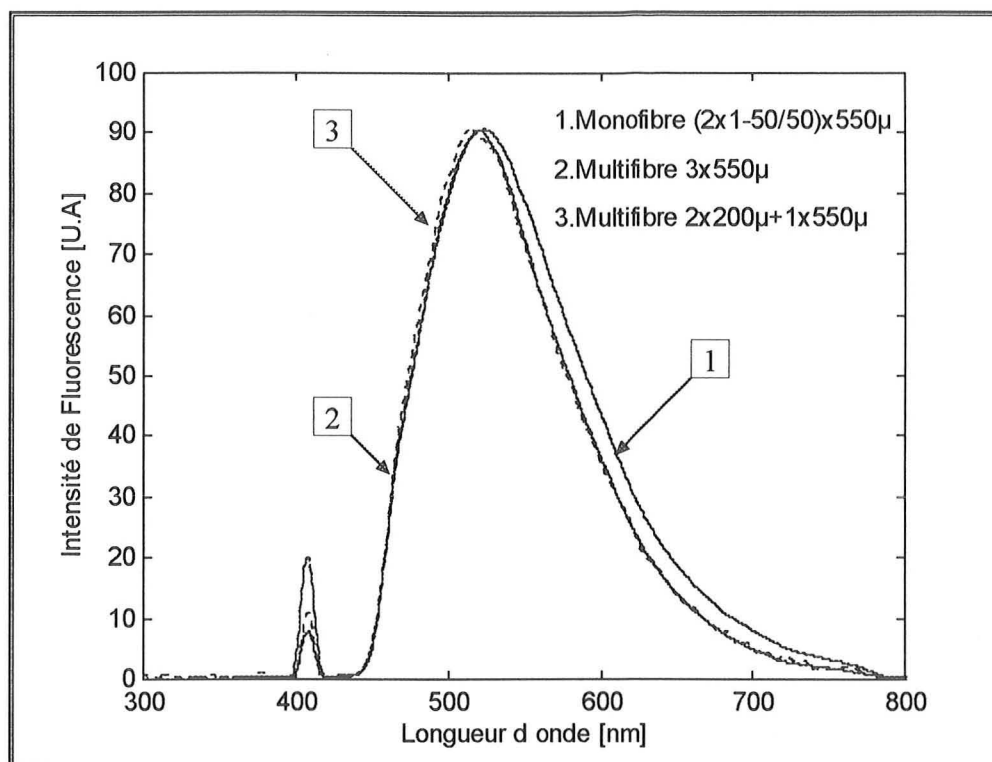


Figure 52 : Influence de la géométrie du capteur sur l'allure spectrale .Spectres de fluorescence mesurés à 520 nm sur la paume de la main normés à 100.

Bien que l'allure globale du spectre de fluorescence n'ait pas significativement changée en fonction de la distance interfibre des capteurs utilisés, nous pensons qu'une distance maximale r_{\max} doit être respectée. Cette distance peut être définie en fonction du libre parcours moyen des photons de fluorescence ayant la longueur d'onde la plus courte $MFP(\lambda_{\min})$.

Sachant que la fibre optique est caractérisée par un cône d'acceptance, le diamètre de la base de ce cône, à une distance donnée de l'extrémité de fibre, est supérieur au diamètre de cœur de la fibre. Ainsi, même si le libre parcours moyen des photons de fluorescence est inférieur à la distance axiale interfibre, ces photons peuvent se propager dans la fibre. Pour définir la limite de la distance axiale maximale entre la fibre excitatrice et la fibre réceptrice, on doit prendre en considération l'ouverture numérique de la fibre, ainsi que la profondeur de pénétration de la lumière d'excitation. Dans notre cas, l'ouverture numérique de la fibre est de 0,22 et la profondeur de pénétration est de 200 µm. Cependant, cette ouverture numérique est donnée pour une interface source-fibre constituée de l'air d'indice 1, alors que

la fibre réceptrice est placée en contact avec le tissu d'indice 1,33-1,5. Aussi, on doit tenir compte de cette valeur d'indice.

Considérons le diamètre de la base formée par le cône d'acceptance pour une lumière qui se propage à partir d'une profondeur dans le tissu, L , de $200 \mu\text{m}$ (Figure 53).

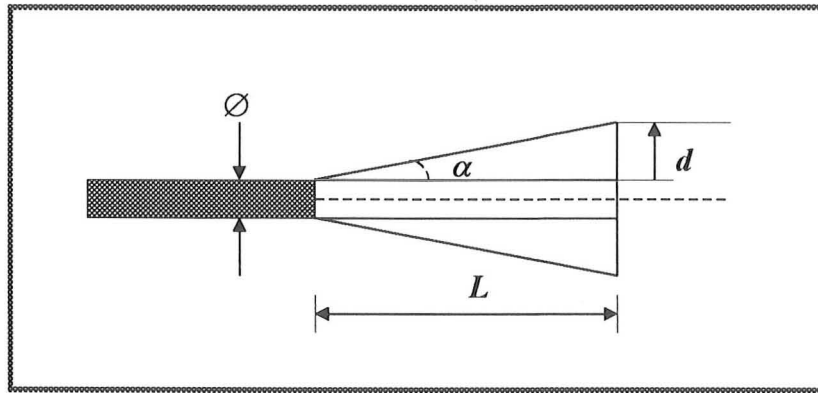


Figure 53 : Schématisation bidimensionnelle de l'acceptance de la lumière dans une fibre optique.

On a :

$$n_0 \sin \alpha_c = 0,22$$

Pour $n_0=1,5 \Rightarrow$

$$\sin \alpha_c = 0,22/1,5 = 0,147$$

d'où,

$$\alpha = \alpha_c = 9,37^\circ$$

L'extension du diamètre de la surface d'acceptance due à l'ouverture numérique de la fibre est donnée par :

$$d = L \cdot \tan \alpha = 29,65 \mu\text{m}$$

Ainsi, la distance interfibre maximale peut être définie par :

$$r_{max} \leq MFP(\lambda_{min}) + d$$

En se basant sur cette hypothèse, le capteur à trois fibres optiques que nous utilisons $2 \times (\varnothing = 200 \mu\text{m}) + 1 \times (\varnothing = 550 \mu\text{m})$ permet de capter tous les photons de libre parcours moyen supérieur à $390 \pm 10 \mu\text{m}$. Ceci correspond aux longueurs d'onde supérieures à 450 nm.

VI.3.2. Analyseur optique multicanal "spectromètre"

L'analyseur optique multicanal dont nous disposons est un système CP200 Jobin-Yvon. Il comporte :

- Un spectrographe de configuration Czerny-Turner dont le système dispersif est un réseau holographique concave fixe non blazé (P/N : 21 374 010, Jobin-Yvon). Le réseau de 20 cm de largeur est gravé en raison de 200 traits/mm et est positionné à une longueur d'onde centrale de 495 nm. Il permet ainsi de disperser le signal de fluorescence sur une étendue de 25 mm couvrant la région spectrale de 190 à 820 nm. Le nombre d'ouverture du spectrographe et sa distance focale sont respectivement $F/\# = 2,9$ et $L = 190$ mm.
- Un jeu de fentes de largeur de 50, 100, 250 et 500 μm offrant un choix variable de débit de flux lumineux entrant dans le spectrographe. Leur hauteur est réglable entre 2 et 8 mm à l'aide d'un "height limiter".
- Une CCD standard de 1152×298 pixels (SPEX, Jobin-Yvon) en silicium. Elle est sensible aux longueurs d'onde allant de 350 à 1100 nm. La taille d'un pixel de la matrice CCD est de $22 \mu\text{m}^2$. La dimension totale de la CCD est de $26 \times 6,7$ mm. Grâce à cette large dimension, la résolution du système CP200 peut atteindre 0,54 nm. De plus le système peut être utilisé en imagerie spectrale et en détection multispectrale. Un conteneur de 2,8 litre d'azote permet de refroidir la CCD jusqu'à -140 °C durant 72 heures. A cette température le rapport signal/bruit, à des temps d'intégration prolongés, peut atteindre 171.
- Un contrôleur électronique de CCD, Spectralink (Jobin-Yvon).
- Une carte d'interface RISC (ISA, Jobin-Yvon) permettant de dialoguer avec l'ordinateur.
- Un obturateur électronique rapide placé devant le spectrographe qui sert à supprimer le bruit de fond et à déterminer le temps d'intégration.
- Un logiciel Spectramax (Jobin-Yvon) installé sur PC compatible 486DX2-66. Le traitement du signal, la linéarisation des données, la suppression automatique de bruit de

fond, la détermination du temps d'intégration, l'affichage et la manipulation des spectres sont gérés par ce logiciel.

Avec cette configuration les caractéristiques du système spectroscopique peuvent être déduites comme suit :

- Dispersion (D) = $d\lambda/dx = [820-190 \text{ nm}] / 25 \text{ mm} = 25,2 \text{ nm/mm}$
- Résolution (R) = D × Largeur de la CCD / Nombre de pixels dans une ligne
 $= [25,2 \text{ nm/mm}] \times [26 \text{ mm}] / [1152 \text{ Pixels}] = 0,57 \text{ nm/Pixel}$
- Bande passante (BP) = D × w_e
 Pour $w_e = 50 \text{ } \mu\text{m} \Rightarrow \text{BP} \cong 1,26 \text{ nm}$
 Pour $w_e = 100 \text{ } \mu\text{m} \Rightarrow \text{BP} \cong 2,52 \text{ nm}$
- Etendue géométrique (G) = $\pi \cdot S \cdot [1/(2F/\#)]^2$
 Pour $w_e = 50 \text{ } \mu\text{m}$ et $h = 2 \text{ mm} \Rightarrow G \cong 9,34 \cdot 10^{-3}$
 Pour $w_e = 100 \text{ } \mu\text{m}$ et $h = 2 \text{ mm} \Rightarrow G \cong 1,86 \cdot 10^{-2}$

La suppression automatique du bruit de fond s'effectue de la manière suivante :

Pour chaque mesure de données spectrales deux acquisitions sont réalisées. Au déclenchement de la première acquisition, le contrôleur génère une impulsion TTL pour mettre l'obturateur de CCD en position de fermeture. Le signal mesuré dans cette position se compose uniquement du courant d'obscurité de la CCD. Dans la deuxième acquisition, l'impulsion TTL déclenche l'ouverture de l'obturateur. Ainsi, le signal mesuré englobe le courant d'obscurité et le signal de fluorescence à analyser. Si le système est configuré en mode de suppression automatique du bruit de fond, le signal total S_{Total} mesuré par le détecteur est donné par :

$$S_{\text{Total}} = \left[\frac{S_{\text{Analyse}} + N + C}{T_{\text{Int.}}} \right] - \left[\frac{C}{T_{\text{Int}}} \right] = \left[\frac{S_{\text{Analyse}} + N_{\text{Analyse}}}{T_{\text{Int}}} \right]$$

où :

C : courant d'obscurité ;

N : bruit produit par la lumière incidente ;

S_{Analyse} : signal de fluorescence en sortie du spectrographe ;

T_{int} : temps d'intégration.

Comme les deux acquisitions s'effectuent dans un intervalle de temps très court, la suppression automatique du bruit de fond rend les mesures indépendantes des variations du courant d'obscurité dues au changement de la température de la CCD. Par conséquent, elle permet d'améliorer le rapport signal/bruit.

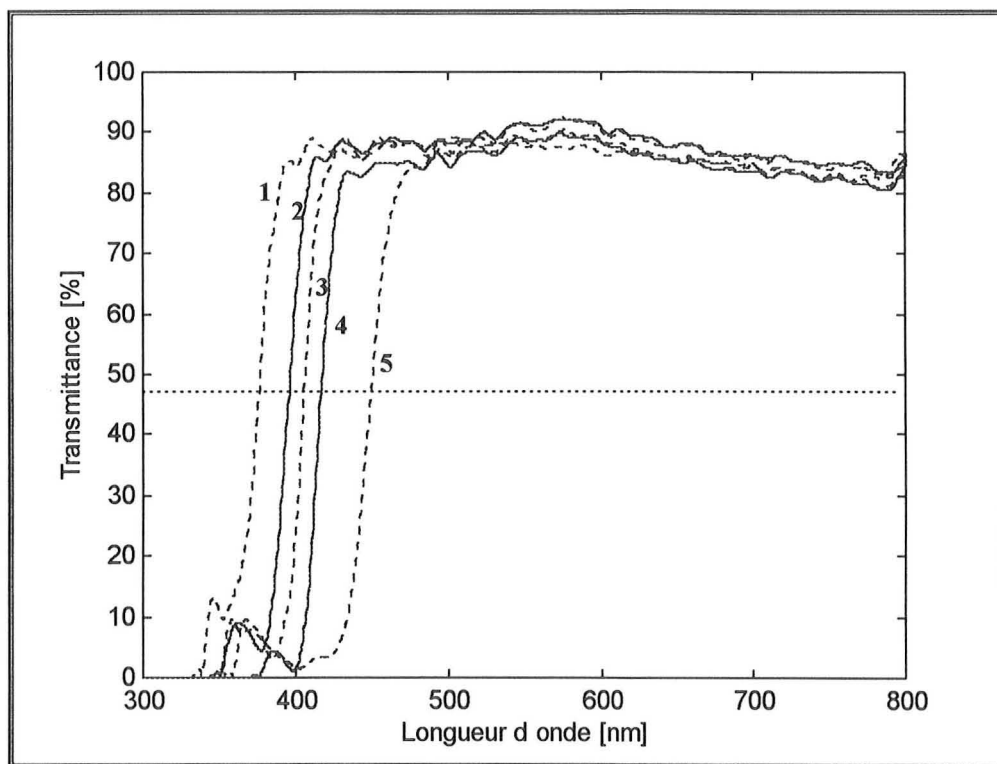


Figure 54 : Spectres de transmission des filtres passe haut. Les longueurs d'onde de coupure à 50% sont (1) : 380 nm, (2) : 399 nm, (3) : 408 nm, (4) : 418 nm et (5) : 450 nm.

Pour atténuer la lumière d'excitation entrant dans le spectrographe, nous avons utilisé un jeu de filtres passe haut de basse fluorescence à transmission maximale de 50% à la longueur d'onde de coupure. Les filtres choisis coupent à : 380 nm (52055, Oriel), 399 nm (52065, Oriel), 408 nm (52068, Oriel), 418 nm (52075, Oriel) et 450 nm (52086, Oriel). En-dehors de la bande de coupure, la transmission de ces filtres est de 0,92. Les courbes de transmission de ces filtres sont données par la figure 54.

VI.3.2.1. Efficacité de transmission spectrale du réseau de diffraction

L'efficacité du réseau dépend particulièrement de sa densité. Selon cette dernière, on peut définir la région spectrale que l'instrument spectroscopique est destiné à analyser. Notre système spectroscopique est conçu pour analyser la région spectrale allant de 300 à 820 nm. La courbe de la figure 55 représente l'efficacité du réseau en fonction de la longueur d'onde. Cette efficacité est maximale vers 400 nm, elle est de 38%.

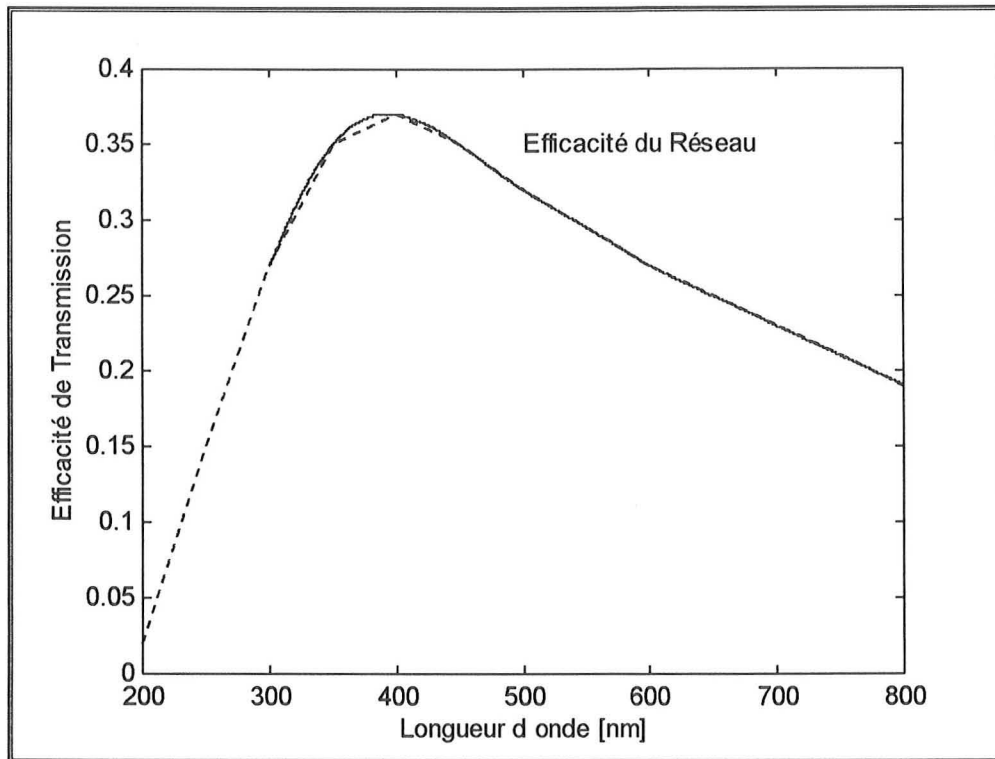


Figure 55 : Courbe d'efficacité du réseau dispersif gravé à raison de 200 Traits/mm.

VI.3.2.2. Efficacité quantique de la CCD

L'efficacité quantique de la CCD caractérise sa sensibilité en fonction de la longueur d'onde. La courbe d'efficacité de la CCD de notre système expérimental est donnée par la figure 56. Pour les longueurs d'onde comprises entre 300 et 450 nm, l'efficacité est relativement faible, elle est inférieure à 10%. Au-delà de 450 nm, elle augmente d'une façon linéaire. Un maximum d'efficacité de 50% est atteint vers 650 et 750 nm.

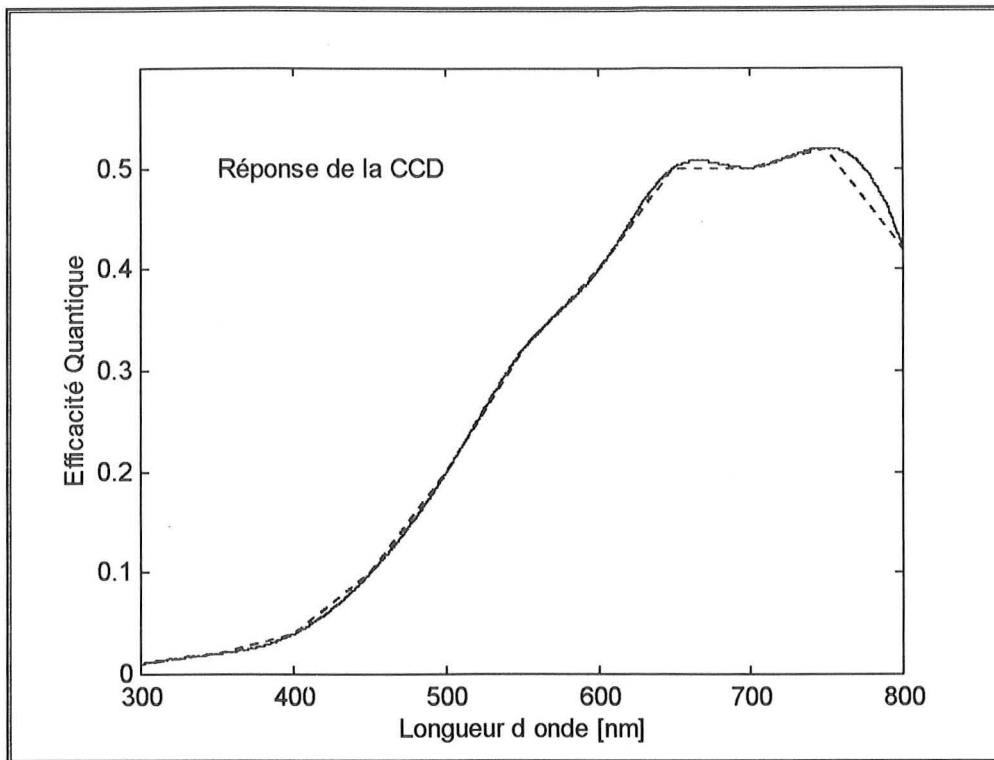


Figure 56 : Courbe d'efficacité quantique de la CCD.

VI.3.2.3. Linéarisation de la Réponse globale du spectroscope

La réponse globale du système spectroscopique peut être établie à partir des fonctions de transfert des éléments qui le composent. La chaîne d'acquisition spectroscopique est composée dans l'ordre : d'une fibre optique, d'une fente d'entrée, d'un filtre passe haut, d'un réseau dispersif, d'une fente de sortie et d'une CCD (Figure 57). Vu la longueur du capteur utilisé, les pertes dans la fibre en fonction de la longueur d'onde sont négligeables (1-3%). Ce paramètre peut être écarté dans la détermination de la fonction de transfert du système. Le filtre passe haut peut également être écarté, car c'est un élément interchangeable ; sa transmittance en fonction de la longueur d'onde, dans la zone de mesure, est peu variable. Il est choisi en fonction de la longueur d'onde d'excitation de manière à atténuer cette lumière sans produire de pertes dans le signal de fluorescence mesuré. En ce qui concerne le profil instrumental, il est approximativement déterminé par la convolution des bandes passantes des filtres spatiaux qui sont les fentes d'entrée et de sortie du spectrographe. Le spectre en sortie du spectrographe constitue la convolution du profil instrumental et du spectre réel. Du fait que le spectre de fluorescence est large, l'influence du profil instrumental sur le signal mesuré peut être négligé. De plus, ce profil est indépendant de la longueur d'onde et

applicable à tous les spectres mesurés par l'instrument spectroscopique. Par conséquent, il n'a pas d'impact sur les composantes du spectre.

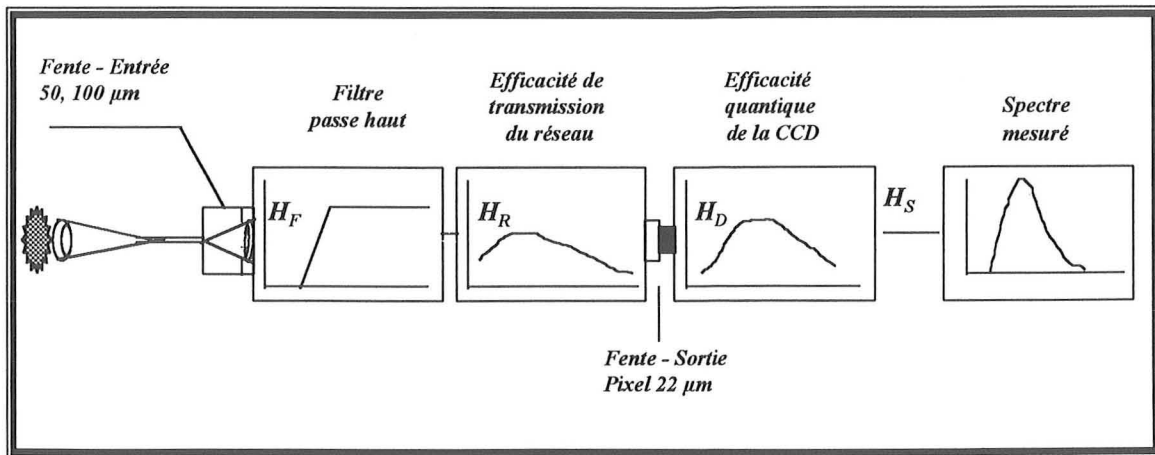


Figure 57 : Schéma de détection.

En se basant sur ces approximations simplificatrices, la réponse globale est uniquement fonction de l'efficacité du réseau et de l'efficacité quantique de la CCD. D'après l'allure des courbes d'efficacité présentées dans les deux derniers paragraphes, nous pouvons constater que les longueurs d'onde de fluorescence sont soumises à des valeurs d'efficacité variable (2-55%). La conséquence directe de cela est une distorsion de l'allure spectrale. Afin de corriger cette distorsion, une linéarisation de la réponse globale du système s'impose. Pour ce faire, nous avons procédé de deux manières :

- mesure expérimentale de la réponse spectrale "réponse expérimentale" ;
- calcul de la fonction de transfert à partir des courbes d'efficacité données par le constructeur "réponse théorique".

La réponse expérimentale du système a été déterminée comme suit : un monochromateur (Jobin- Yvon) est utilisé pour sélectionner des raies lumineuses monochromatiques à partir de la source Xénon. Les fentes d'entrée et de sortie du monochromateur sont fixées à 100 µm. Avec une résolution de 10 nm, nous avons fait défiler le spectre lumineux de la lampe Xénon entre 350 et 800 nm. Une fibre optique de 200 µm munie de connecteur SMA est couplée à la sortie du monochromateur l'aide d'un adaptateur. La puissance en sortie de fibre optique a été fixée à 2 nW. La mesure de cette puissance est effectuée par un

puissancemètre calibré en longueur d'onde (NEWPORT, Modèle 835). L'autre extrémité de la fibre a été couplée à l'entrée du spectrographe avec une fente de 50 μm . L'intensité spectrale à chaque longueur d'onde a été mesurée en coups/s. Toutes les intensités mesurées ainsi ont été rapportées à l'intensité maximale obtenue à 660 nm, puis multipliées par l'efficacité du réseau et l'efficacité quantique de la CCD à cette longueur d'onde. La courbe de réponse obtenue a été ensuite interpolée par des splines entre 300 et 800 nm, avec un pas équivalant à la résolution théorique du système expérimental (0,54 nm). La Figure 58 représente cette courbe de réponse.

Sur cette courbe on voit clairement que la réponse (efficacité globale) du système est quasi nulle pour les longueurs d'onde inférieures à 400 nm. Dans la région spectrale comprise entre 400 et 660 nm, l'efficacité augmente progressivement pour atteindre une valeur maximale de 0,125. Au-delà de cette région l'efficacité diminue progressivement jusqu'à une valeur de 0,06 à 800 nm.

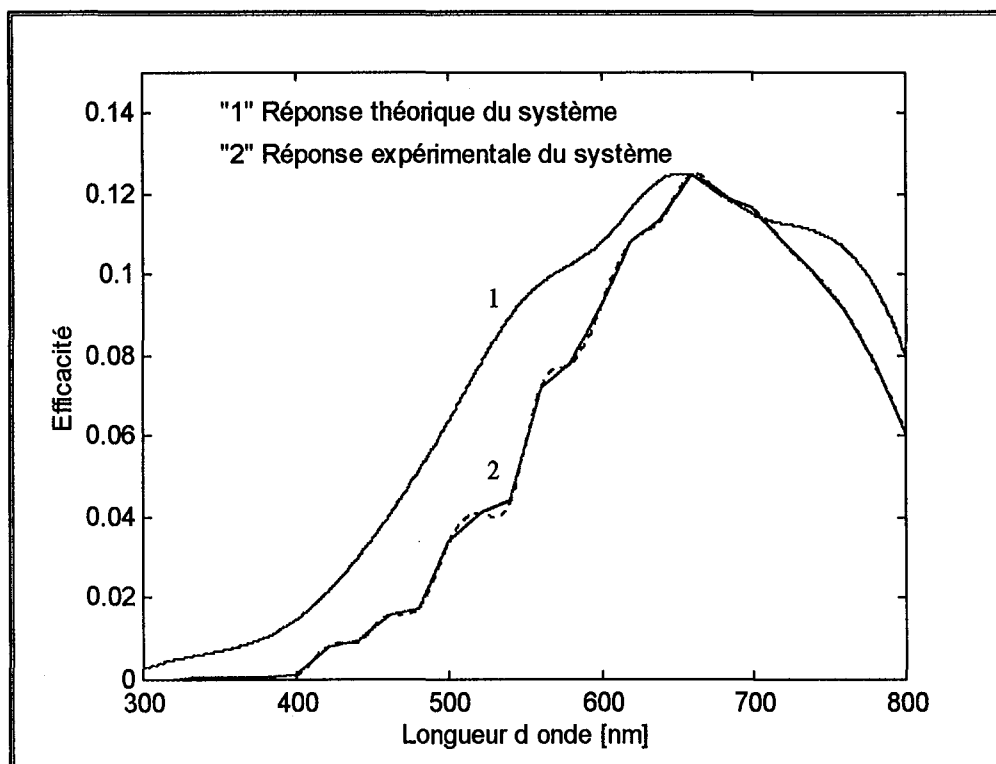


Figure 58 : Fonction de transfert (réponse) du système expérimental.

Afin de déterminer la réponse théorique du système, on considère que l'efficacité du réseau est donnée par une fonction de transfert $H_R(\lambda)$ et que l'efficacité quantique de la CCD est

donnée par une fonction de transfert $H_D(\lambda)$. La fonction de transfert globale calculée entre 200 et 800 nm avec une résolution de 0,54 nm est déterminée par :

$$H_S(\lambda) = H_R(\lambda) \times H_D(\lambda)$$

La courbe de réponse correspondant à cette fonction de transfert est comparée avec la réponse expérimentale dans la figure 58.

Afin de s'affranchir des erreurs pouvant être commises lors de la mesure de la réponse expérimentale, nous avons choisi de corriger la réponse globale du système à partir de la réponse théorique. La courbe de correction est représentée dans la figure 59. Les coefficients de correction obtenus sont ensuite introduits dans un fichier et sauvegardés. Grâce au logiciel Spectramax qui gère l'acquisition du système spectroscopique, on fait appel à ce fichier et on corrige automatiquement tous les spectres mesurés par le système. La figure 60 montre un exemple des spectres de fluorescence d'un tissu buccal avant et après correction.

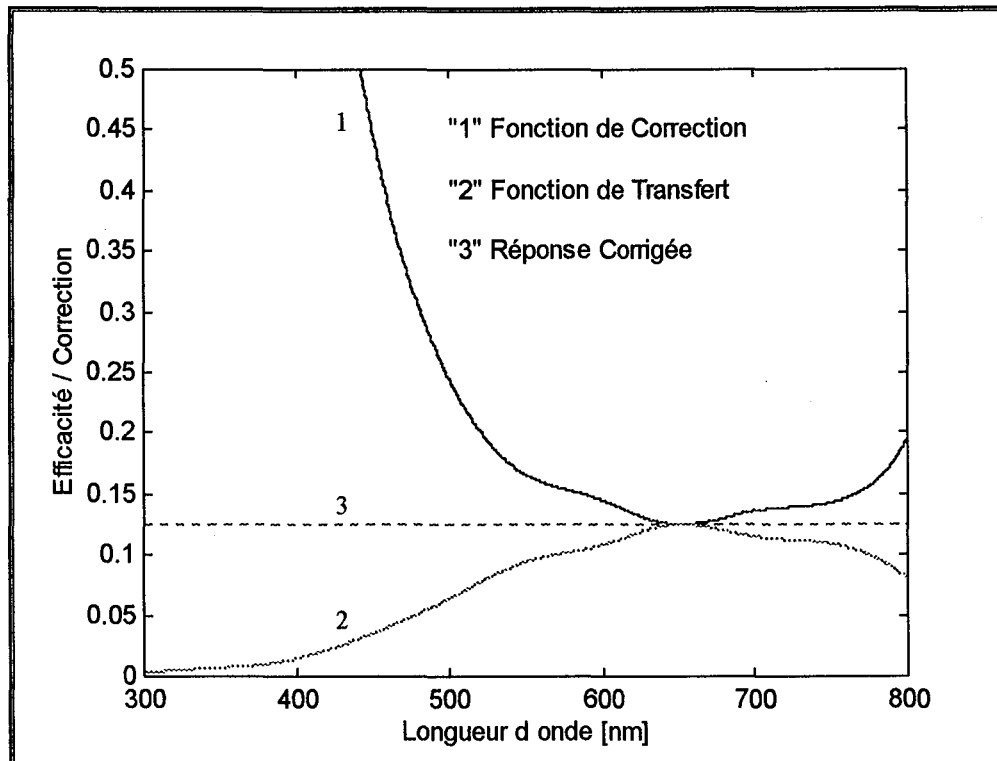


Figure 59 : Fonction de transfert et fonction de correction du système expérimental.

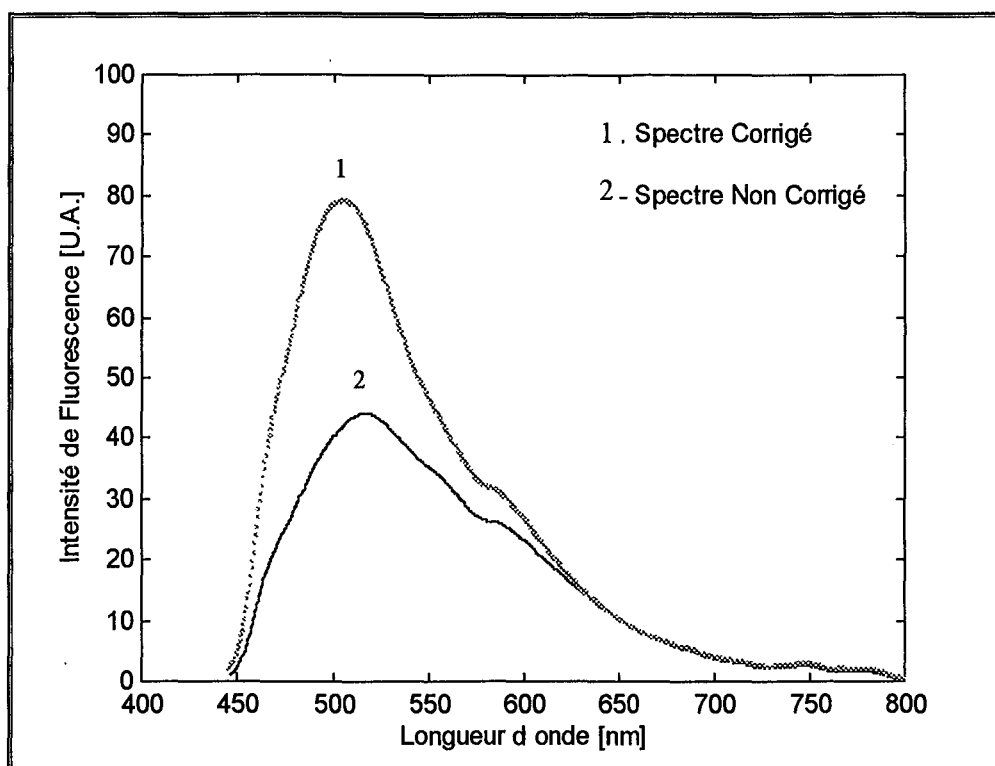


Figure 60 : Spectres de fluorescence d'un tissu buccal avant et après correction.

VI.3.2.4. Calibration du spectromètre en longueur d'onde

Selon la conception de l'analyseur optique multicanal, les radiations lumineuses en sortie du spectrographe sont entièrement projetées sur un plan focal qui constitue la CCD. Chaque pixel de la CCD correspond à une raie lumineuse de l'étendue spectrale couverte par le réseau. La largeur de cette raie est déterminée par la résolution de l'instrument (0,57 nm/pixel). Ainsi, la calibration du spectromètre en longueurs d'onde consiste à lier les coordonnées spatiales de la CCD (numéro du pixel) à des coordonnées spectrales (longueur d'onde) d'une lampe de calibration dont le spectre de luminance est connu. Pour ce faire, nous avons mesuré les radiations d'une lampe crayon HG(AR) (Oriel, 90-0012-01). Le spectre mesuré en pixels est converti en nanomètres en se référant aux pics 365, 404, 435 546 et 577 nm du spectre de luminance fourni par le constructeur (Figure 61). Une interpolation polynomiale du troisième ordre a été utilisée pour réaliser le passage des pixels aux nanomètres. Les coefficients de ce polynôme ont été introduits dans un fichier de linéarisation et sauvegardés. L'étalonnage des spectres mesurés avec le système est automatiquement réalisé à l'aide du logiciel d'acquisition Spectramax qui fait appel à ce fichier.

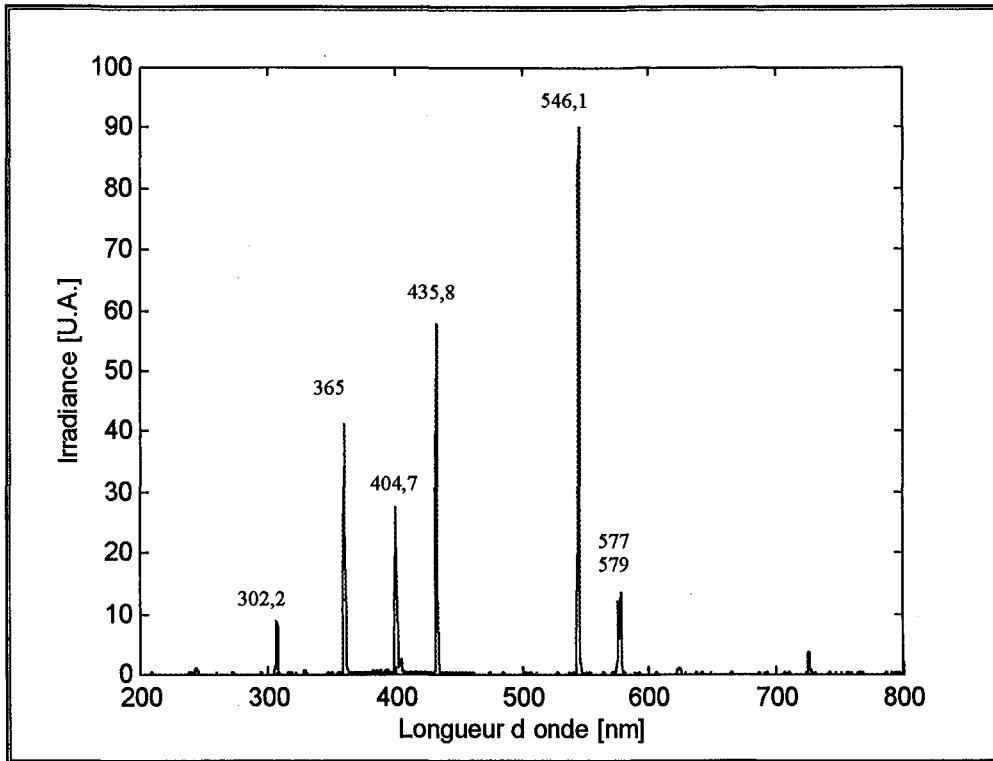


Figure 61 : Spectre de luminance de la lampe de calibration HG(AR).

VI.3.3. Couplage optique capteur - spectrographe

Afin de diminuer l'effet des phénomènes d'aberration sur le signal de fluorescence mesuré par l'instrumentation spectroscopique, le couplage doit satisfaire à la condition d'Abbe. C'est à dire que le rendement de l'étendue géométrique, défini comme étant le rapport entre l'étendue de l'entrée du spectrographe et l'étendue de la source à analyser, doit être le plus proche possible de 1. La source étant la fluorescence guidée par une fibre optique, son étendue est déterminée par la géométrie de celle-ci.

Pour une fibre de diamètre de cœur de 200 μm et d'une ouverture numérique de 0,22, l'étendue géométrique G_F est calculé comme suit :

$$G_F = \pi S_F \sin^2 \alpha$$

$$S_F = \pi r^2 = 3,14.10^2$$

Comme la lumière de fluorescence en sortie de fibre se propage dans l'air jusqu'à l'entrée du spectrographe, on a : $\sin \alpha = 0,22$. Ainsi, l'étendue géométrique de la fibre est donnée par :

$$G_{F200} = \pi \cdot 3,14 \cdot 10^2 \cdot (0,22)^2 = 4,77 \cdot 10^3$$

Pour une fibre de diamètre de 550 μm et de même ouverture numérique :

$$G_{F550} = \pi \cdot 0,237 \cdot (0,22)^2 = 3,61 \cdot 10^2$$

D'autre part, l'étendue géométrique du spectrographe G_S est déterminée par sa fente d'entrée et son nombre d'ouverture, telle que :

$$G_S = \pi \cdot S_e \cdot [1/(2F\#)]^2$$

La surface de la fente étant rectangulaire :

$$S_e = w_e \cdot h$$

Pour $w_e = 50 \mu\text{m}$ et $h = 2 \text{ mm}$, l'étendue géométrique est :

$$G_{S50} \cong 9,34 \cdot 10^3$$

Pour $w_e = 100 \mu\text{m}$ et $h = 2 \text{ mm}$, elle vaut :

$$G_{S100} \cong 1,86 \cdot 10^2.$$

Ainsi, les rendements du couplage $\rho = G_S/G_F$ calculés pour les différentes combinaisons possibles entre les deux diamètres des fibres, composant les capteurs, et les deux tailles des fentes utilisées sont :

- Pour $w_e = 50 \mu\text{m}$, $h = 2 \text{ mm}$ et $\varnothing = 200 \mu\text{m}$:

$$\rho_1 = 9,34.10^{-3} / 4,77.10^{-3} = 1,96$$

- Pour $w_e=100 \mu\text{m}$, $h = 2 \text{ mm}$ et $\varnothing = 200 \mu\text{m}$:

$$\rho_4 = 1,86.10^{-2} / 4,77.10^{-3} = 3,90$$

- Pour $w_e=100 \mu\text{m}$, $h = 2 \text{ mm}$ et $\varnothing = 550 \mu\text{m}$:

$$\rho_2 = 1,86.10^{-2} / 3,61.10^{-2} = 0,52$$

- Pour $w_e=50 \mu\text{m}$, $h = 2 \text{ mm}$ et $\varnothing = 550 \mu\text{m}$:

$$\rho_3 = 9,34.10^{-3} / 3,61.10^{-2} = 0,26$$

Dans les deux premiers cas, l'étendue géométrique de l'entrée du spectrographe est supérieure à celle de la source. Si la fibre est directement couplée à l'entrée du spectrographe, l'étendue géométrique du système spectroscopique sera celle de la fibre et non celle du spectrographe. Par conséquent, il y a perte de photons et création de phénomènes d'aberration. Par contre, pour les deux derniers cas, l'étendue géométrique du système est régie par l'étendue du spectrographe et donc les pertes sont négligeables.

Ainsi, avec une fibre de $200 \mu\text{m}$, on utilise un adaptateur composé de lentilles plan-convexes entre la fibre et la fente d'entrée du spectrographe. L'adaptateur permet de reimager la lumière de fluorescence de manière à élargir l'étendue de la fibre afin d'assurer une propagation optimale des photons à travers le spectrographe. L'optique intermédiaire utilisée satisfait au principe de conservation de l'étendue géométrique d'Abbe. C'est à dire :

$$S_F \cdot \Omega = S_S \cdot \Omega'$$

où :

$$\Omega = 2\pi (1 - \cos\alpha)$$

$$\Omega' = 2\pi (1 - \cos\alpha')$$

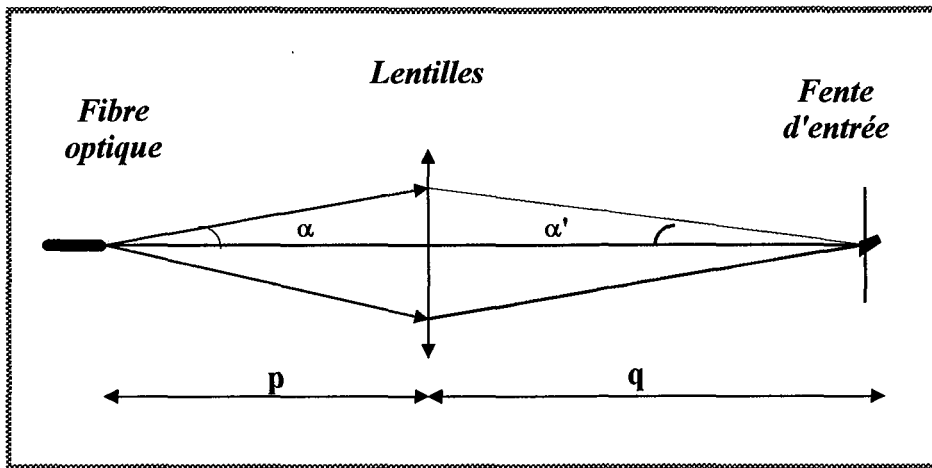


Figure 62 : Schéma d'un adaptateur à deux lentilles plan-convexes.

La figure 62 montre le schéma de l'adaptateur utilisé dans notre système spectroscopique. L'agrandissement de l'image de la source est donné en fonction de la surface de la fibre S_F et celle de la fente d'entrée du spectrographe S_S , ou en fonction de leurs ouvertures numériques. En effet, on a :

$$(S_S/S_F)^{1/2} = O.N.(Fibre) / O.N.(Spectrographe) = q/p \quad \dots (*)$$

$$O.N.(Fibre) / O.N.(Spectrographe) = (0,22)/(0,17)$$

$$\Rightarrow q/p = 1,28$$

Selon la formule de conjugaison des lentilles minces de focale f , on a :

$$1/f = 1/p + 1/q \quad \dots (**)$$

A partir des équations (*) et (**), pour une focale de 40 mm, on a :

$$P = 1,78 f = 71,2 \text{ mm}$$

$$q = 2,28 f = 91,2 \text{ mm}$$

Sachant que :

$$F/\# \text{ (spectrographe)} = q/d$$

⇒ le diamètre de la lentille $d \cong 30 \text{ mm}$

et,

$$F/\# \text{ (fibre optique)} = 1/2 \text{ O.N.} = p/d$$

⇒ le diamètre de la lentille $d \cong 30 \text{ mm}$

Deux lentilles en silice de 40 mm focale et de 30 mm de diamètre sont utilisées pour optimiser le couplage de la fibre optique avec l'entrée du spectrographe. L'adaptateur conçu de cette manière permet l'utilisation d'une fibre de 200 μm de diamètre de cœur et de 0,22 d'ouverture numérique avec un connecteur SMA. Un support de filtres passe haut de 10 mm de diamètre est prévu dans cet adaptateur.

VI.4. PUISSANCEMÈTRE

Afin de mesurer la puissance de la lumière d'excitation rétrodiffusée, nous avons utilisé un puissance-mètre NEWPORT modèle 835. Nous relevons la valeur de la puissance lumineuse directement sur l'afficheur à cristaux liquides. La cellule photosensible utilisée dans ce puissance-mètre est une photodiode en silice (818-SL) d'une surface effective de 1 cm^2 . La réponse spectrale de l'appareil est précorrégée pour des longueurs d'onde allant de 400 à 1100 nm avec une résolution de 10 nm. La sensibilité de la cellule photovoltaïque est maximale pour la longueur d'onde de 950 nm. A 410 nm elle est d'environ 0,2 [A/W]. La résolution en puissance de cet appareil est de 0,1 pW.

VI.5. NORMALISATION DES SPECTRES

Le principe de la normalisation découle de la conception du capteur à trois fibres. Il consiste à mesurer avec le puissance-mètre, une partie de la puissance de la lumière d'excitation rétrodiffusée simultanément à l'acquisition du spectre de fluorescence. Etant donné que les deux fibres réceptrices sont de même diamètre et symétrique par rapport à la fibre excitatrice, les signaux guidés sont égaux. Ainsi, si l'intensité spectrale de la puissance

rétrodiffusée (mesurée en coup/s) est normée à 1 et le spectre résultant est multiplié par la valeur réelle (mesurée en nW), nous obtenons alors un spectre de fluorescence normalisé. Cette normalisation permet d'avoir une échelle d'intensité identique pour tous les spectres mesurés par ce système à condition que la puissance d'excitation soit stable. La transmittance du filtre installé à l'entrée du spectrographe, à la longueur d'onde d'excitation, est prise en compte par l'opération scalaire effectuée sur le spectre brut. Nous définissons alors la formule de normalisation suivante :

$$S_N = \left[\frac{T(\lambda_{ex}) \cdot I_L(\lambda_{ex})}{I_{sb}(\lambda_{ex})} \right] \cdot S_b$$

où :

S_N : Spectre normalisé

S_b : Spectre brut

$T(\lambda_{ex})$: Transmittance du filtre passe haut (non-idéal) à la longueur d'onde d'excitation

$I_{sb}(\lambda_{ex})$: Intensité spectrale brute à la longueur d'onde d'excitation [c/s]

$I_L(\lambda_{ex})$: Intensité de la lumière d'excitation rétrodiffusée [nW]

Pour chaque filtre passe haut placé à l'entrée du spectrographe, on utilise la transmittance correspondante. Les transmittances des filtres aux longueurs d'onde d'excitation sont données dans le tableau 8.

Tableau 8 : Transmittance des filtres passe haut aux longueurs d'onde d'excitation.

λ coupure [nm]	Transmittance des filtres passe haut pour différentes longueurs d'onde d'excitation			
	364 nm	400	410	418
380 (3 mm)	13,60	84,50	88,75	87,50
399 (3 mm)	8,40	61,20	82,60	85,40
408 (3 mm)	0,35	23,20	62,50	80,67
418 (3 mm)	0,00	1,40	18,20	50,80
450 (2 mm)	0,00	2,19	2,67	1,26
450 (3 mm)	9,20	1,64	2,66	3,30

D'autre part, afin de déterminer un coefficient de proportionnalité entre l'intensité de fluorescence et l'énergie absorbée dans le tissu, nous pouvons réaliser des mesures spectrales de fluorescence à différentes puissances d'excitation avec le même capteur.

Sachant que l'indice de réfraction des tissus biologiques est d'environ 1,3-1,5, et celui de la silice est d'environ 1,5, on estime que la lumière guidée par le capteur optique vers le puissancemètre est la lumière d'excitation rétrodiffusée. En effet, puisque le capteur est placé en contact avec le tissu examiné (silice-tissu), et le rayon de la lumière d'excitation est normal à la surface tissulaire, la réflexion **R** est donnée par :

$$R = [n_1 - n_2]^2 / [n_1 + n_2]^2$$

où n_1 et n_2 sont respectivement les indices de réfraction de la silice et du tissu. Ainsi, pour $n_1 = 1,3 \Rightarrow R = 0,0051$, et pour $n_1 = 1,5 \Rightarrow R = 0$.

En se basant sur ses valeurs, on peut considérer que la réflexion spéculaire de la lumière d'excitation est négligeable et que la lumière mesurée par le capteur est effectivement la lumière d'excitation rétrodiffusée.

Par ailleurs, les différentes destinées d'une lumière d'excitation traversant un milieu quelconque sont résumées par la relation suivante :

$$P_{ex} = P_t + P_{ab} + P_{diff} + P_{rétodiff}$$

où :

P_t : puissance transmise ;

P_{ab} : puissance absorbée ;

P_{diff} : puissance diffusée ;

$P_{rétodiff}$: puissance rétrodiffusée ;

Pour une épaisseur semi-infinie $\Rightarrow P_t = 0$, d'où :

$$P_{ex} = P_{att} + P_{rétodiff} \quad \dots (*)$$

Où, $P_{att} = P_{ab} + P_{diff}$

La puissance rétrodiffusée étant proportionnelle à la puissance d'excitation, on peut écrire :

$$P_{\text{rédiff}} = \alpha P_{\text{ex}} \quad \dots\dots (**)$$

En combinant les équations (*) et (**), on obtient :

$$P_{\text{att}} = P_{\text{ex}} [1 - \alpha]$$

En mesurant α pour chaque milieu on peut relier l'intensité de fluorescence à la quantité de lumière atténuée dans le tissu.

Si on normalise les spectres de fluorescence selon le principe décrit précédemment, on peut approximativement obtenir des spectres avec des intensités en unités standard [nW]. Ainsi, en reliant cette intensité spectrale à la puissance atténuée dans le tissu, on obtient des données semi quantitative de fluorescence.

VI.6. SYNCHRONISATION ENTRE L'EXCITATION ET L'ACQUISITION DES SPECTRES

L'intensité de fluorescence en un temps donné est proportionnelle au nombre de molécules excitées. Lorsque l'excitation des molécules est continue, le nombre de molécules qui disparaissent du milieu est égal au nombre des molécules promues (état stationnaire). C'est à dire, les vitesses d'apparition et de disparition des molécules excitées sont égales. Si la quantité de molécules actives est toujours supérieure aux molécules photodégradées, les caractéristiques de fluorescence mesurées à n'importe quel moment de l'excitation sont les mêmes, quand il s'agit d'une seule espèce moléculaire. Cependant, dans un mélange de molécules où les taux de photoblanchiment des molécules sont variables, les caractéristiques spectrales dépendent du temps de détection de fluorescence après excitation.

Ainsi, pour réduire l'influence du phénomène de photoblanchiment sur les caractéristiques spectrales de fluorescence, une synchronisation entre l'excitation et l'acquisition de fluorescence est nécessaire. Ceci permet de diminuer le temps d'exposition des fluorophores à la lumière. Le temps d'excitation sera limité au temps d'acquisition du spectre.

Pour ce faire, nous avons installé un obturateur électronique (Oriel, 76994) entre la source d'excitation et l'entrée de la fibre excitatrice (voir la schéma d'excitation, figure 45, page 161). Le diamètre d'ouverture de cet obturateur est de 25 mm. Le temps d'ouverture minimale est de l'ordre de 2 ms à une fréquence pouvant atteindre 200 Hz. Cet obturateur est géré par un contrôleur (Oriel, 76995) commandable par un ordinateur à travers une interface RS-232 ou par un signal TTL. A l'aide du logiciel Spectramax nous avons établi une ligne de commande permettant l'accès au port parallèle de l'ordinateur. Le signal TTL généré au port parallèle synchronise le déclenchement de l'ouverture et de la fermeture de l'obturateur d'excitation avec celui de la CCD (obturateur d'acquisition).

CONCLUSION

Une étude théorique et pratique sur les différents éléments de la chaîne d'acquisition spectroscopique a été présentée dans cette deuxième partie. Les sources de lumière blanche associée aux filtres interférentiels semblent être bien adaptées aux applications spectroscopiques de l'autofluorescence et de la fluorescence induite. Un large choix de longueurs d'onde peut être réalisé avec la même source. Les fibres multimodes à saut d'indice silice/silice offrent de bonnes caractéristiques de transmission lumineuse dans la région spectrale correspondant au spectre de fluorescence.

Les caractéristiques optiques des tissus ont été présentées afin de mettre en évidence leur influence sur le signal de fluorescence. Une grande partie des changements produits sur l'intensité spectrale de l'autofluorescence entre les tissus sains et les tissus pathologiques est essentiellement liée à la différence d'absorption de la lumière d'excitation. L'oxyhémoglobine serait le responsable de cette absorption.

L'intensité de fluorescence mesurée par l'instrumentation spectroscopique est fonction de plusieurs paramètres réglables et aléatoires. Durant la réalisation d'une mesure spectroscopique nous sommes amenés à adapter les paramètres instrumentaux à la grandeur physique mesurée. En jouant sur les paramètres réglables, on peut à la fois augmenter le débit de flux lumineux entrant dans le spectrographe et le rendement de la CCD. Ceci à pour conséquence d'améliorer le rapport signal/bruit. Cependant, ce réglage ne permet pas d'évaluer l'intensité réelle du signal mesuré. Il est difficile de se référer à des standards tenant compte des différentes combinaisons fente d'entrée - temps d'intégration. De plus les paramètres aléatoires ne peuvent pas être pris en compte avec ces standards.

Le capteur que nous avons réalisé permet de réduire le nombre des paramètres qui agissent sur l'intensité de fluorescence tout en gardant la possibilité de régler le débit de flux lumineux en fonction de l'amplitude du signal à mesurer. La réponse spectrale du système réseau-CCD est linéarisée en fonction de la longueur d'onde. La mesure de la puissance rétrodiffusée permet de mettre les spectres à la même échelle. Cette normalisation est dépendante d'un seul paramètre lié à la détectivité de la cellule photovoltaïque du

puissancemètre. Cette mesure est indépendante de l'instrument spectroscopique proprement dit.

L'influence de la géométrie du capteur a également été analysée. Une distance axiale maximale entre la fibre excitatrice et la fibre réceptrice a été définie. Par une approximation de la loi de Beer-Lambert nous pouvons estimer l'atténuation de l'intensité de fluorescence à cette distance.

TROISIEME PARTIE

***APPLICATIONS DE LA SPECTROSCOPIE DE
FLUORESCENCE A LA PHOTODETECTION***

INTRODUCTION

Dans l'objectif de valider la méthode de photodétection par autofluorescence, nous avons réalisé certaines applications cliniques *in vivo* et *ex vivo*. L'autofluorescence des tissus sains et des tissus pathologiques de la voie aérodigestive supérieure, de la vessie et des poumons a été étudiée chez des patients présentant différents types de lésions.

La localisation et la quantification des photosensibilisants et l'étude de leur pharmacocinétique constituent une deuxième application permettant d'évaluer l'intervalle de temps idéal entre l'injection du photosensibilisant et la thérapie photodynamique. Cette technique est actuellement en développement dans un protocole clinique qui étudie l'efficacité de la mTHPC sur les cancers des voies aérodigestives supérieures.

L'identification des fluorophores endogènes responsables de l'autofluorescence est réalisée grâce à un modèle d'analyse gaussien. La mise en évidence de la réabsorption de fluorescence par l'oxyhémoglobine est également effectuée à l'aide de ce modèle.

Les applications cliniques ont été effectuées dans le cadre de l'unité de Recherche en Thérapie Photodynamique au Centre Alexis Vautrin en collaboration avec le Docteur P. Kosminski (Centre Alexis Vautrin) et le Docteur O. Ménard du Service de Pneumologie (Centre Hospitalier Universitaire de Nancy). Les applications sur modèles animaux ont été réalisées en collaboration avec Mlles N. Zeghari et H. Rezzoug du Laboratoire d'Oncologie (Centre Alexis Vautrin) et avec Mlle E. Bossu du laboratoire d'Hématologie, Physiologie et Biologie Cellulaire (Faculté de Pharmacie).

I. APPLICATIONS CLINIQUES DE LA SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE EN DIAGNOSTIC

Les sujets examinés dans cette étude sont 14 patients, 15 pièces opératoires et 25 individus sains. Dans ce chapitre, nous avons divisé les expérimentations selon leur discipline médicale.

Tous les spectres d'autofluorescence présentés dans ce travail sont normalisés par rapport à la puissance de la lumière d'excitation rétrodiffusée selon la méthode décrite au paragraphe VI.5, 2ème partie. Pour mettre tous les spectres mesurés à la même échelle, la puissance d'excitation standard est fixé à 1mW. Ainsi, l'intensité de fluorescence des spectres mesurés à des puissances d'excitation supérieures ou inférieures à cette valeur est corrigée par un coefficient de proportionnalité selon la puissance utilisée. L'intensité de fluorescence étant proportionnelle à la puissance absorbée, elle est par conséquent proportionnelle à la puissance d'excitation. A titre d'exemple, pour une puissance d'excitation de 10mW, l'intensité de fluorescence est divisée par un facteur 10.

I.1. O.R.L. : AUTOFLUORESCENCE DES TISSUS SAINS ET DES LESIONS TUMORALES DE LA VOIE AERO-DIGESTIVE SUPERIEURE IN VIVO

L'étude expérimentale de l'autofluorescence réalisée sur les différents tissus de la voie aérodigestive supérieure se divise en deux parties :

- La première partie concerne des sites tissulaires facilement accessibles. Cette étude porte sur les tissus de la cavité buccale. Elle a été réalisée sur 25 volontaires sains. L'objectif de cette expérimentation est la caractérisation spectrale des tissus sains de la cavité buccale et l'analyse de la variabilité interindividuelle.
- La deuxième partie concerne des tissus sains et tumoraux réalisés chez des patients au cours d'un examen endoscopique.

I.1.1. Matériels et Méthodes

Sujets : 25 personnes saines des deux sexes âgées de 20 à 55 ans.

Source d'excitation : laser Krypton (< 415 nm).

Puissance d'excitation en sortie de fibre optique : 10 mW.

Temps d'acquisition : 0,1-0,2 s/spectre.

Les spectres d'autofluorescence ont été saisis sur la muqueuse de la face inférieure et de la face supérieure de la langue, du plancher de la bouche, des joues, des lèvres, du palais et des gencives. Pour chaque individu, les mesures ont été effectuées au contact du tissu examiné et en trois points différents. La moyenne des trois spectres enregistrés représente le spectre du tissu examiné chez un individu et la moyenne des 25 spectres individuels représente le spectre du site tissulaire.

En ce qui concerne les patients examinés dans la discipline O.R.L., les conditions de l'expérimentation sont données ci-après :

Sujets : 3 patients ayant des carcinomes épidermoïdes du plancher de la bouche, 2 patients ayant des carcinomes épidermoïdes de la face inférieure de la langue, 2 patients ayant des carcinomes épidermoïdes de l'oro-pharynx et 2 patients ayant des carcinomes épidermoïde de l'œsophage.

Source d'excitation : lampe Xénon filtrée à 410 nm.

Puissance d'excitation : 1 mW.

Temps d'acquisition : 1 s/spectre.

Les mesures *in vivo* ont été réalisées au cours d'un examen endoscopique. Des biopsies ont été prélevées sur les sites examinés. Un examen histopathologique standard a été réalisé sur ces biopsies pour affirmer le diagnostic.

I.1.2. Résultats et discussion

Les figures 63 à 69 représentent les spectres moyens des tissus sains de la cavité buccale. Les spectres moyens du palais, de la face inférieure de la langue, du plancher de bouche, des gencives et des lèvres ont une allure identique. Ils possèdent les mêmes pics d'émission à

520 et 598 nm. Néanmoins, l'intensité spectrale à 598 nm par rapport à l'intensité à 520 nm varie légèrement d'un tissu à l'autre. Le coefficient de corrélation entre le spectre moyen d'un site donné et les spectres individuels par rapport à l'allure spectrale est de 0,9. L'intensité d'autofluorescence à 520 nm chez le même individu varie au sein d'un même type de tissu. Mais, du fait des variations interindividuelles (de 20 à 45% selon le site examiné), la variation d'intensité à 520 nm entre les différents sites tissulaires à partir des spectres moyens est statistiquement non significative. Les histogrammes des figures 70 et 71 représentent respectivement les variations d'intensité à 520 nm et les variations relatives $[I(598 \text{ nm})/I(520 \text{ nm})]$ pour les spectres ayant la même allure spectrale.

Le spectre de la face supérieure de la langue est caractérisé par son allure spectrale. Il possède deux pics supplémentaires aux alentours de 635 et 670 nm. Ces variations d'allure et d'intensité spectrales sont probablement dues à une concentration différente de fluorophores endogènes et à une absorption différente, tant de la lumière excitatrice que de la lumière de fluorescence, par les couches superficielle de l'épithélium. La présence ou l'absence de certains fluorophores endogènes dans les différents sites tissulaires peuvent être aussi à l'origine de ces variations. Les fluorophores endogènes possèdent des spectres d'émission larges ; la présence d'un fluorophore en forte concentration par rapport à d'autres fluorophores peut masquer l'émission de ceux-ci. La flavine est à l'origine de l'émission de fluorescence à 520 nm [Alfano 1989, Dhingra 1996]. Par ailleurs, les pics à 635 et 670 nm peuvent être attribuée aux porphyrines endogènes [Wang 1995, Dhingra 1996]. Le pic à 598 nm peut être dû à la réabsorption de l'oxyhémoglobine [Alfano 1989, Bigio 1996]. Cependant, si ce pic est uniquement dû à la réabsorption de l'oxyhémoglobine, un autre pic autour de 555 nm doit apparaître dans la structure spectrale du fait de la réabsorption à 540 nm. Il est possible que les porphyrines endogènes ou un autre fluorophore non identifié soient à l'origine de ce pic.

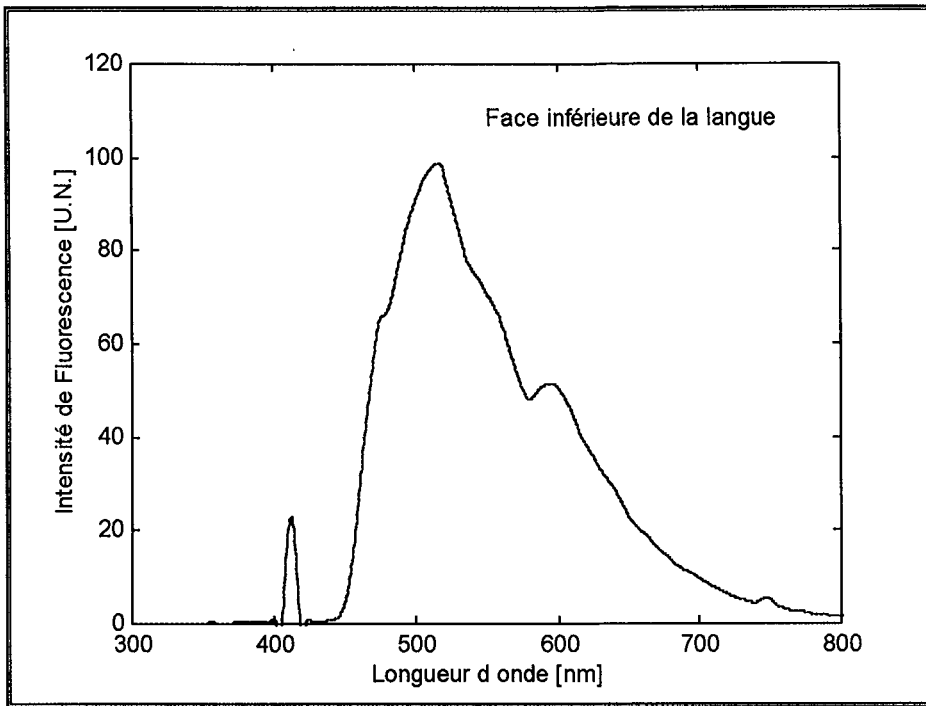


Figure 63 : Spectre moyen d'auto fluorescence mesuré in vivo sur la face inférieure de la langue chez 25 individus sains (laser krypton <415 nm, 10 mW).

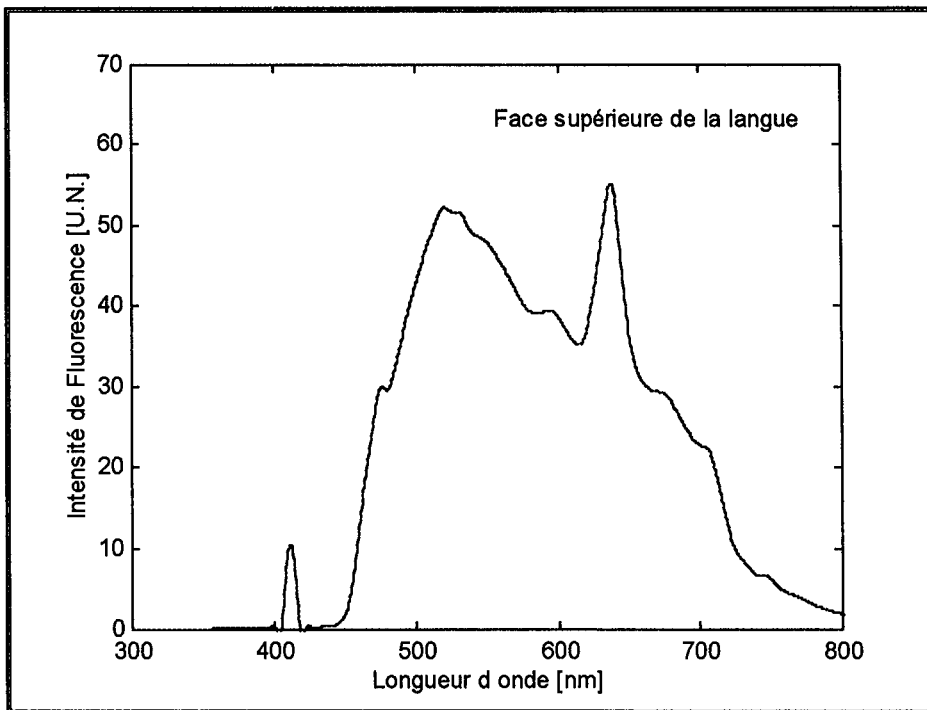


Figure 64 : Spectre moyen d'auto fluorescence mesuré in vivo sur la face supérieure de la langue chez 25 individus sains (laser krypton <415 nm, 10 mW).

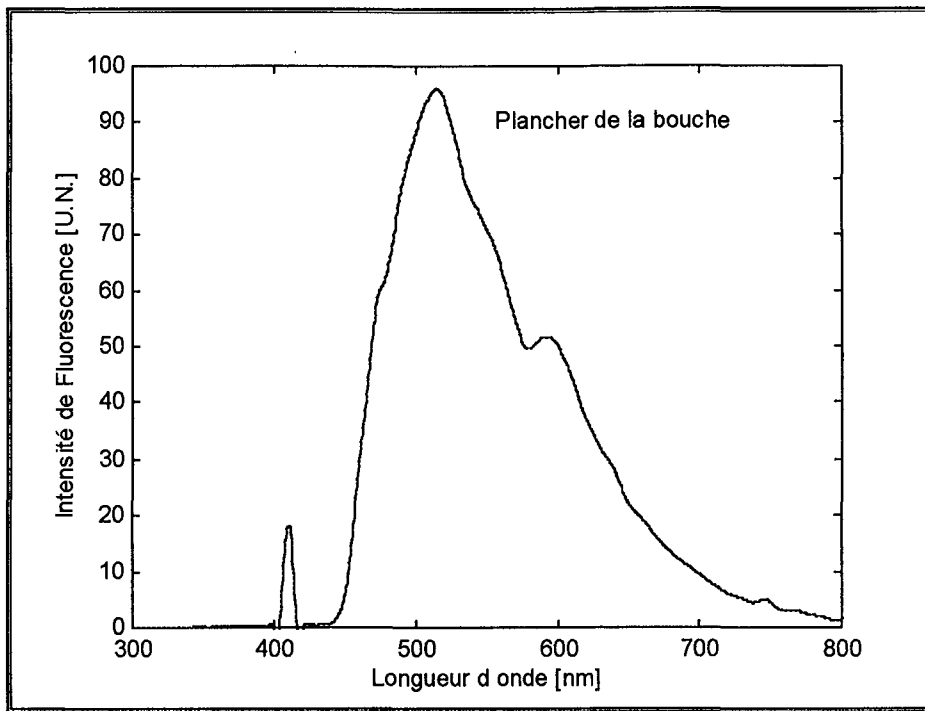


Figure 65 : Spectre moyen d'auto fluorescence mesuré in vivo sur le plancher de la bouche chez 25 individus sains (laser krypton <415 nm, 10 mW).

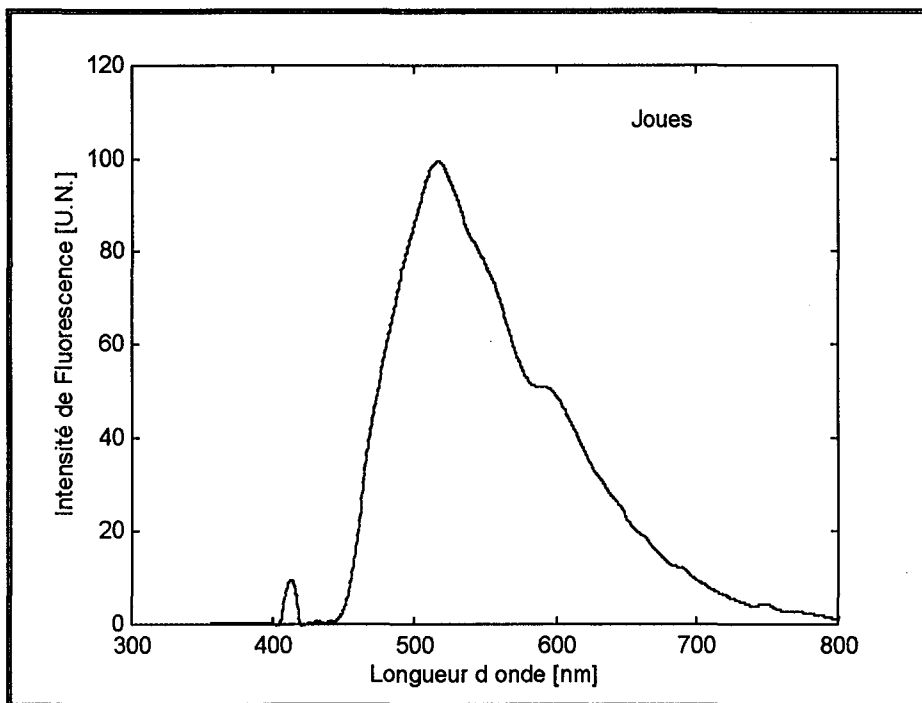


Figure 66 : Spectre moyen d'auto fluorescence mesuré in vivo sur les joues chez 25 individus sains (laser krypton <415 nm, 10 mW).

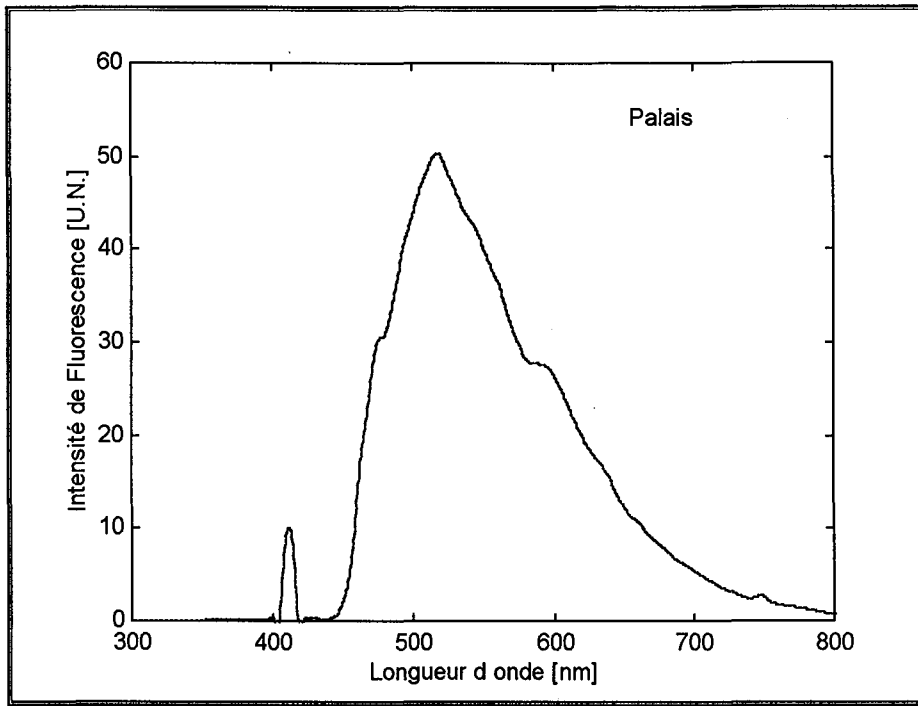


Figure 67 : Spectre moyen d'autofluorescence mesuré in vivo sur le palais chez 25 individus sains (laser krypton <math>< 415 \text{ nm}</math>, 10 mW).

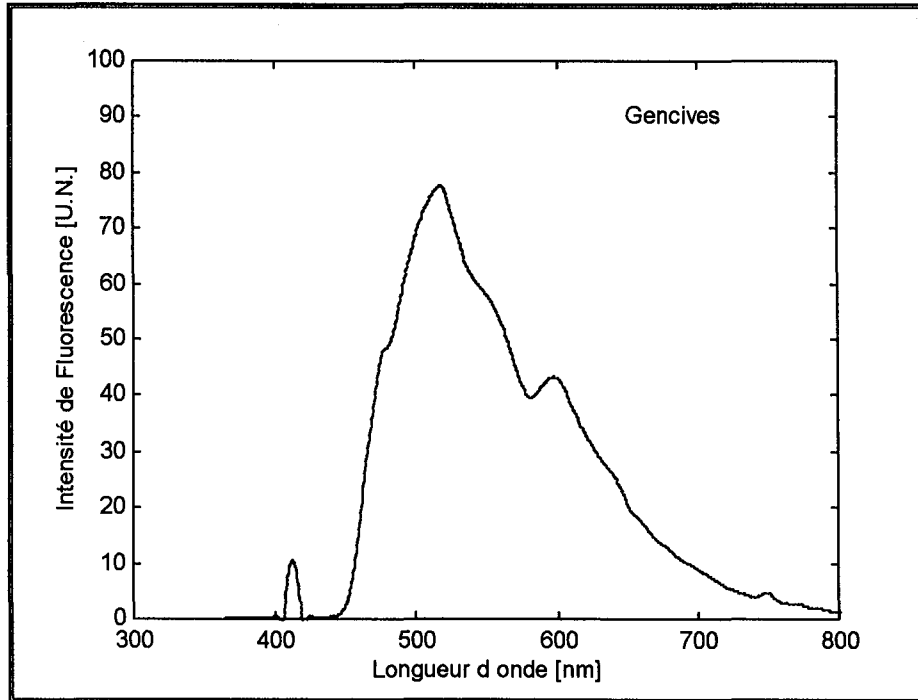


Figure 68 : Spectre moyen d'autofluorescence mesuré in vivo sur les gencives chez 25 individus sains (laser krypton <math>< 415 \text{ nm}</math>, 10 mW).

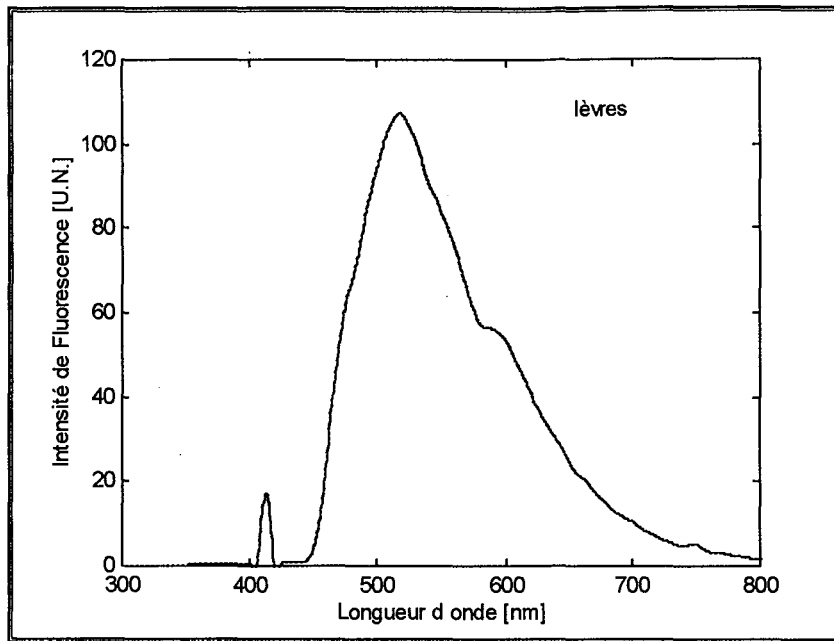


Figure 69 : Spectre moyen d'autofluorescence mesuré in vivo sur les lèvres chez 25 individus sains (laser krypton <415 nm, 10 mW).

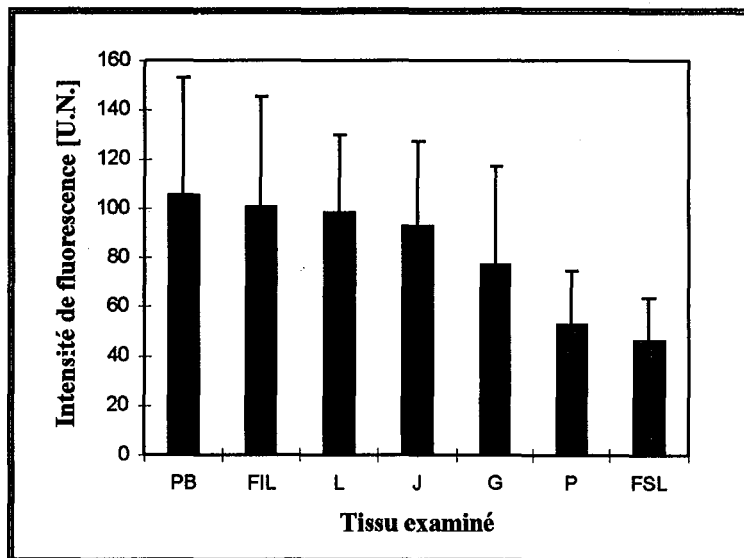


Figure 70 : Intensité de fluorescence à 520 nm en fonction du type de tissu buccal.
L : Lèvres ; FIL : Face inférieure de la langue ; PB : Plancher de bouche ; J : Joues ;
G : Gencives ; P : Palais.

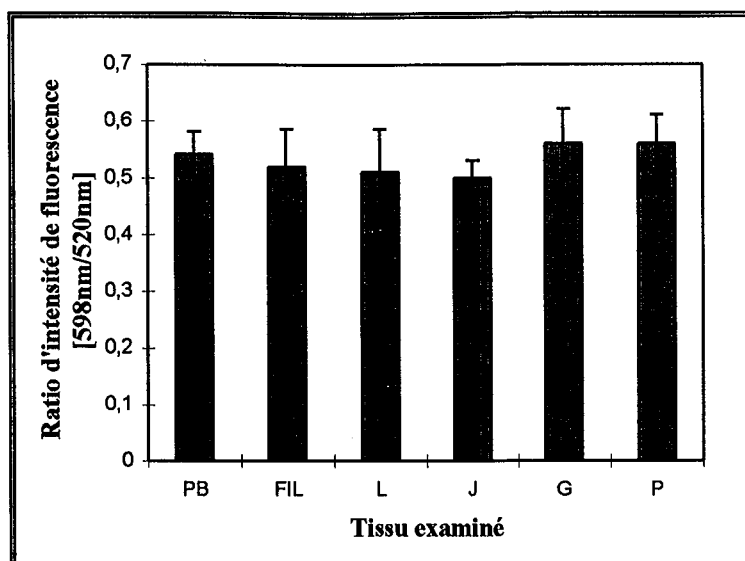


Figure 71 : Intensité relative $[I(598 \text{ nm})/I(520 \text{ nm})]$ en fonction du type de tissu buccal.

L : Lèvres ; FIL : Face inférieure de la langue ; PB : Plancher de bouche ; J : Joues ;
G : Gencives ; P : Palais.

Les spectres mesurés sur des tissus sains et des carcinomes de la voie aérodigestive supérieure montrent une différence de l'intensité et de l'allure spectrale de fluorescence entre ces tissus. Les figures 72 et 73 donnent respectivement des exemples des spectres obtenus sur le plancher de la bouche et l'oro-pharynx. En effet, l'intensité de fluorescence des tissus sains est plus importante que celles des carcinomes. Le ratio de fluorescence, par rapport à la longueur d'onde d'émission maximale à 520 nm, entre les tissus sains et les carcinomes a été calculé. Des ratios compris entre 2,71 et 12,54 avec une valeur moyenne de $6,48 \pm 3,26$ ($n=9$), ont été obtenus pour ce type de lésions. De plus un pic à 635 nm, attribué aux porphyrines endogènes, a caractérisé certains carcinomes du plancher de la bouche, de la face inférieure de la langue et de l'oro-pharynx. D'une façon générale, un élargissement dans la région rouge du spectre de l'autofluorescence des lésions tumorales a été observé. La figure 74 illustre cet élargissement pour un carcinome de l'oro-pharynx comparé au spectre d'un tissu sain environnant. Dans cette figure, on observe la présence d'un spectre qui s'additionne au spectre d'autofluorescence du tissu sain. Ce spectre d'autofluorescence additionnel est attribué aux différentes composantes des porphyrines endogènes. Avec la même longueur d'onde d'excitation, Panjehpour *et al.* ont obtenus des résultats similaires pour les carcinomes de l'œsophage [Panjehpour 1995].

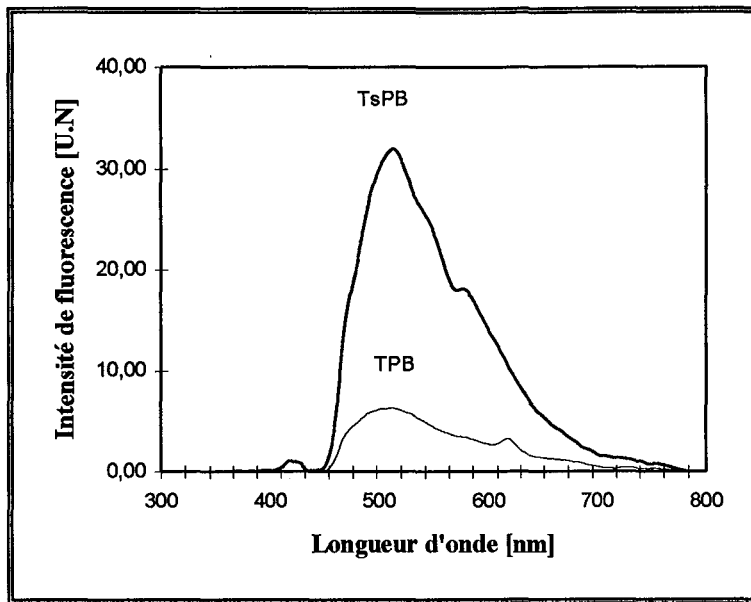


Figure 72 : Spectres d'autofluorescence *in vivo* d'un carcinome épidermoïde de plancher de bouche (TPB) et d'un tissu sain voisin (TsPB). Le ratio d'intensité de fluorescence à 520 nm $R[Ts/t]=5$.

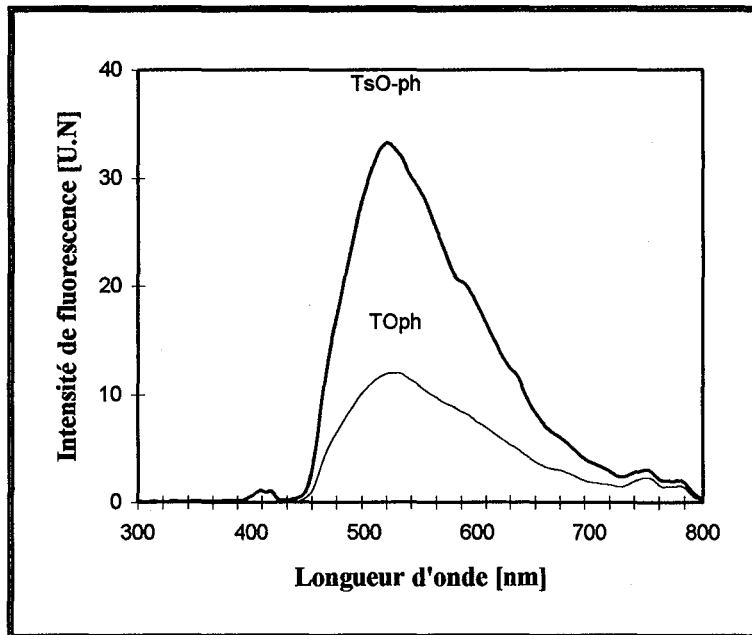


Figure 73 : Spectres d'autofluorescence *in vivo* d'un carcinome épidermoïde de l'oropharynx (TO-Ph) et d'un tissu sain voisin (TsO-Ph). Le ratio d'intensité de fluorescence à 520 nm $R[Ts/t]=3,3$.

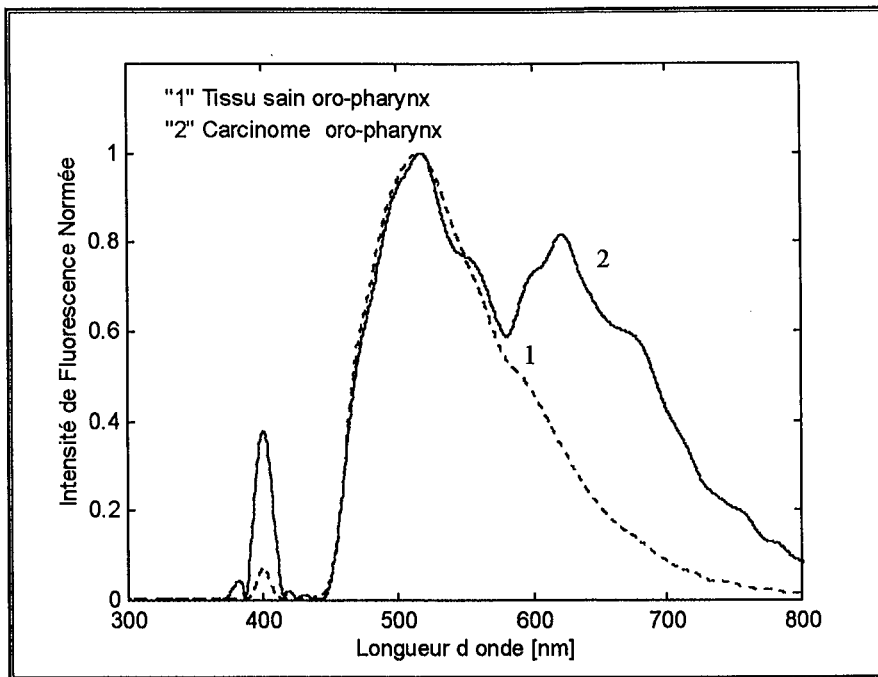


Figure 74 : Spectres d'auto fluorescence in vivo d'un carcinome épidermoïde de l'oro-pharynx et d'un tissu sain voisin (TsO-Ph). La normalisation a été faite par rapport à l'intensité de fluorescence à 520 nm.

Afin d'étudier la possibilité de distinguer les carcinomes de la voie aérodigestive supérieure des tissus sains en se basant sur l'auto fluorescence des porphyrines endogènes, nous avons calculé le ratio d'intensité de fluorescence $[I(635 \text{ nm})/I(520 \text{ nm})]$ pour les spectres des deux types de tissus. Pour les tissus sains, ce ratio variait entre 0,30 et 0,78 avec une valeur moyenne de $0,40 \pm 0,14$ ($n=9$). Il variait entre 0,37 et 0,82 pour les carcinomes avec une valeur moyenne de $0,60 \pm 0,22$ ($n=9$). La figure 75 montre la distribution de ce ratio pour tous les cas étudiés. Sept carcinomes sur 9 pouvait être distingués à partir de ce ratio, 1 carcinome sur 9 avait un ratio équivalent à celui du tissu sain et 1 carcinome sur 9 avait un ratio inférieur à celui du tissu sain. Ces résultats montrent qu'un critère de distinction entre tissu sain et tissu tumoral peut être le ratio d'intensité de fluorescence à deux pics d'émission communs (porphyrines/flavine). Cependant, l'association du ratio d'intensité de fluorescence et du ratio porphyrines/flavine pourrait permettre une distinction optimale des tissus tumoraux. Il convient de préciser que ces carcinomes correspondaient déjà à des tumeurs "massives" et non à des cancers à un stade précoce.

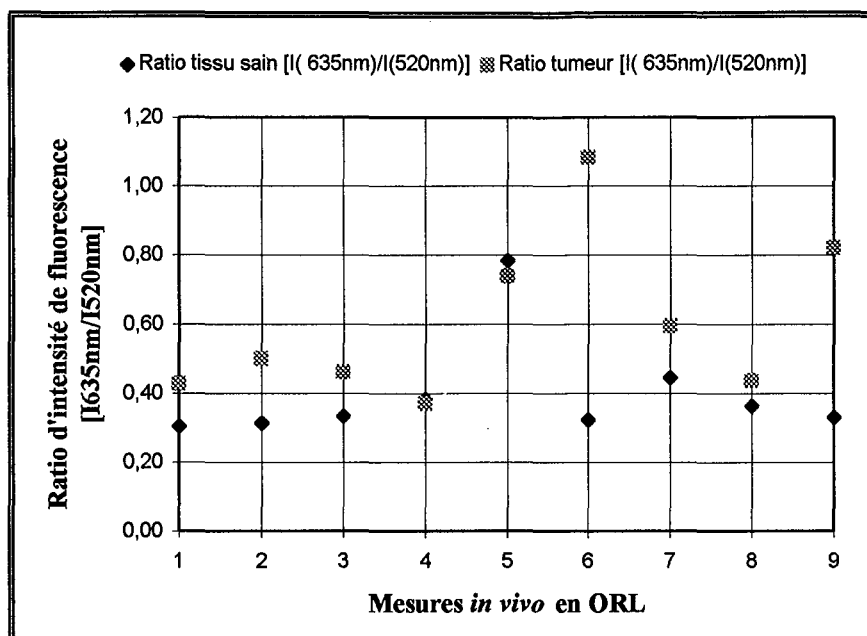


Figure 75 : Ratios d'intensité de fluorescence $[I(635 \text{ nm})/I(520 \text{ nm})]$ des carcinomes épidermoïdes et des tissus sains en fonction des sites examinés.

I.2. UROLOGIE : AUTOFLUORESCENCE DES TISSUS SAINS ET DES TISSUS PATHOLOGIQUES DE LA VESSIE

I.2.1. Matériels et Méthodes

Sujets : 3 patients ayant des lésions radiques (lésions angiodyplasiques ou inflammatoires post radiothérapie) de la vessie et 2 patients ayant des papillomes de la vessie.

Pièces opératoires : 5 pièces opératoires prélevées au cours d'une intervention chirurgicale chez des patients ayant des carcinomes urothéliaux.

Source d'excitation : lampe Xénon filtrée à 400 ou à 410 nm et laser Argon adapté à 364 nm.

Puissance d'excitation : 1 mW

Temps d'acquisition : 1 s/spectre (*in vivo*) et 2 s/spectre (*ex vivo*).

Les mesures *in vivo* ont été réalisées au cours d'un examen cystoscopique. Celles *ex vivo* ont été réalisées dans les 30 minutes suivant l'exérèse.

I.2.2. Résultats et discussion

Les spectres d'autofluorescence de la vessie mesurés *in vivo* avec une excitation de 410 nm montrent des intensités de fluorescence très faibles pour les lésions inflammatoires et angiodyplasiques. Parfois, la fluorescence de ces lésions est nulle. La figure 76A représente les spectres d'autofluorescence d'une lésion radique angiodyplasique et d'un tissu sain environnant. Le spectre d'autofluorescence du tissu sain est caractérisé par un pic majeur autour de 520 nm. Un pic secondaire "bosse" peut être observé autour de 600 nm. Par contre, le spectre de la lésion radique est caractérisé par deux "pics" à 515 et 600 nm. La différence de l'allure spectrale est illustrée sur la figure 76B. Les spectres dans cette figure sont normés à 1 par rapport à la longueur d'onde de 515-520 nm. La différence de l'allure spectrale peut être attribuée à une différence d'absorption de la lumière de fluorescence par l'oxyhémoglobine. En effet, la "vallée" formée entre les pics de 515 et 600 nm correspond à un pic d'absorption de l'oxyhémoglobine. Par spectroscopie de la réflectance diffuse, Bigio *et al.* ont montré que la présence d'une "vallée" à 580 nm dans les spectres de la muqueuse tumorale du col de l'utérus est due à l'absorption de l'hémoglobine [Bigio 1995]. Cependant, le pic de 600 nm ne peut pas être entièrement attribué à l'absorption de l'oxyhémoglobine car l'influence du pic d'absorption à 580 nm sur le spectre d'autofluorescence est beaucoup plus importante que celle du pic d'absorption à 540 nm. Pourtant, les deux pics d'absorption qui coïncident avec le spectre d'autofluorescence sont d'amplitudes (absorbances) identiques et de largeur à mi-hauteur peu différentes (32 nm à 540 nm et 22 nm à 580 nm). Comme dans le cas des carcinomes de la voie aérodigestive supérieure, nous supposons que les porphyrines endogènes ou d'autres fluorophores non identifiés sont à l'origine de ce pic.

La figure 77 montre les spectres d'autofluorescence d'un papillome et d'un tissu sain voisin. Le spectre du papillome est caractérisé par un pic majeur vers 520 nm et un pic secondaire autour de 598 nm. Son allure spectrale est donc similaire à celle de la muqueuse saine de la vessie.

La figure 78 représente les spectres d'autofluorescence d'une lésion radique angiodyplasique, d'un tissu sain et d'un tissu situé dans la zone de jonction. Nous pouvons remarquer que l'intensité de fluorescence décroît graduellement du tissu sain vers la zone anormale.

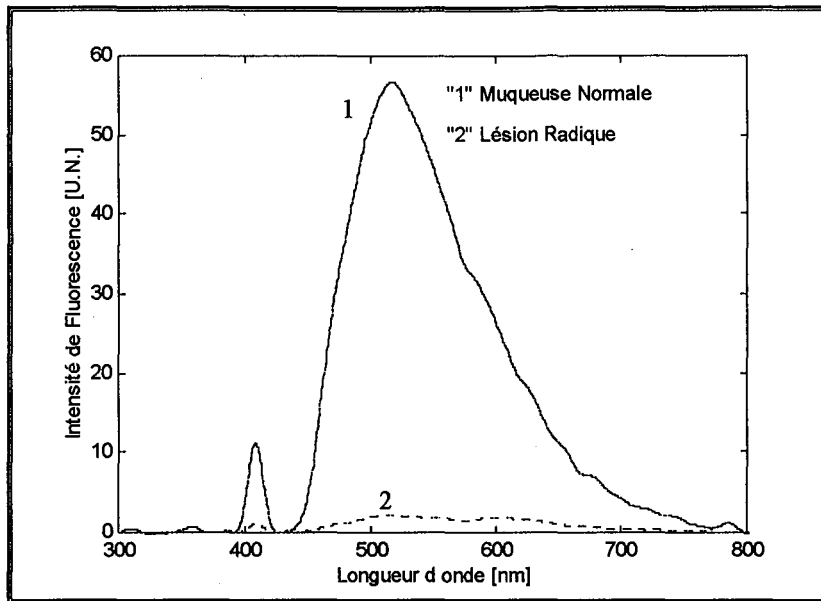


Figure 76A : Spectres d'autofluorescence mesurés in vivo sur une lésion Radique (LRAD) angiodyplasique de la vessie et sur une muqueuse saine voisine (Ts). Le ratio d'intensité de fluorescence à 520 nm $R[Ts/LRAD]=22.5$ (410 nm, 1 mW).

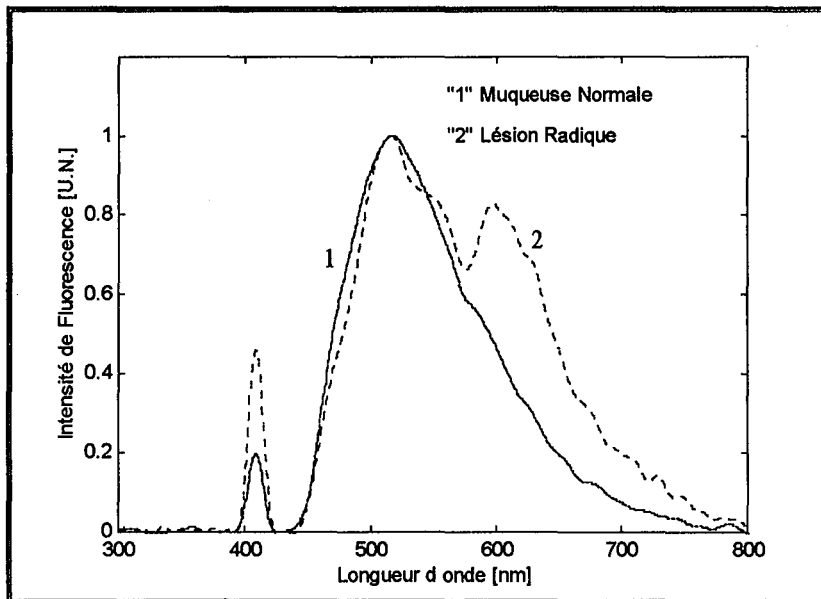


Figure 76B : Spectres d'autofluorescence mesurés in vivo sur une lésion Radique angiodyplasique de la vessie et d'une muqueuse saine voisine (410 nm, 1 mW). Les spectres sont normés à 1 par rapport à la longueur d'onde de 515-520 nm.

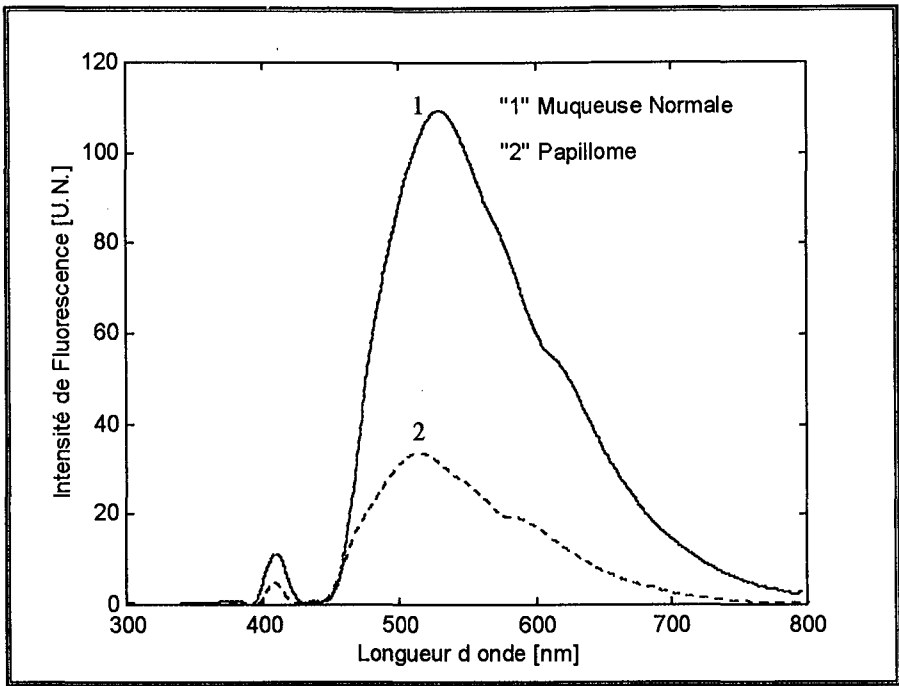


Figure 77 : Spectres d'autofluorescence mesurés in vivo sur un papillome de la vessie et sur une muqueuse saine voisine (410 nm, 1 mW).

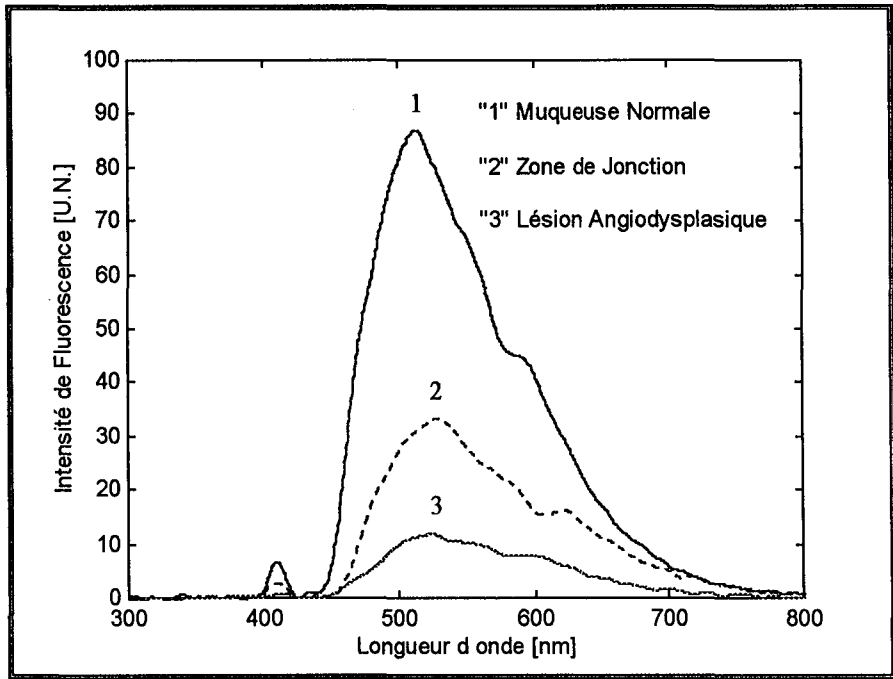


Figure 78 : Spectres d'autofluorescence d'une lésion angiodyplasique, d'une muqueuse saine voisine et de la zone frontière intermédiaire.

Le ratio d'intensité de fluorescence entre tissu sain et tissu pathologique par rapport à la fluorescence des flavines $R = I(520 \text{ nm})_{\text{Tissu sain}} / I(520 \text{ nm})_{\text{Tissu pathologique}}$ était compris entre 5,00 et 22,50 avec une valeur moyenne de $11,20 \pm 6,70$ ($n = 5$). La figure 79 montre la distribution de ce ratio en fonction des cas étudiés. Pour les tissus pathologiques, le ratio d'intensité de fluorescence relative porphyrines/flavines $R = [I(635 \text{ nm}) / I(520 \text{ nm})]$ variait entre 0,32 et 0,76. Il prend une valeur supérieure à 5,00 pour les 3 lésions radiques. Sa valeur moyenne pour les 5 cas étudiés était de $0,52 \pm 0,18$. Par contre, une valeur minimale de 0,27 et une valeur maximale de 0,38 ont été enregistrées pour les tissus sains. La valeur moyenne du ratio était de $0,32 \pm 0,04$ ($n=5$). La figure 80 donne la distribution de ce ratio en fonction des cas étudiés. Ces résultats très préliminaires montrent que les lésions radiques peuvent être distinguées en ce basant sur l'autofluorescence des porphyrines endogènes. Cependant, ce critère ne permet pas de détecter les papillomes de la vessie.

En ce qui concerne les mesures réalisées *ex vivo*, à des excitations de 364 et de 400 nm, sur des muqueuses saines et des carcinomes urothéliaux, les spectres d'autofluorescence ont montré des structures similaires à celles obtenues *in vivo*. Cependant, pour la longueur d'onde d'excitation de 364 nm un pic dû au NADH s'est superposé au spectre mesuré à 400 nm (Figure 81). Un pic secondaire ("bosse") est également apparu vers 410 nm. Il est probablement dû à la réabsorption de l'hémoglobine à 415 nm ou à la fluorescence de l'elastine [Andersson-Engels 1992]. D'autre part, pour une même puissance d'excitation de 1 mw, l'intensité globale de fluorescence mesurée à 364 nm était 1,7 fois supérieure à celle mesurée à 400 nm.

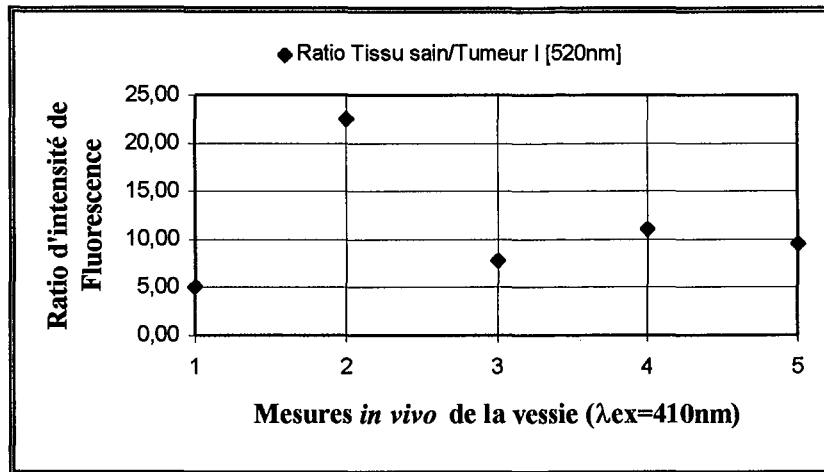


Figure 79 : Ratios d'intensité de fluorescence à 520 nm entre tissu sain (muqueuse) et tissu pathologique de la vessie en fonction des sites examinés in vivo. 1 : lésion radique inflammatoire ; 2 et 5 : lésions radiques angiodyplasiques ; 3 et 4 : papillomes.

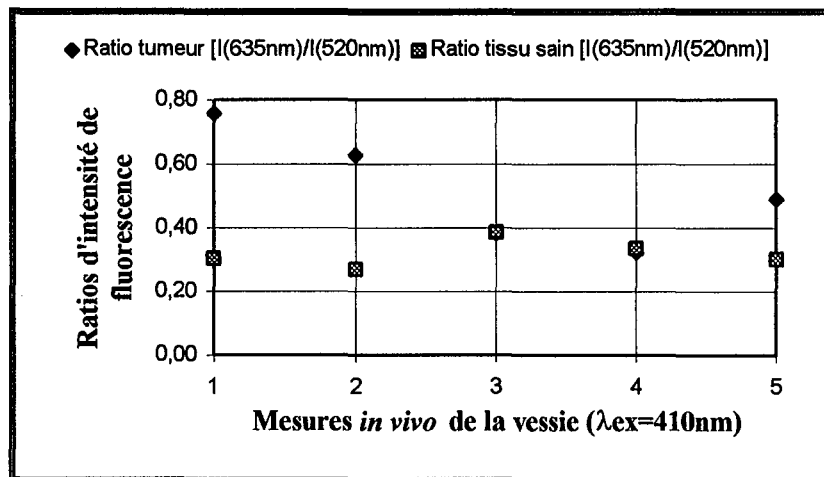


Figure 80 : Ratios d'intensité de fluorescence $[I(635\text{ nm})/I(520\text{ nm})]$ des tissus sains (muqueuses) et tissus pathologiques de la vessie en fonction des sites examinés in vivo. 1 : lésion radique inflammatoire ; 2 et 5 : lésions radiques angiodyplasiques ; 3 et 4 : papillomes.

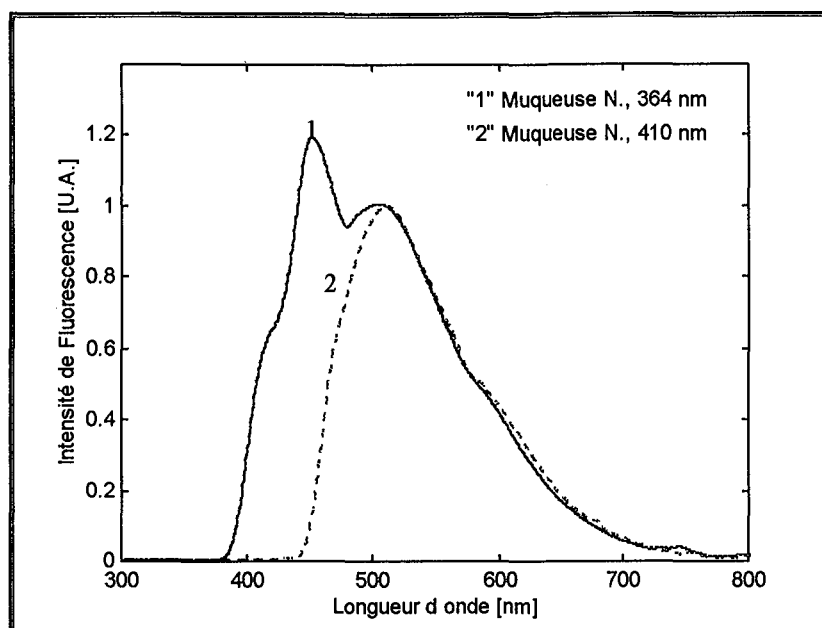


Figure 81 : Spectres d'auto fluorescence mesurés ex vivo sur une muqueuse saine de la vessie à 364 et 410 nm avec une puissance de 1 mW. Les spectres sont normalisés à 1 par rapport à la longueur d'onde de 500-520 nm.

La figure 82A donne un exemple des spectres d'auto fluorescence mesurés sur le carcinome urothélial et la muqueuse saine voisine. Pour les deux longueurs d'onde d'excitation, nous avons observé des structures et des amplitudes différentes entre les tissus examinés. Sur la figure 82B, tous les spectres sont normés à 1 par rapport au pic de fluorescence des flavines (500-520 nm). Sur cette figure, nous observons que le pic du NADH est particulièrement atténué dans le spectre d'auto fluorescence du carcinome mesuré à 364 nm. L'auto fluorescence émise dans la région spectrale comprise entre 380 et 430 nm est fortement réabsorbée par l'oxyhémoglobine dont le pic d'absorption se situe à 413 nm. Cette région d'absorption n'interfère pas avec le spectre d'auto fluorescence mesuré à 400 nm ; les caractéristiques de fluorescence dans la partie gauche (bleu-vert) du spectre n'ont pas été modifiées. Concernant les longueurs d'onde supérieures à 500 nm, des modifications spectrales "vallées" autour de 540 et 580 nm sont apparues sur les spectres du carcinome pour les deux longueurs d'onde d'excitation. En plus de ces modifications, un élargissement spectral centré à 600 nm a caractérisé les spectres du carcinome.

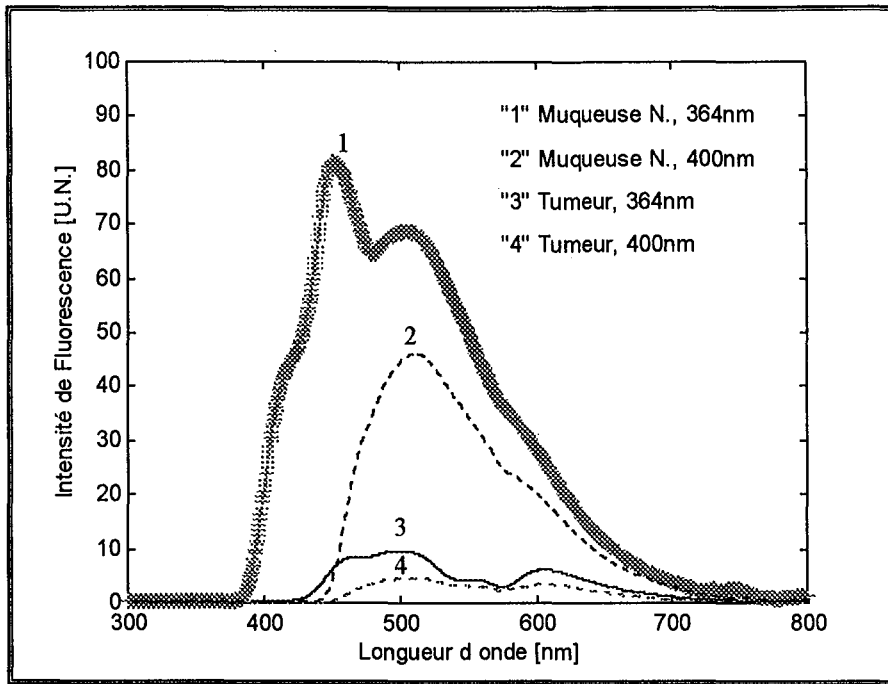


Figure 82A : Spectres d'autofluorescence mesurés ex vivo sur un carcinome urothélial et sur une muqueuse saine voisine à 364 et 400 nm avec une puissance de 1 mW.

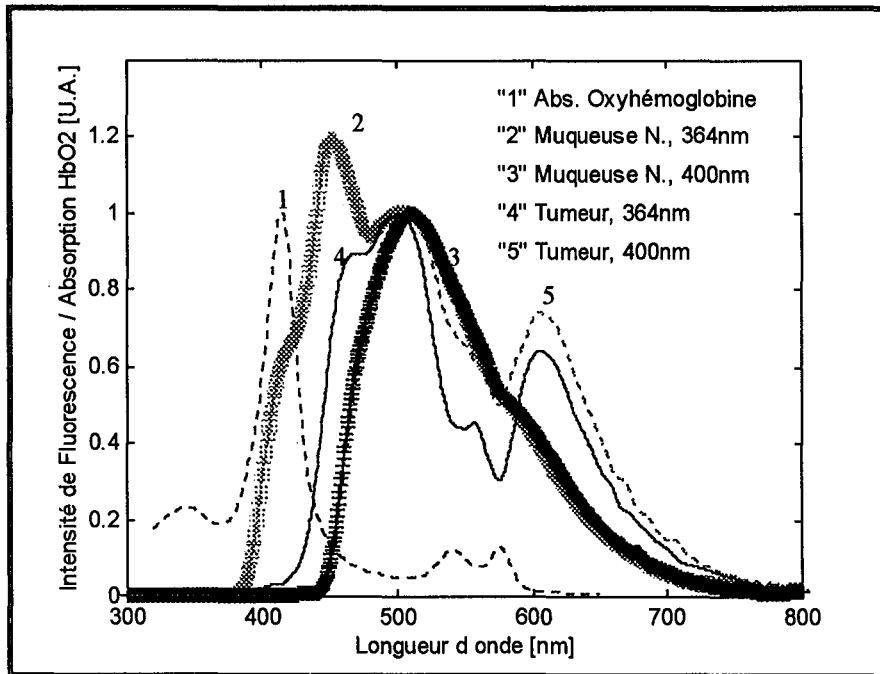


Figure 82B : Spectres d'autofluorescence mesurés ex vivo sur un carcinome urothélial et sur une muqueuse saine voisine à 364 et 400 nm avec une puissance de 1 mW. Les spectres sont normalisés à 1 par rapport aux longueurs d'onde de 500-520 nm et comparé au spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine.

Afin de montrer les différences de l'intensité et de l'allure spectrale entre les tissus sains et les tissus pathologiques de la vessie, nous avons défini les critères suivants pour les longueurs d'onde d'excitation de 364 et 400 nm :

- Ratio d'intensité de fluorescence relative [porphyrines/flavines]
⇒ $R1 = [I(635 \text{ nm})/I(500 \text{ nm})]$, $\lambda_{ex}=364 \text{ nm}$
⇒ $R2 = [I(635 \text{ nm})/I(520 \text{ nm})]$, $\lambda_{ex}=400 \text{ nm}$
- Ratio d'intensité de fluorescence entre tissu sain et tissu pathologique par rapport à la fluorescence des flavines et du NADH
⇒ $R3 = I(500 \text{ nm})_{\text{Tissu sain}}/I(500 \text{ nm})_{\text{Tissu pathologique}}$, $\lambda_{ex}=364 \text{ nm}$
⇒ $R4 = I(450 \text{ nm})_{\text{Tissu sain}}/I(450 \text{ nm})_{\text{Tissu pathologique}}$, $\lambda_{ex}=364 \text{ nm}$
⇒ $R5 = I(520 \text{ nm})_{\text{Tissu sain}}/I(520 \text{ nm})_{\text{Tissu pathologique}}$, $\lambda_{ex}=400 \text{ nm}$
- Ratio d'intensité de fluorescence relative [NADH/flavines] ;
⇒ $R6 = [I(450 \text{ nm})/I(500 \text{ nm})]$, $\lambda_{ex}=364 \text{ nm}$

La figure 83 représente les ratios d'intensité de fluorescence tissu sain/tumeur à 500 nm (R3) et à 450 nm (R4). Ces ratios variaient respectivement de 2,7 à 7,10 avec une valeur moyenne de $4,49 \pm 1,81$ (n=5) et de 2,96 à 13,28 avec valeur moyenne de $7,10 \pm 4,04$ (n=5). La valeur moyenne du ratio R4 est supérieure à celle du ratio R3. Ceci peut être expliqué par des taux d'absorption différents du pic du NADH par l'hémoglobine dans les carcinomes.

La figure 84 représente une comparaison des ratios porphyrine/flavine (R1) et NADH/flavine (R6) calculés sur les spectres des carcinomes et des tissus sains excités à 364 nm. Chacun des deux ratios permet de distinguer 3 carcinomes sur 5. Le ratio R1 prend des valeurs allant de 0,25 à 0,45 (valeur moyenne = $0,35 \pm 0,08$) pour la muqueuse normale et de 0,38 à 0,48 (valeur moyenne = $0,44 \pm 0,06$) pour les carcinomes urothéliaux. Tandis que le ratio R6 prend respectivement des valeurs allant de 0,73 à 1,19 (valeur moyenne = $0,91 \pm 0,32$) et de 0,59 à 0,88 (valeur moyenne = $0,73 \pm 0,14$) pour les muqueuse normales et les carcinomes. Les résultats obtenus indiquent que la distinction des carcinomes des tissus normaux en se basant sur ces ratios n'est pas adéquate. La distinction au moyen du ratio d'intensité de fluorescence est plus pertinente sans être significative.

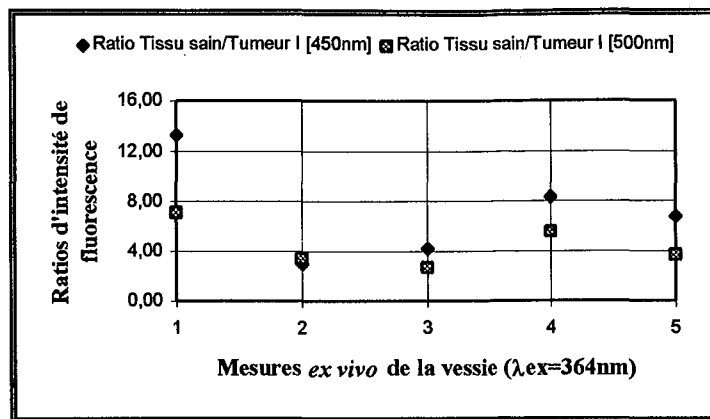


Figure 83 : Ratios d'intensité de fluorescence à 450 et 500 nm entre les tissus sains (muqueuse) et les carcinomes urothéliaux en fonction des cas examinés ex vivo.

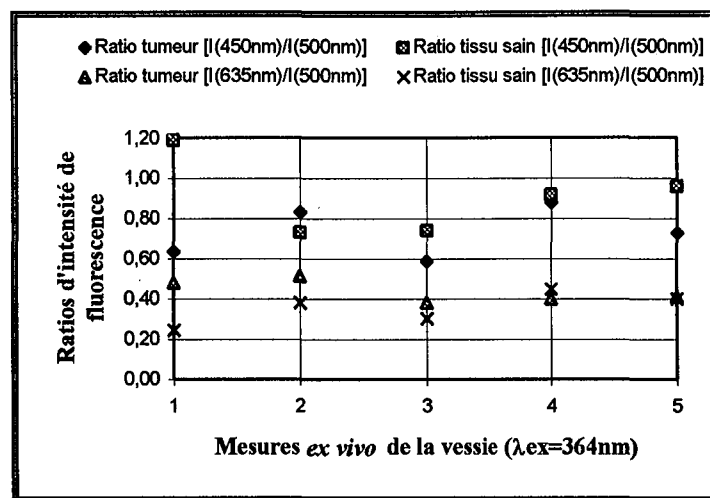


Figure 84 : Ratios d'intensité de fluorescence $[I(450 \text{ nm})/I(500 \text{ nm})]$ et $[I(635 \text{ nm})/I(500 \text{ nm})]$ des tissus sains (muqueuse) de la vessie et des carcinomes urothéliaux en fonction des cas examinés.

Concernant la longueur d'onde d'excitation de 400 nm, le ratio d'intensité de fluorescence entre tissu sain et carcinome par rapport au pic des flavines (R5) était compris entre 2,79 et 9,74 avec une valeur moyenne de $6,27 \pm 4,92$ ($n=5$). La distribution de ce ratio en fonction des cas étudiés est donnée par la figure 85. Le ratio porphyrines/flavine (R2) des tissus sains et des carcinomes permet une meilleure différenciation de ces tissus. Ce ratio variait respectivement entre 0,27 et 0,42 (valeur moyenne = $0,37 \pm 0,06$) et entre 0,45 et 0,66 (valeur moyenne = $0,55 \pm 0,08$) pour les tissus sains et les carcinomes (Figure 86).

Du fait des modifications spectrales de l'autofluorescence causées par la réabsorption de l'oxyhémoglobine pour une excitation de 364 nm, les longueurs d'onde d'excitation de 400 et 410 nm semblent être mieux adaptées à la photodétection des lésions vésicales par autofluorescence. Avec ces longueurs d'onde, les caractéristiques de fluorescence sont peu modifiées par la réabsorption de l'oxyhémoglobine. De plus, les porphyrines endogènes sont plus excitées à ces longueurs d'onde.

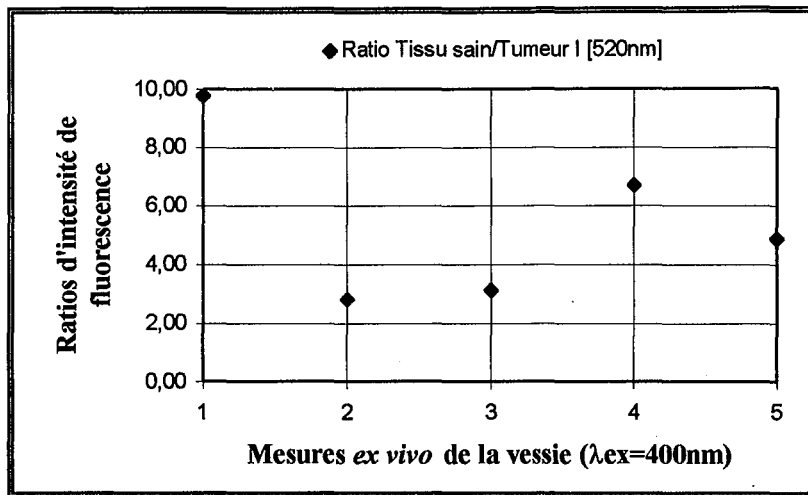


Figure 85 : Ratios d'intensité de fluorescence à 520 nm entre les tissus sains (muqueuse) de la vessie et les carcinomes urothéliaux en fonction des cas examinés.

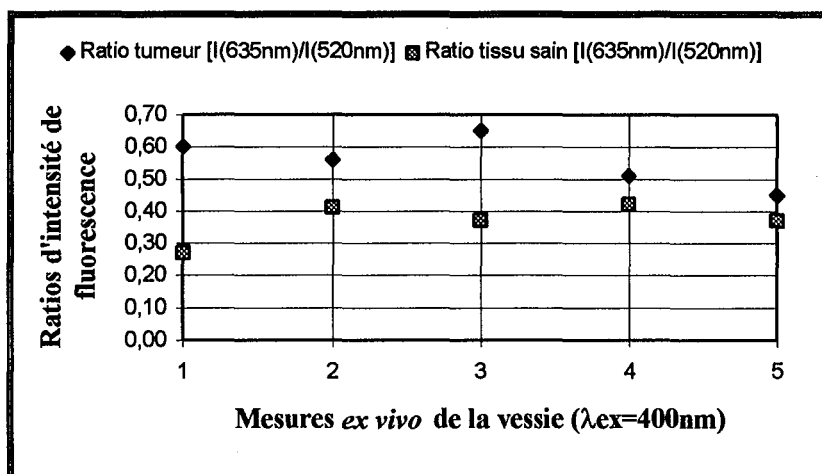


Figure 86 : Ratios d'intensité de fluorescence $[I(635\text{ nm})/I(520\text{ nm})]$ des tissus sains (muqueuse) de la vessie et des carcinomes urothéliaux en fonction des cas examinés.

I.3. PNEUMOLOGIE : AUTOFLUORESCENCE DES TISSUS SAINS ET DES LÉSIONS TUMORALES DES BRONCHES EX VIVO

I.3.1. Matériels et Méthodes

Pièces opératoires : 5 pièces opératoires prélevées au cours d'une intervention chirurgicale chez des patients ayant des carcinomes épidermoïdes bronchiques. Ces pièces concernent deux lobes inférieurs gauches (LIG), un lobe inférieur droit (LID) et deux lobes supérieurs droits (LSD).

Source d'excitation : lampe Xénon filtrée à 410 nm.

Puissance d'excitation : 0,5 mW.

Temps d'acquisition : 2 s/spectre.

Les mesures *ex vivo* ont été réalisées, dans les 30 minutes suivant l'exérèse, au contact du tissu. Un examen histopathologique standard a été réalisé sur les sites examinés.

I.3.2. Résultats et discussion

Les figures 87 (A et B) et 88 (A et B) donnent des exemples des spectres d'autofluorescence des carcinomes épidermoïdes et des tissus bronchiques sains mesurés *ex vivo*. Des ratios de fluorescence [Ts/T], mesurés à 520 nm, de 3,6 à 13 ont été enregistrés. La valeur moyenne des ratios est de $7,93 \pm 4,23$ (n=5). La variation du ratio de fluorescence reflète l'hétérogénéité interindividuelle des cas étudiés, car chaque spectre représente un cas indépendant. En plus de la moindre intensité de fluorescence mesurée sur les carcinomes, les spectres d'autofluorescence ont une allure différente ; ils sont plus larges. En effet, une émission dans le rouge vers les longueurs d'onde d'émission des porphyrines endogènes est observée dans les spectres. Pour mieux illustrer cette différence d'allure, nous avons normé les spectres à 1, par rapport à l'intensité maximale de fluorescence à 520 nm. Les figures 87B et 88B montrent cette différence. Les autres cas étudiés sont caractérisés par les mêmes structures spectrales.

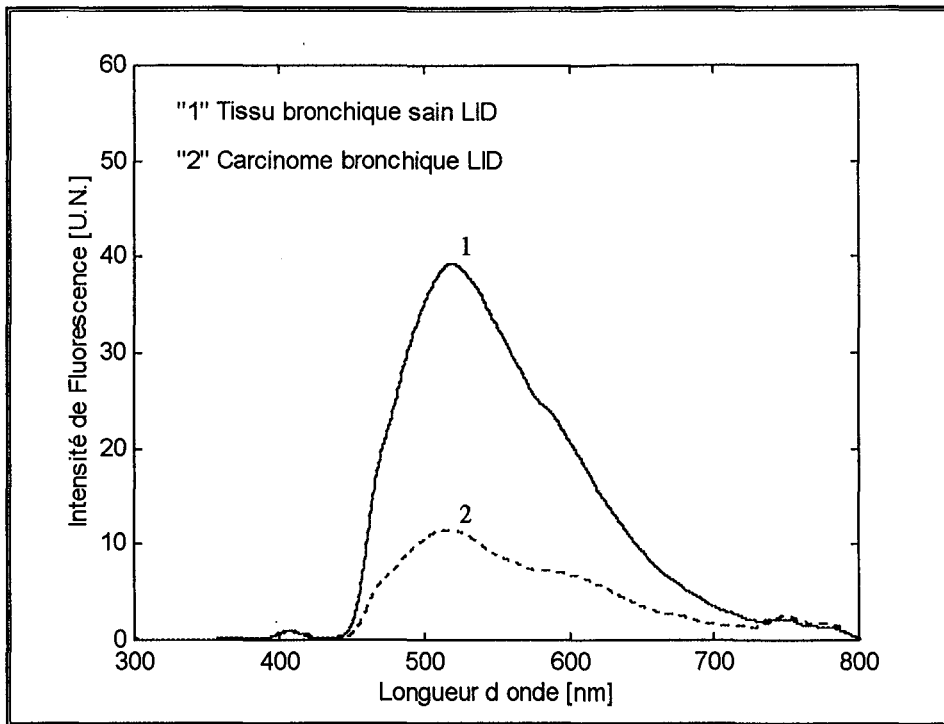


Figure 87A : Spectres d'autofluorescence d'un carcinome épidermoïde bronchique (LID) et d'un tissu sain voisin. Le ratio d'intensité de fluorescence à 520 nm $R[Ts/t]=3,6$.

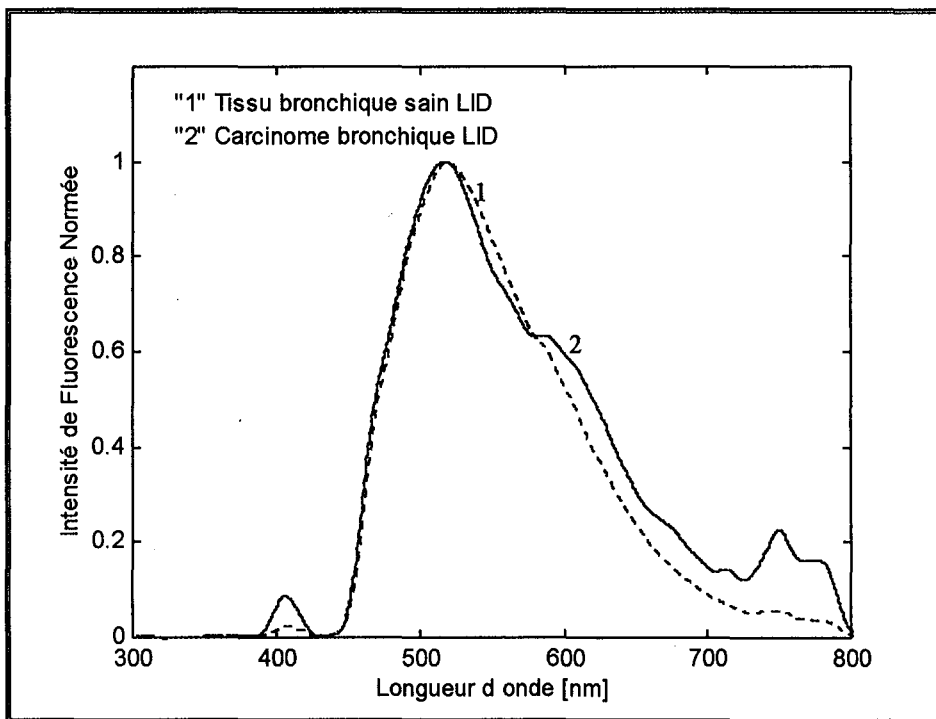


Figure 87B : Spectres d'autofluorescence d'un carcinome épidermoïde bronchique (LID) et d'un tissu sain voisin. Les spectres sont normalisés à 1 par rapport au pic de fluorescence à 520 nm.

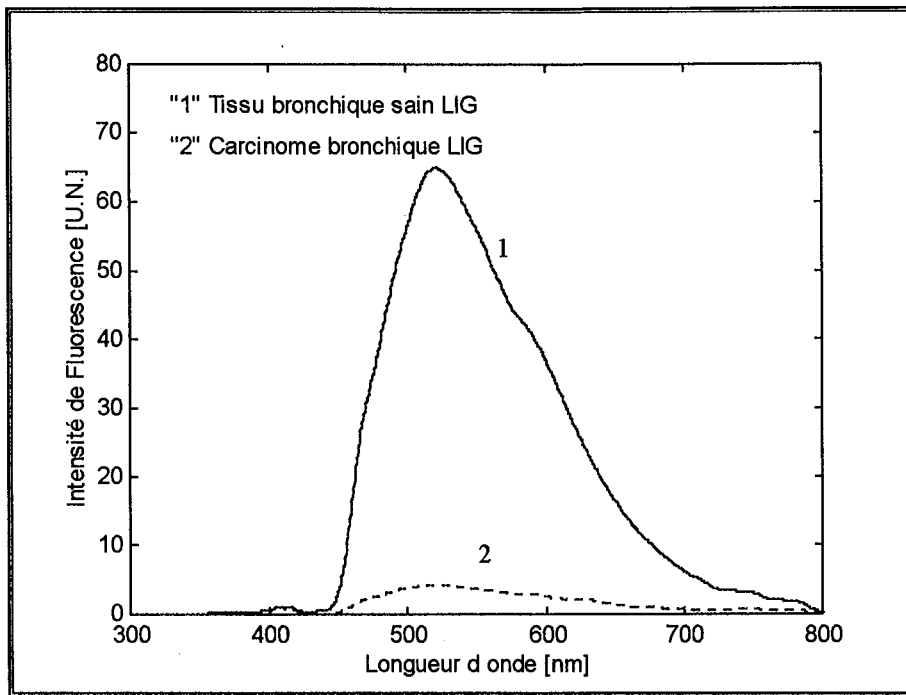


Figure 88A : Spectres d'autofluorescence d'un carcinome épidermoïde bronchique (LIG) et du tissu sain voisin. Le ratio d'intensité de fluorescence à 520 nm $R[Ts/t]=13$.

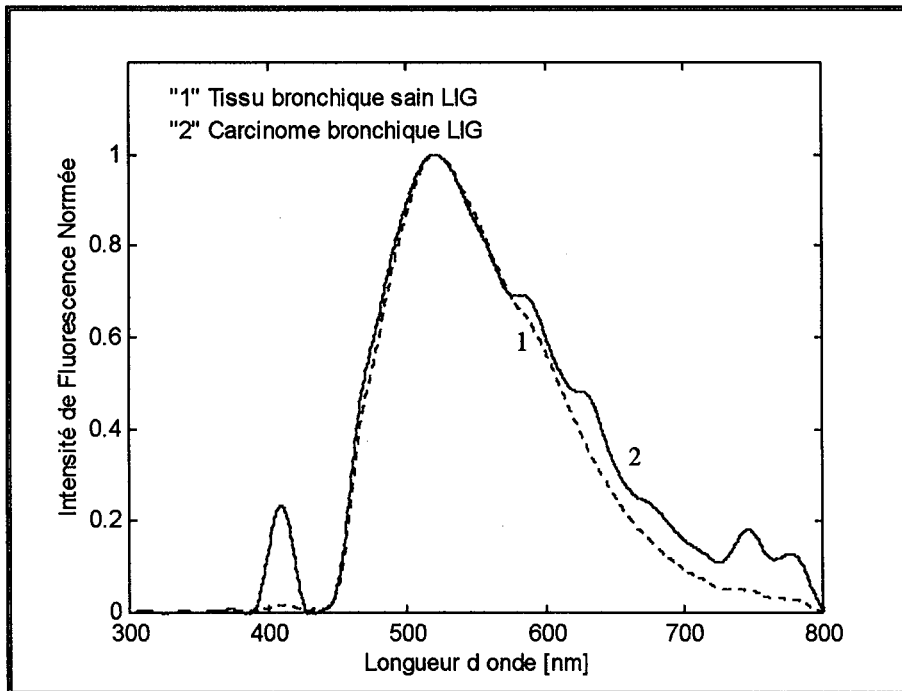


Figure 88B : Spectres d'autofluorescence d'un carcinome épidermoïde bronchique (LIG) et du tissu sain voisin. Les spectres sont normalisés à 1, par rapport à l'intensité à 520 nm.

Pour mettre en évidence la différence de l'allure spectrale entre les tissus bronchiques sains et les carcinomes épidermoïdes et afin de choisir un critère spectral de distinction entre ces tissus, nous avons rapporté l'intensité de fluorescence à 635 nm à l'intensité de fluorescence à 520 nm. Ce ratio a été calculé pour les tissus bronchiques sains et les carcinomes. La figure 89 montre la distribution du ratio en fonction des cas étudiés. Pour les tissus sains la valeur du ratio $R=[I(635\text{ nm})/I(520\text{ nm})]$ était comprise entre 0,35 et 0,56 avec une valeur moyenne de $0,41\pm 0,09$ ($n=5$). Concernant les carcinomes bronchiques le ratio variait entre 0,39 et 1,10 avec une valeur moyenne de $0,68\pm 0,31$. Avec ce ratio, les carcinomes des cinq cas étudiés ont été distingués mais il n'y a pas de différence statistique significative. Cependant, comme pour les cas appartenant aux disciplines de l'O.R.L. et l'Urologie, analysés dans ce travail, la distinction uniquement par rapport à l'autofluorescence des porphyrines endogènes n'est pas suffisante. Comme on peut le constater pour le quatrième cas, le ratio du carcinome prend une valeur quasi équivalente à celle du tissu sain.

Pour une longueur d'onde d'excitation de 405 nm, Hung *et al.* n'ont observé aucune différence d'allure spectrale entre les carcinomes bronchiques et les tissus sain [Hung 1991]. Par contre, les résultats obtenus par Tang *et al.* sont en accord avec nos résultats [Tang 1989]. Le stade des lésions, les différents protocoles de mesures, la variabilité interindividuelle et la sensibilité des systèmes de détection peuvent être à l'origine de la variabilité des résultats obtenus.

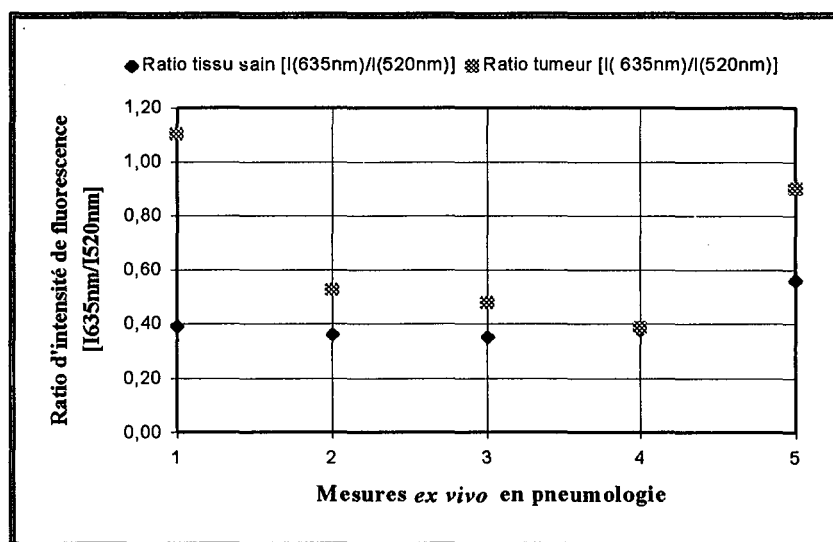


Figure 89 : Ratios d'intensité de fluorescence $[I(635\text{ nm})/I(520\text{ nm})]$ des tissus bronchiques sains et des carcinomes épidermoïdes en fonction des cas examinés.

I.4. ANALYSE GLOBALE DES RESULTATS

La spectroscopie de fluorescence nous a permis de caractériser les tissus de la cavité buccale sur une population de 25 individus. Le coefficient de corrélation de 0,9 obtenu dans cette expérimentation reflète la reproductibilité des mesures. La détection des états pathologiques tissulaires a été également démontrée. Les résultats obtenus à partir des mesures réalisées sur les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures, les carcinomes bronchiques et les carcinomes urothéliaux indiquent la possibilité de différencier ces lésions des tissus normaux en se basant sur leurs spectres d'autofluorescence. En revanche, les spectres d'autofluorescence des lésions inflammatoires et angiodyplasiques de la vessie montrent que la détection des lésions cancéreuses, par cette technique, paraît insuffisante. Ces lésions absorbent fortement la lumière d'excitation ainsi que la lumière de fluorescence. La faible autofluorescence de ces lésions est essentiellement liée à l'absorption de l'hémoglobine.

L'excitation des carcinomes urothéliaux dans l'ultraviolet (364 nm) n'a pas abouti à une distinction optimale de ces lésions par rapport à la longueur d'onde d'excitation de 410 nm. Les spectres d'autofluorescence des carcinomes mesurés à 364 nm ont été modulés par le spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine. L'autofluorescence émise dans la région spectrale comprise entre 380 et 430 nm a été réabsorbée. La modulation des spectres d'autofluorescence mesurés à 410 nm par le spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine était moins importante. Cependant, des modifications spectrales mineures autour de 540 et 580 nm ont été observées.

La photodétection par autofluorescence montre bien une différence entre les tissus normaux et les tissus pathologiques, ce que confirme l'oeil de l'opérateur et l'anatomie pathologique. La différenciation des lésions tumorales uniquement par rapport à l'autofluorescence des porphyrines endogènes paraît non adéquate. Le ratio d'autofluorescence entre tissu sain et tissu tumoral par rapport à un pic de fluorescence commun demeure le critère le plus significatif. Il faut également préciser que les tumeurs étudiées étaient des lésions "massives" et non des cancers précoces ou des états précancéreux.

D'autres expérimentations *in vivo* concernant l'œsophage Barrett sont actuellement en cours d'évaluation. Une étude sur 23 patients a été réalisée avec des longueurs d'onde d'excitation de 330 et 350 nm. Les résultats de cette expérimentation devront nous permettre de définir les critères adéquats de distinction. L'élaboration d'un algorithme de distinction sera basée sur ces critères.

En fait, le problème fondamental reste entier : Existe-t-il une réelle différence biochimique entre cellules saines et cellules tumorales ou entre tissus sains et tissus tumoraux ?

A priori les mesures d'autofluorescence ne montrent qu'une modeste modification structurale pouvant correspondre au domaine des porphyrines endogènes. Enfin la diminution globale de l'autofluorescence est le phénomène principal et ce phénomène ne s'explique pas seulement par l'absorption due à l'hémoglobine, ce d'autant que certaines mesures sont réalisées *ex vivo* sur pièces opératoires exsangues.

Pour ces raisons, une expérimentation sur l'évolution des spectres d'autofluorescence sur des tumeurs expérimentales chimioinduites devraient apporter des informations sur l'influence de la transformation de la peau saine en lésion papillomateuse, puis sur l'apparition de dysplasies et enfin d'un vrai carcinome infiltrant.

II. ETUDE EXPERIMENTALE DE L'INFLUENCE DES PARAMETRES OPTIQUES DES TISSUS SUR LE SIGNAL DE FLUORESCENCE

Le spectre de fluorescence d'un fluorophore isolé diffère de celui mesuré dans un milieu tissulaire, car la distribution de la lumière d'excitation et de la lumière de fluorescence est affectée par les paramètres optiques du milieu. Il diffère aussi au sein d'un même tissu. La concentration de l'hémoglobine dans les tissus est généralement plus importante que celle des fluorophores endogènes. Elle est estimée entre 1 et 10 $\mu\text{g/g}$ [Okunaka 1987]. Par conséquent, les longueurs d'onde d'excitation dans le bleu, correspondant au maximum d'absorption de l'hémoglobine, seront plus absorbées par ce dernier que par les fluorophores endogènes. L'absorption de la lumière d'excitation par l'hémoglobine devient plus importante lorsque le tissu exploré est fortement vascularisé. Ceci peut être l'un des facteurs aboutissant à la diminution de l'intensité de fluorescence dans les lésions tumorales.

Afin de mettre en évidence l'influence des paramètres optiques des tissus sur le signal de fluorescence nous avons réalisé une expérimentation sur fantômes simulant l'autofluorescence, l'absorption et la diffusion des tissus.

II.1.1. Matériels et méthodes

Les fantômes ont été conçus de façon à simuler l'évolution de l'autofluorescence dans des milieux présentant des propriétés optiques diverses. Pour reproduire l'autofluorescence tissulaire à une excitation de 410 nm, nous avons choisi la flavine mononucléotide « FMN riboflavin-5'-phosphate », (F-8399, SIGMA, USA). L'absorption des tissus a été simulée par le rouge de méthyle (SIGMA, USA). Ce colorant possède une bande d'absorption centrée autour de 432 nm à pH de 6,2 (Figure 90). Du fait que sa bande d'absorption est assez large, le rouge de Méthyle peut à la fois simuler l'absorption due à l'oxyhémoglobine et à la mélanine. Son spectre d'absorption a été mesuré par un spectromètre Lambda Bio (U.V./Visible, Perkin Elmer). Le coefficient d'extinction molaire du rouge de Méthyle calculé à 410 nm s'élève à $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. L'utilisation d'intralipides 20% (Kabi Phramacia, France) a été nécessaire pour reproduire la diffusion des tissus. En effet, les solutions d'intralipides sont composées du glycérol, de la lécithine, de l'huile de soja et de l'eau.

Le glycérol est dissout en molécules individuelles dans l'eau et ne diffuse pas la lumière. Le phénomène de diffusion provient donc des huiles de soja encapsulées dans une membrane à couche unique de lécithine d'épaisseur approximative de 2,5-5 nm [Abdul-Nour 1994, Royston 1996].

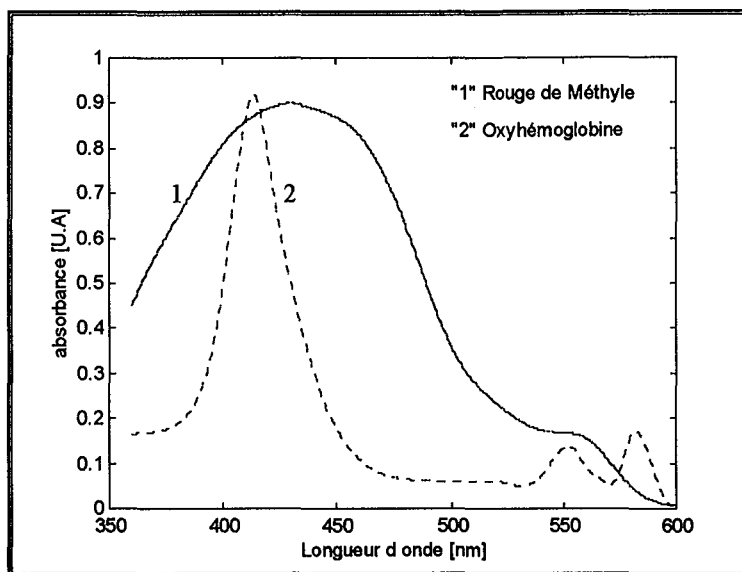


Figure 90 : Spectre d'absorption du rouge de méthyle comparé au spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine.

A base de ces trois composantes nous avons réalisé 5 types de fantômes dans lesquels la concentration de flavine reste constante (Tableau 9). Pour étudier la dépendance de l'intensité de fluorescence des coefficients optiques des tissus, nous avons alternativement varié les concentrations d'intralipides et de rouge de Méthyle. Les dilutions ont été faites dans du PBS et mises dans des cuves en plastique.

Tableau 9 : Composition des fantômes utilisés pour simuler l'autofluorescence, l'absorption et la diffusion de la lumière dans les tissus.

Type de fantôme	Flavine [$\mu\text{g/ml}$]	Intralipides [$\mu\text{g/ml}$]	Rouge de méthyle [$\mu\text{g/ml}$]
1	5	0	10, 20, 30, 40 et 50
2	5	20, 40, 60, 80 et 100	0
3	5	20, 40, 60, 80 et 100	10
4	5	20, 40, 60, 80 et 100	50
5	5	60	10, 20, 30, 40 et 50

Les mesures des spectres de fluorescence ont été réalisées à l'aide de notre système expérimental dans les conditions suivantes :

Source d'excitation : lampe Xénon filtrée à 410 nm.

Puissance d'excitation en sortie de fibre optique : 0,7 mW.

Temps d'acquisition : 1 s/spectre.

Normalisation : les spectres de fluorescence ont été normalisés par rapport à la puissance de la lumière d'excitation rétrodiffusée.

Le capteur a été placé au contact de la surface des solutions. Le spectre final de chaque solution constitue le spectre moyen de 4 mesures. Des mesures de référence ont été réalisées sur :

- * des cuves contenant uniquement du PBS ;
- * des cuves contenant 5 µg/ml de la flavine diluée dans du PBS ;
- * des cuves contenant 50 µg/ml d'intralipides dilués dans du PBS ;
- * des cuves contenant 20 µg/ml de rouge de Méthyle dilué du PBS.

II.1.2. Résultats et discussion

Les mesures des spectres de fluorescence sur les solutions de références n'ont révélé aucune fluorescence observable des cuves en plastique, contenant uniquement du PBS ou du rouge de Méthyle dilué dans du PBS. L'intensité de fluorescence de la solution 5 µg/ml de flavine, à 540 nm a été désignée comme l'intensité de référence I_0 . Les Intralipides émettaient une fluorescence similaire à celle de la flavine mais avec une structure spectrale plus large (Figure 91). Grâce à cette différence de largeur, nous avons pu séparer la fluorescence des Intralipides de celle de la flavine pour les fantômes de types 2, 3, 4 et 5. Pour cela, nous avons utilisée une méthode des moindres carrés linéaire non négative (non negative least squares). Le spectre de fluorescence globale (S_g) d'une solution contenant intralipides et flavine peut être donné par une combinaison linéaire, telle que :

$$S_g = a \cdot S_{\text{Intralipides}} + b \cdot S_{\text{Flavine}}$$

où a et b sont des coefficients de proportionnalité liés à la concentration. Pour chaque type de fantôme, la fluorescence des intralipides a été séparée. Seule la fluorescence de la flavine a été prise en compte dans l'analyse.

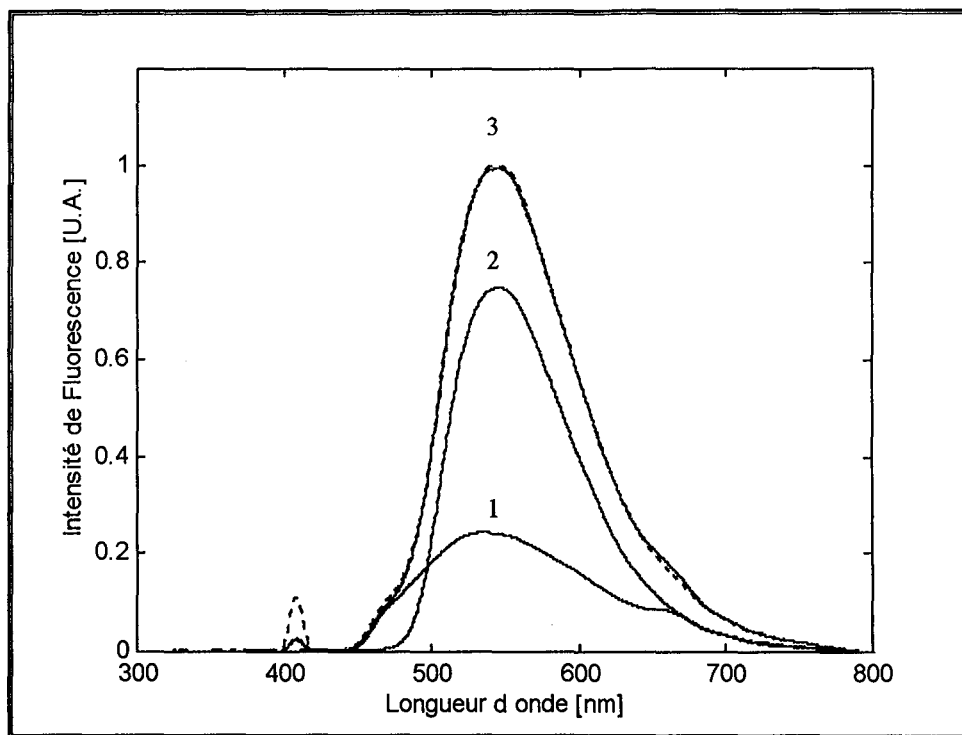


Figure 91 : Spectres de fluorescence d'intralipides (1) et de flavine (2) décomposés à partir du spectre global (3).

II.1.2.1. Dépendance du coefficient d'absorption.

Dans ce cas nous avons utilisé le premier type de fantômes (Flavine + Rouge du Méthyle). La figure 92 montre que l'intensité de fluorescence, rapportée à l'intensité de fluorescence du fluorophore isolé, décroît d'une façon linéaire en fonction de la concentration du rouge méthyle. Ainsi, en comparaison avec un milieu tissulaire, le signal de fluorescence est maximal pour des faibles valeurs de Σ_a .

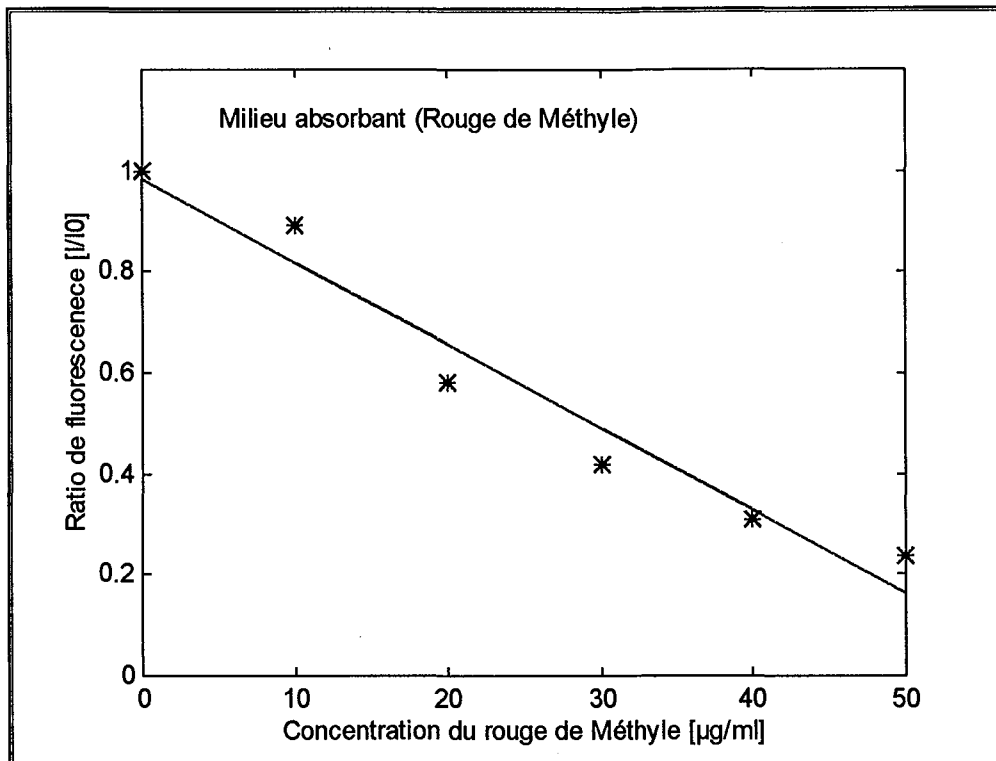


Figure 92 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration du rouge de méthyle.

II.1.2.2. Dépendance du coefficient de diffusion

Le deuxième type de fantômes simule uniquement la diffusion tissulaire. La concentration d'intralipides varie entre 20 et 100 $\mu\text{g/ml}$. Le ratio d'intensité de fluorescence I/I_0 prend des valeurs maximales pour les concentrations comprises entre 20 et 60 $\mu\text{g/ml}$, au-delà de ces concentrations, l'intensité de fluorescence diminue progressivement (Figure 93). Ceci indique qu'à partir d'une certaine valeur du coefficient de diffusion Σ_s , le signal de fluorescence n'est plus guidé par le capteur, car la densité photonique au niveau du capteur est plus faible. Pour de grandes valeurs de Σ_s , la fluorescence est diffusée dans toutes les directions ; la géométrie du capteur (son cône d'acceptance) capte une moindre proportion de la fluorescence émise.

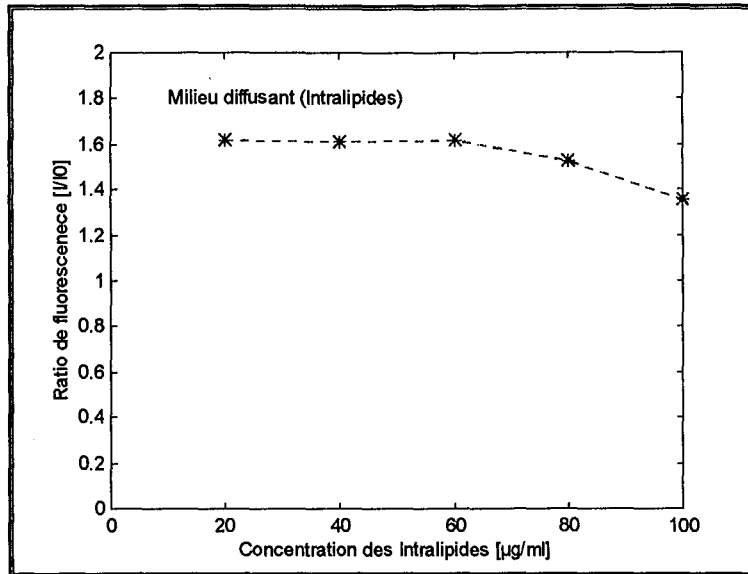


Figure 93 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration des intralipides.

II.1.2.3. Dépendance de l'absorption et de la diffusion réunies

Quand le rapport diffusion/absorption est élevé, pour une faible absorption, l'intensité de fluorescence est maximale. La figure 94 montre l'influence du coefficient de diffusion sur l'intensité de fluorescence en fixant la concentration du rouge de méthyle à 10 µg/ml puis à 50 µg/ml. L'intensité de fluorescence, dans les deux cas, croît quand le rapport Σ_s/Σ_a augmente. Elle atteint un plateau quand l'absorption est forte (50 µg/ml).

Comme le montre la figure 95, aucun changement de l'allure spectrale n'est observé. Ceci peut être dû au fait que l'intersection entre le spectre d'absorption du rouge de méthyle et le spectre de fluorescence de la flavine est faible.

Les résultats obtenus dans cette expérimentation indiquent que la variabilité de l'intensité de fluorescence entre les tissus sains et les tissus pathologique est fortement tributaire de la variabilité d'absorption de la lumière d'excitation par l'hémoglobine. Les faibles intensités de fluorescence observées dans les lésions inflammatoires et angiodyplasiques de la vessie donnent un exemple concret de l'importance de l'absorption par l'hémoglobine de la lumière d'excitation et du signal de fluorescence.

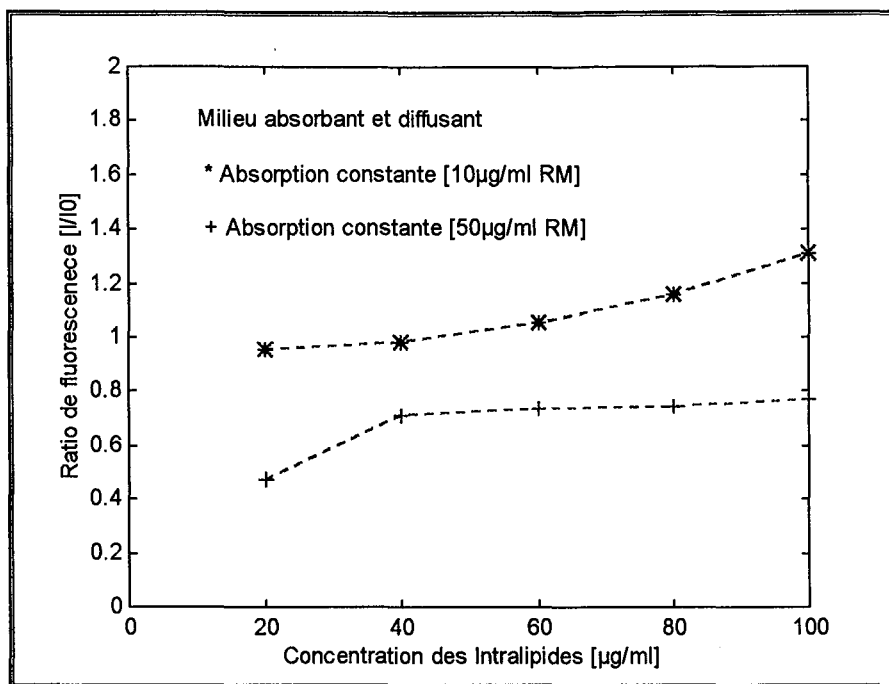


Figure 94 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration des Intralipides et du rouge de méthyle (RM).

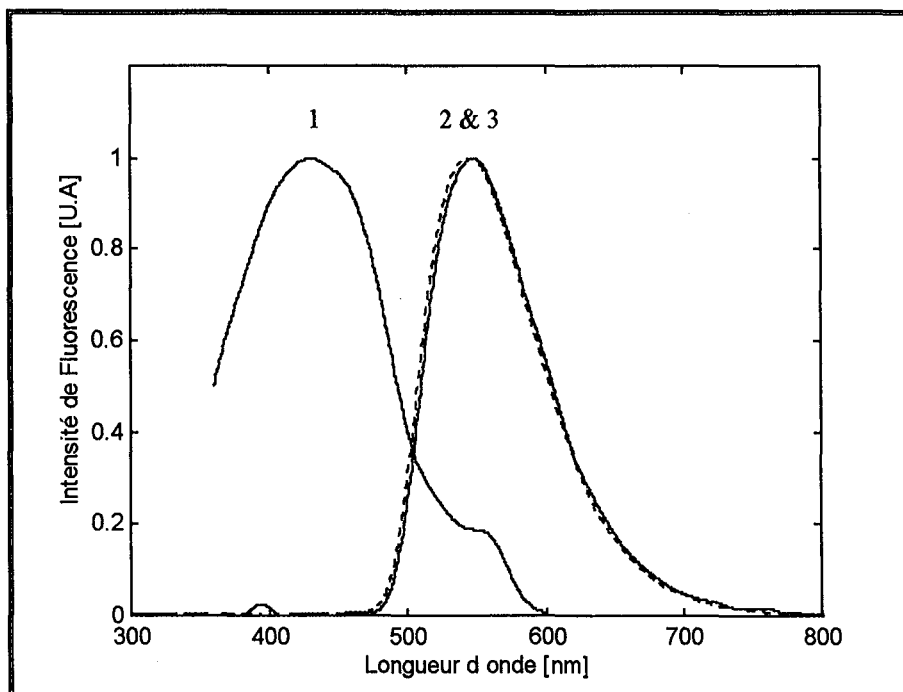


Figure 95 : Influence de la réabsorption du rouge de méthyle sur l'allure du spectre de fluorescence. 1: spectre d'absorption du rouge de méthyle, 2 et 3: spectres de fluorescence de flavin pure (5 µg/ml) et de flavine (5 µg/ml) associée à 50 µg/ml du rouge de méthyle.

III. PHARMACOCINETIQUE DES PHOTOSENSIBILISANTS EMPLOYES EN THERAPIE PHOTODYNAMIQUE

La spectroscopie de fluorescence étant une technique semi-quantitative, elle permet de suivre l'évolution de la répartition du photosensibilisant dans l'organisme en temps réel et *in vivo*. Le ratio de l'intensité de fluorescence induite dans la tumeur par rapport à l'intensité de fluorescence induite dans le tissu sain environnant, en fonction du temps après injection, est le paramètre qui permet d'optimiser l'intervalle de temps entre l'injection du photosensibilisant et le traitement photodynamique. Ce paramètre étant représentatif de la concentration intratumorale du photosensibilisant, il détermine à quel moment la quantité de photosensibilisant dans la tumeur est plus importante que dans les tissus sains. L'intervalle de temps correspondant au ratio maximal est l'un des paramètres qui participe à l'optimisation de l'efficacité de la thérapie photodynamique. Il mesure également le moment où la quantité de photosensibilisant dans la tumeur est la plus élevée (indépendamment de ce qui se passe dans les tissus sains).

La photodétection des lésions tumorales par fluorescence induite découle de la même méthode. En effet, elle doit être effectuée au moment où la sélectivité du photosensibilisant (le ratio de concentration tumeur/tissu sain) est maximale.

Dans ce chapitre, nous analysons la pharmacocinétique de la mTHPC et de l'HpD sur souris "hairless" porteuses de papillomes induits par voie chimique et sur souris nues porteuses de tumeurs HT29.

III.1. CINETIQUES DE L'HPD ET DE LA MTHPC SUR SOURIS "HAIRLESS" PORTEUSES DE PAPILLOMES CUTANES INDUITS PAR VOIE CHIMIQUE.

III.1.1. Matériels et Méthodes

Modèle animal : souris hairless femelles (SKH-1) porteuses de tumeurs cutanées induite par voie chimique (Laboratoire d'Hématologie, Physiologie et Biologie Cellulaire, Nancy) [Bossu 1997].

Photosensibilisants : l'Hématoporphyrine dérivée (HpD) est diluée à partir de solutions à 5 mg/ml (Laboratoire d'Hématologie, Physiologie et biologie Cellulaire, Nancy). Ses pics d'excitation et d'émission maximaux sont respectivement situés à 400 et 630 nm. La Méta-tétra (m-hydroxyphényl) chlorine (mTHPC) obtenue par Scotia Pharmaceuticals (Guildford, UK) sous forme de poudre est diluée dans un mélange de polyéthylène glycol et d'éthanol et conservée dans des aliquots à 3,5 mg/ml. Les pics d'excitation et d'émission maximaux de la mTHPC sont respectivement situés à 420 et 652 nm.

Les souris sont injectées de 5 mg/kg d'HpD par voie intrapéritonéale. L'étude de la fluorescence est réalisée sur des tissus sains (peau) et tumoraux (papillomes) avant injection de l'HpD et 4h, 8h, 24h, 48h, 72h et 96h après l'injection. Le même protocole est suivi pour l'étude des cinétiques de la mTHPC mais à une dose de 0,3 mg/kg.

Source d'excitation : lampe Xénon filtrée à 410 nm.

Puissance d'excitation : 1 mW.

Temps d'acquisition : 0,5 s/spectre.

Normalisation : les spectres de fluorescence induite sont normalisés par rapport aux spectres d'autofluorescence mesurés avant l'injection du photosensibilisant en se référant au pic d'émission à 520 nm située en dehors de la région spectrale d'émission du photosensibilisant. Les spectres d'autofluorescence étant normalisés par rapport à la puissance d'excitation rétrodiffusée, l'échelle des spectres de la fluorescence induite est identique à celle des spectres de l'autofluorescence.

D'autre part, afin d'expérimenter la longueur d'onde d'excitation de 364 nm à des fins diagnostiques, les spectres d'autofluorescence des tissus sains et des papillomes ont été mesurés.

III.1.2. Résultats et discussion

Après normalisation des spectres de fluorescence, nous avons étudié l'évolution de la concentration de l'HpD et de la mTHPC en fonction du temps après injection. Les ratios d'intensité de fluorescence entre tumeurs et tissus sains à la longueur d'onde d'émission maximale de l'HpD [$I_{630 \text{ nm}}(\text{Tumeur})/I_{630 \text{ nm}}(\text{Tissu normal})$] et de la mTHPC [$I_{652 \text{ nm}}(\text{Tumeur})/I_{652 \text{ nm}}(\text{Tissu normal})$]

ont été calculés (Tableaux 10 et 11). Les résultats sont donnés sous forme de moyenne de 9 points de mesure \pm l'écart type (3 points de mesure/site tissulaire/souris).

Tableau 10 : Ratios d'intensité de fluorescence à 630 nm [tumeur/peau saine] à différents temps après injection intrapéritonéale (i.p.) de 5 mg/kg d'HpD chez des souris "hairless" porteuses de papillomes chimioinduits.

Temps après injection [Heures]	4	8	24	48	72	96
Ratio \pm Ecart-type	2,23 \pm 1,73	2,05 \pm 0,54	3,65 \pm 1,45	6,17\pm2,75	4,79 \pm 4,08	3,84 \pm 1,77

Tableau 11 : Ratios d'intensité de fluorescence à 652 nm [tumeur/peau saine] à différents temps après injection intrapéritonéale (i.p.) de 0,3 mg/kg de mTHPC chez des souris "hairless" porteuses de papillomes chimioinduits.

Temps après injection [Heures]	4	8	24	48	72	96
Ratio \pm Ecart-type	1,73 \pm 0,9	3,67 \pm 0,09	3,53 \pm 0,98	4,41 \pm 2,3	5,1\pm1,65	4,03 \pm 0,71

Les histogrammes des figures 96 et 97 montrent respectivement l'évolution de la sélectivité tumorale de l'HpD et de la mTHPC en fonction du temps après injection. Quatre heures après l'injection, l'HpD présente un premier optimum de sélectivité tumorale de 2,2. Huit heures après l'injection, cette sélectivité diminue légèrement jusqu'à un minimum de 2,05 \pm 0,54. Ensuite, elle augmente progressivement pour atteindre un maximum de 6,17 \pm 2,75 (n=9) 48 heures après l'injection. Par contre, la mTHPC atteint son premier optimum de sélectivité 8 heures après l'injection (3,67 \pm 0,09). Sa sélectivité maximale de 5,1 \pm 1,65 (n=9) est atteinte 72 heures après l'injection.

On notera des écarts types importants, mal explicables sur ces modèles expérimentaux de papillomes chimioinduits. On peut néanmoins discerner l'évolution approximative du ratio.

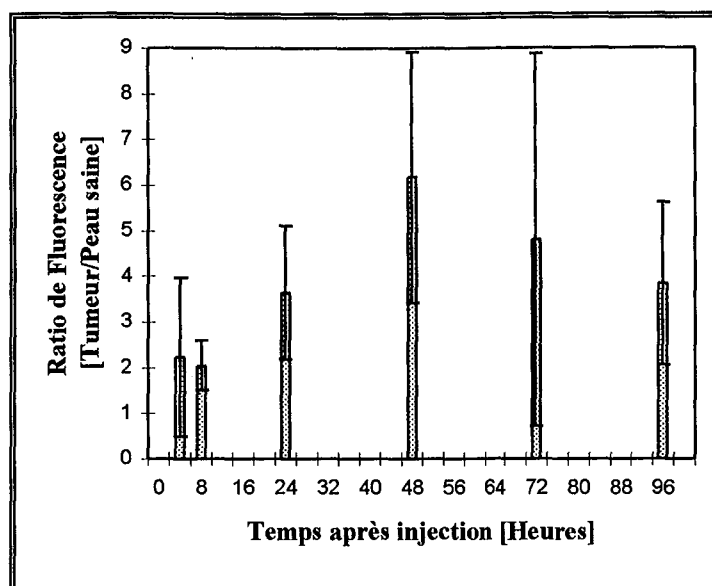


Figure 96 : Ratio d'intensité de fluorescence à 630 nm tumeur/peau saine après injection intrapéritonéale de 5 mg/kg d'HpD.

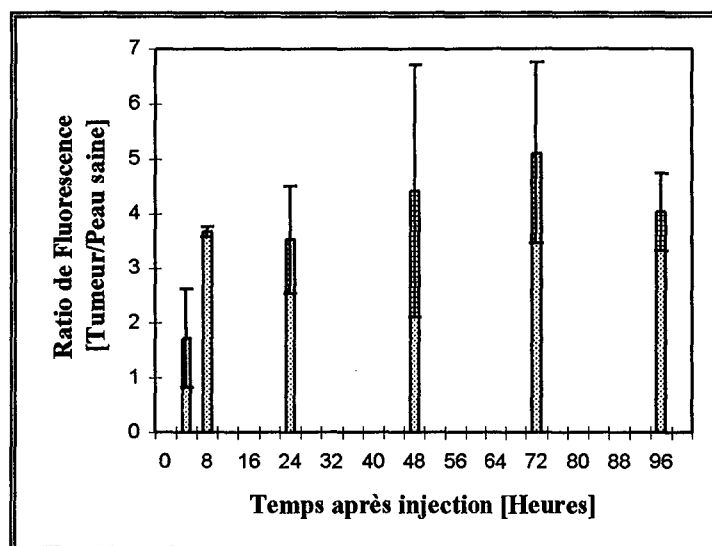


Figure 97 : Ratio d'intensité de fluorescence à 652 nm tumeur/peau saine après injection intrapéritonéale de 0,3 mg/kg de mTHPC.

Les résultats obtenus dans cette expérimentation indiquent que l'HpD produit un ratio de sélectivité légèrement supérieur à celui de la mTHPC (contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature pour les essais sur l'homme). De plus, ce ratio est atteint après un intervalle de temps plus court (48 heures). Le ratio de sélectivité de l'HpD était 1,5 fois supérieur à celui obtenu par Mukhtar pour des souris SENCAR porteuse de tumeurs de la peau induites par voie chimique [Bossu 1997]. Concernant la mTHPC, nous avons obtenu

un ratio similaire à celui reporté par Glanzmann *et al.* avec un décalage de 24 heures [Glanzmann 1995]. Pour des carcinomes induits chimiquement sur la muqueuse des joues d'hamsters, le ratio mesuré directement après l'injection intraveineuse de 0,15 mg/kg de la mTHPC était de 3,6. Sur notre modèle animal, nous avons mesuré un ratio de 3,5, 24 heures après l'injection intrapéritonéale. Les différents modes d'administration de la mTHPC peuvent être à l'origine du décalage observé.

Les figures 98 et 99 représentent respectivement les spectres de fluorescence (moyenne de 9 mesures) mesurés sur la tumeur et la peau saine. Ces spectres correspondent au meilleur intervalle de temps après injection de l'HpD. Les spectres mesurés sur la tumeur et la peau saine des souris injectées par de la mTHPC sont respectivement donnés sur les figures 100 et 101. L'intensité de fluorescence de la mTHPC (0,3 mg/kg) paraît 8 fois supérieure à celle de l'HpD (5 mg/kg). Ainsi, pour une dose équivalente, le rendement quantique de fluorescence de la mTHPC peut être 139 fois supérieur à celui de l'HpD. Nous savons cependant que toutes les espèces chimiques de l'HpD ne fluorescent pas de façon équivalente ; la fluorescence étant principalement due aux monomères, le chiffre (139) n'est donné qu'à titre indicatif. Le photoblanchiment des photosensibilisants peut être négligée dans cette expérience car l'énergie lumineuse utilisée pour l'excitation ne dépasse pas 0,5 mJ.

D'autre part, les spectres d'autofluorescence mesurés alternativement à 364 et 410 nm, avant l'injection des photosensibilisants montrent la possibilité de différencier ce type de lésions tumorales des tissus sains voisins (Figure 102). En effet, les spectres des lésions tumorales sont caractérisés par deux pics à 635 et 670 nm dus aux porphyrines endogènes. Ces pics sont plus intenses quand les tumeurs sont excitées à 410 nm. Les mêmes pics ont été observés dans la majorité des spectres des carcinomes des voies aérodigestives supérieures chez l'homme. Il paraît que l'accumulation des porphyrines endogènes dans les lésions tumorales est en majorité liée à la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses [Ganesan 1996]. Avec une excitation de 364 nm, le ratio peau saine/tumeur par rapport au pic du NADH (450 nm) était de 1,5 (Figure 103). Aucun changement de structure spectrale, par rapport à ce pic, entre la tumeur et la peau saine n'a été observé. Ainsi, la longueur d'onde d'excitation de 364 nm ne permet pas une distinction optimale de ce type de lésions.

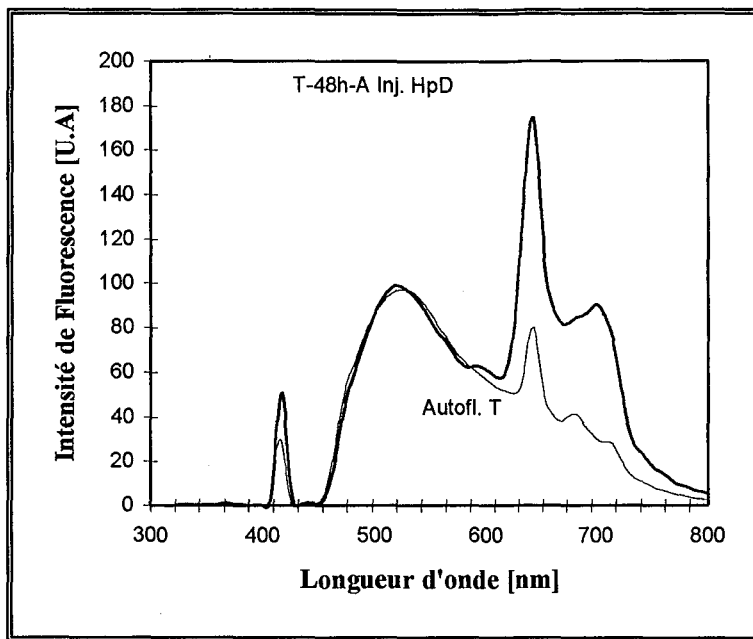


Figure 98 : Spectres de fluorescence obtenus sur la tumeur (T) des souris hairless avant l'injection et 48h après l'injection de 5 mg/kg d'HpD.

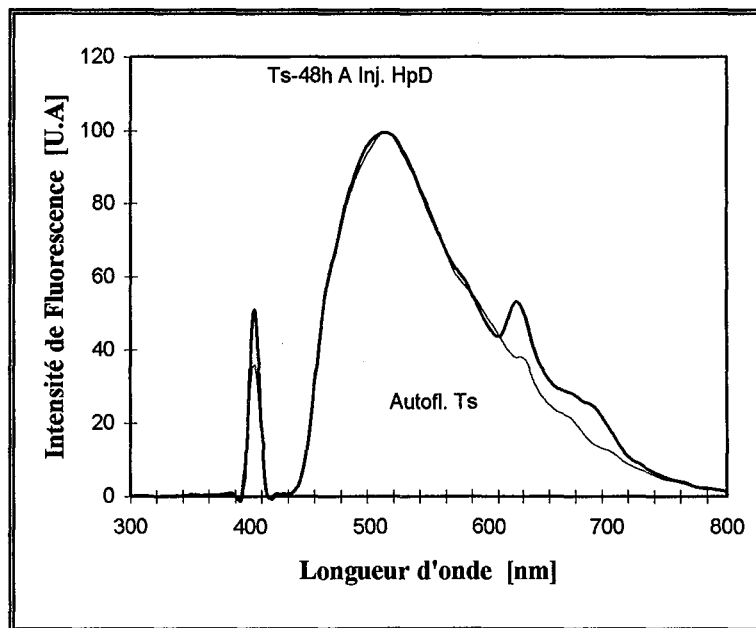


Figure 99 : Spectres de fluorescence obtenus sur un tissu sain (Ts) des souris hairless avant l'injection et 48h après l'injection de 5 mg/kg d'HpD.

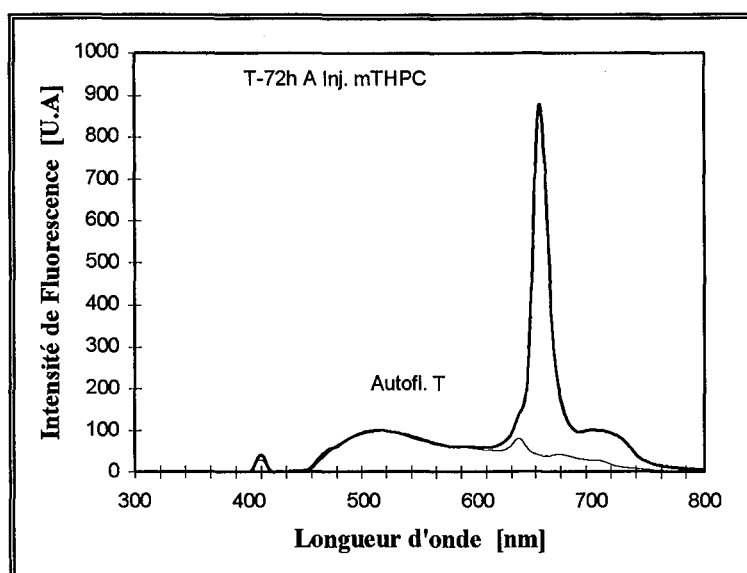


Figure 100 : Spectres de fluorescence obtenus sur la tumeur (T) des souris hairless avant l'injection et 72h après l'injection de 0.3 mg/kg de mTHPC.

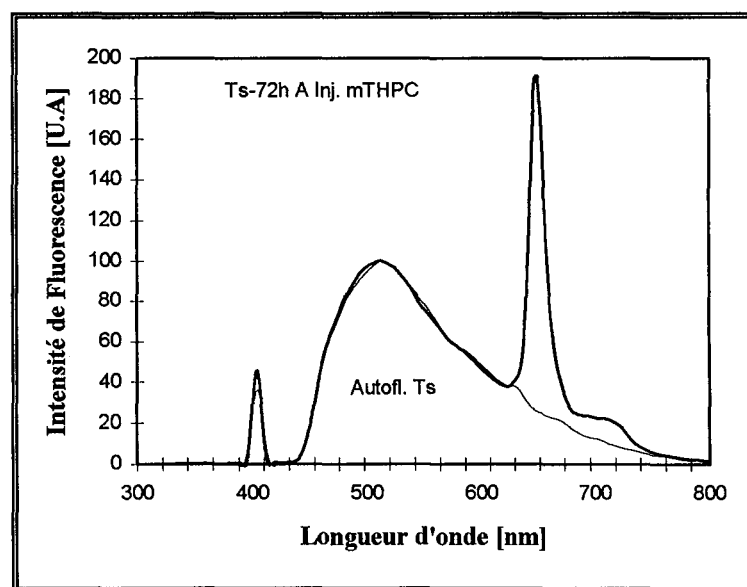


Figure 101 : Spectres de fluorescence obtenus sur les tissus sains (Ts) des souris hairless avant l'injection et 72h après l'injection de 0,3 mg/kg de mTHPC.

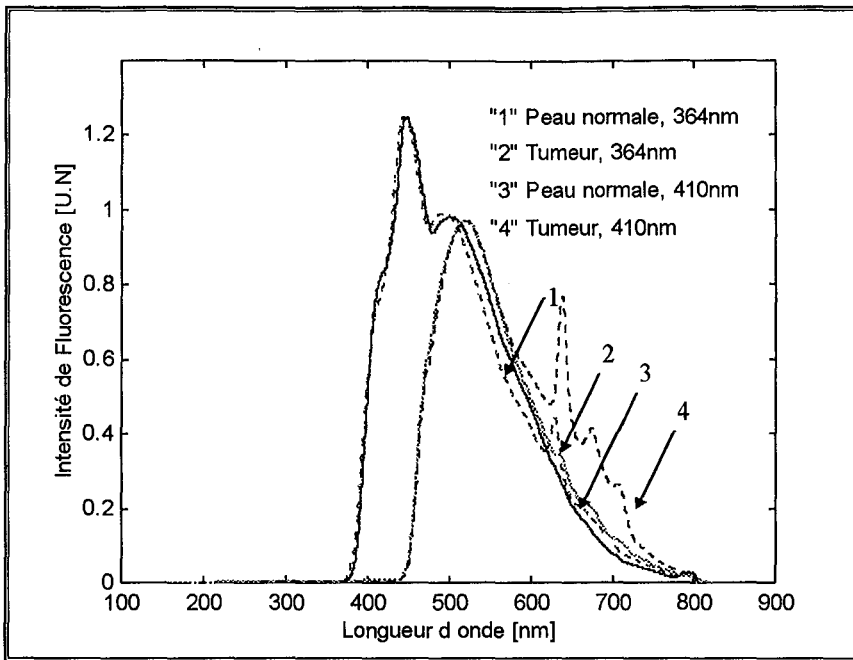


Figure 102 : Spectres d'auto fluorescence mesurés sur la tumeur et la peau saine des souris hairless excités à 364 et 410 nm. Les spectres sont normalisés à 1 par rapport au pic de flavine (500 et 520 nm).

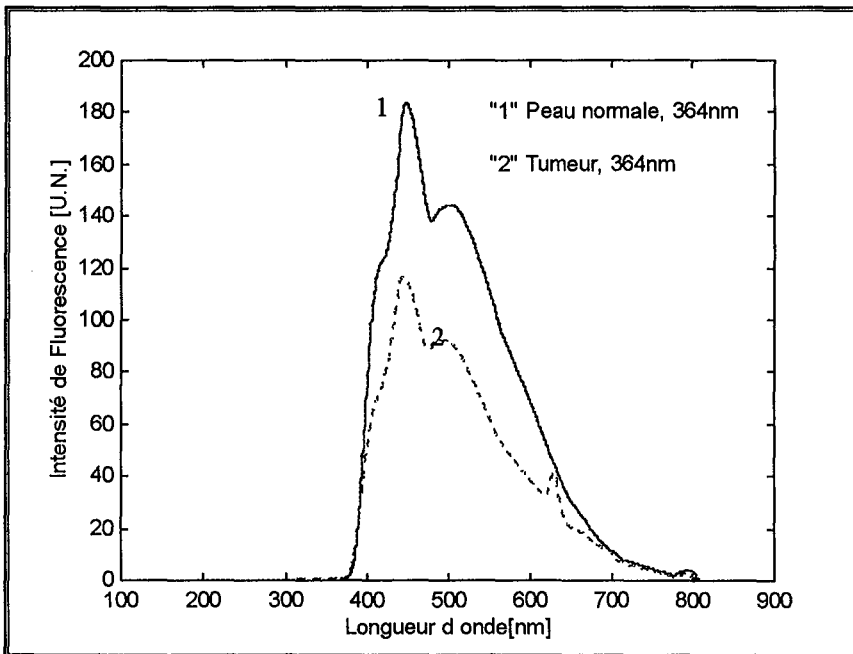


Figure 103 : Spectres d'auto fluorescence mesurés sur la tumeur et la peau saine des souris hairless excités à 364 nm avec une puissance de 1 mW. Normalisation par rapport à la lumière d'excitation rétrodiffusée.

III.2. CINÉTIQUES DE LA mTHPC SUR SOURIS NUDES PORTEUSES DE TUMEURS HT29

III.2.1. Matériels et Méthodes

Modèle animal : souris athymiques femelles (swiss nude) porteuses de tumeurs HT29 induites par injection de cellules tumorales HT29 viables. Les souris sont traitées quand le diamètre de la tumeur atteint 8 à 10 mm en moyenne.

Source d'excitation : lampe Xénon filtrée à 410 nm.

Photosensibilisants : la Méta-tétra (m-hydroxyphényl) chlorine (mTHPC) obtenue par Scotia Pharmaceuticals (UK) sous forme de poudre est diluée dans un mélange de polyéthylène glycol et d'éthanol et conservée dans des aliquotes à 3,5 mg/ml.

Puissance d'excitation : 1 mW.

Temps d'acquisition : 0,5 s/spectre.

Normalisation: les spectres de fluorescence induite ont été normalisés par rapport aux spectres d'autofluorescence mesurés avant l'injection du photosensibilisant en se référant au pic de flavine à 520 nm. Ainsi, chaque site tissulaire était son propre témoin. Ceci permet de réaliser une étude comparative de tous les sites examinés.

Les souris sont injectées de 0,3 ou 0,5 mg/kg de mTHPC par voie intrapéritonéale. Les mesures des spectres de fluorescence ont été réalisées, à travers la peau, sur la tumeur, le foie et le muscle. Après normalisation des spectres, les ratios d'intensité de fluorescence à la longueur d'onde d'émission maximale de la mTHPC [$I_{652 \text{ nm(Tumeur)}}/I_{652 \text{ nm(Tissu normal)}}$] ont été calculés. Les résultats sont donnés sous forme de moyenne de 9 (3 point de mesure/site tissulaire/souris) point de mesure \pm l'écart type.

Les mesures de fluorescence ont été réalisées à partir de 4 heures après l'injection du photosensibilisant jusqu'au vingt-cinquième jour. Ces mesures ont été réalisées sur souris non anesthésiées afin de limiter les variations métaboliques qui peuvent se produire sur les animaux examinés, comme la baisse de température ou le changement de débit du flux sanguin [Rezzoug 1997].

III.2.2. Résultats et discussion

La figure 104 donne un exemple des spectres de fluorescence mesurés sur la tumeur des souris injectées de 0,3 mg/kg de mTHPC. La répartition de la mTHPC dans le foie, la tumeur et le tissu sain (muscle) pour la dose de 0,3 mg/kg en fonction du temps après injection est donnée par les histogrammes des figures 105, 106 et 107. Concernant la dose de 0,5 mg/kg, la répartition de la mTHPC est donnée par les histogrammes des figures 108, 109, et 110. L'intensité de fluorescence mesurée 4 heures après l'injection montre que la rétention de la mTHPC (0,3 et 0,5 mg/kg) dans le foie est plus précoce que dans le muscle ou dans la tumeur. A cet intervalle de temps, pour une dose de 0,3 mg/kg de mTHPC, l'intensité de fluorescence mesurée dans le foie est 11 fois supérieure à celle mesurée dans la tumeur et 18,3 fois supérieure à celle mesurée dans le muscle. L'intensité de fluorescence dans le foie montre une décroissance à 8 heures. Elle atteint une valeur maximale entre J2 et J4 (Figure 105). Au-delà de cet intervalle, elle décroît progressivement pour atteindre une valeur minimale au 25^{ième} jour. Cette rétention précoce peut s'expliquer par la résorption par voie portale du photosensibilisant injectée dans le péritoine.

L'intensité de fluorescence dans la tumeur évolue rapidement entre J0 et J3 (Figure 106). Elle est stationnaire entre J3 et J6. Dans cet intervalle de temps, l'intensité de fluorescence et par conséquent la quantité de photosensibilisant dans la tumeur est maximale. Cette intensité décroît progressivement jusqu'au J8. Entre J9 et J12, elle reprend la valeur maximale mesurée entre J3 et J6. Au-delà de J12, l'intensité de fluorescence décroît progressivement jusqu'à une valeur minimale en J25.

Dans le tissu sain, l'intensité de fluorescence augmente progressivement entre 4 heures et J2. Elle est relativement stationnaire entre J3 et J8. Une nouvelle augmentation de l'intensité de fluorescence entre J9 et J12 est observée (Figure 107). Douze jours après l'injection, la mTHPC commence à être éliminée, néanmoins des résidus de mTHPC sont observés 25 jours après l'injection.

Les cinétiques de la mTHPC dans le foie, la tumeur et le tissu sain évolue de la même manière pour les deux doses injectées. Cependant, l'intensité de fluorescence est plus importante à la dose de 0,5 mg/kg. Elle est proportionnelle à la dose injectée. Les

interprétations biologiques des cinétiques de la mTHPC sont détaillées dans la thèse de Mlle Rezzoug [Rezzoug 1997].

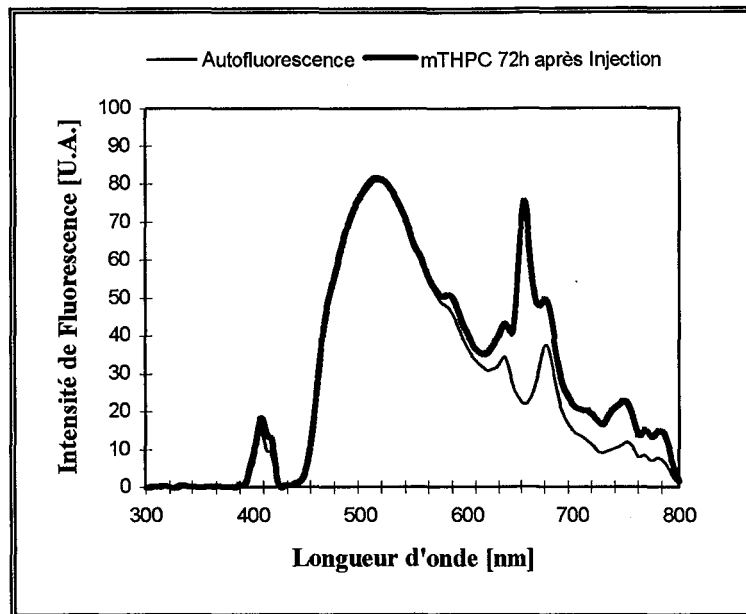


Figure 104 : Spectres de fluorescence obtenus sur la tumeur des souris nudes avant l'injection et 72h après l'injection de 0.3 mg/kg de mTHPC.

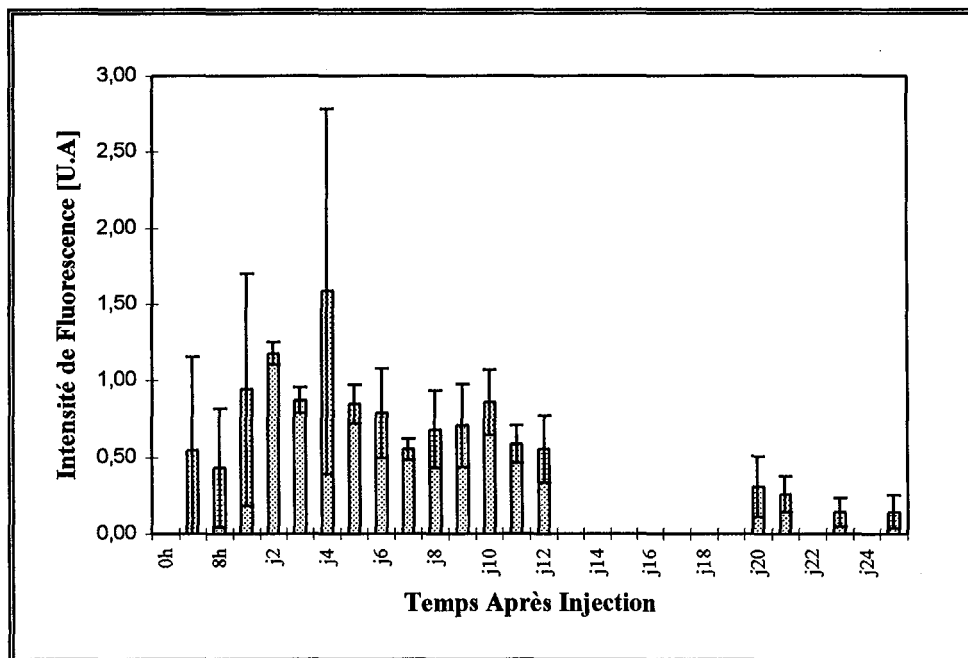


Figure 105 : Répartition de la mTHPC (0,3 mg/kg) dans le foie en fonction du temps après injection (h : heure ; j : jour). Chaque valeur d'intensité de fluorescence représente la moyenne de 9 mesures.

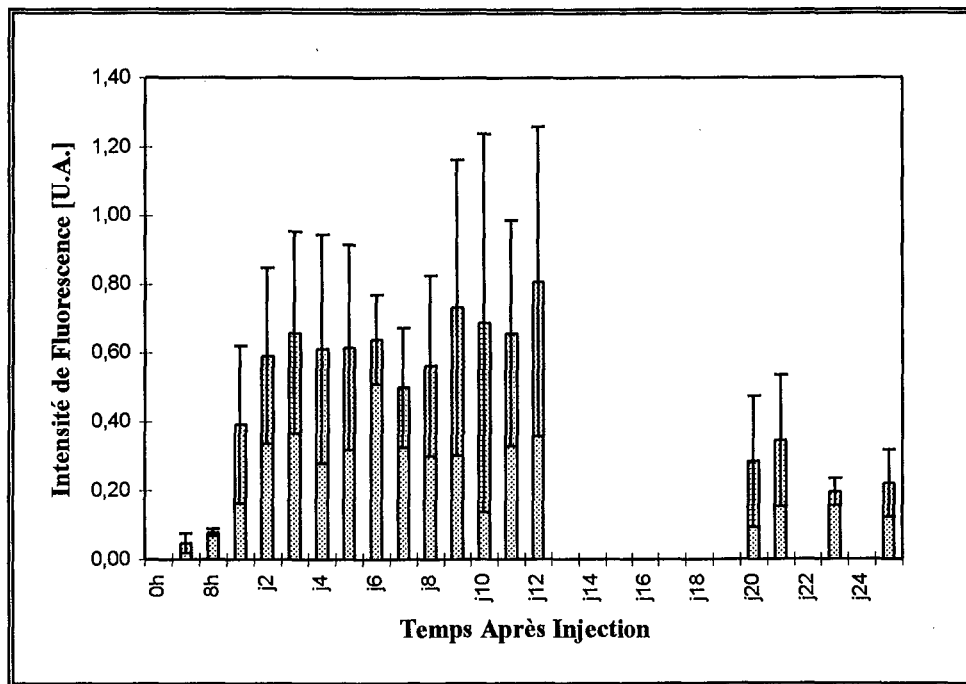


Figure 106 : Répartition de la mTHPC (0,3 mg/kg) dans la tumeur en fonction du temps après injection (h : heure ; j : jour). Chaque valeur d'intensité de fluorescence représente la moyenne de 9 mesures.

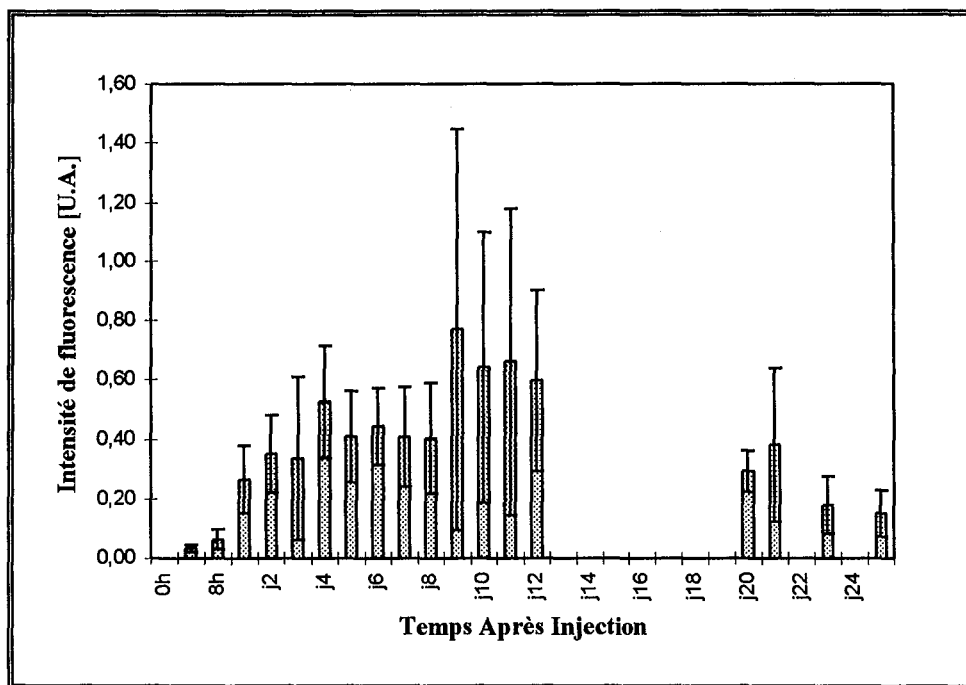


Figure 107 : Répartition de la mTHPC (0,3 mg/kg) dans le tissu sain (muscle) en fonction du temps après injection (h : heure ; j : jour). Chaque valeur d'intensité de fluorescence représente la moyenne de 9 mesures.

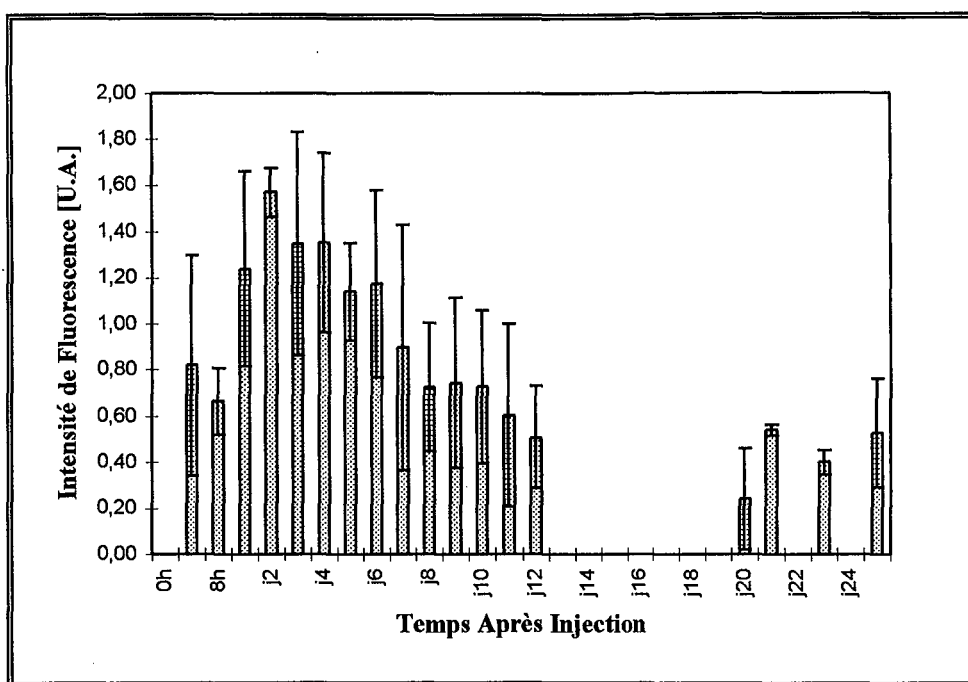


Figure 108 : Répartition de la mTHPC (0,5 mg/kg) dans le foie en fonction du temps après injection (h : heure ; j : jour). Chaque valeur d'intensité de fluorescence représente la moyenne de 9 mesures.

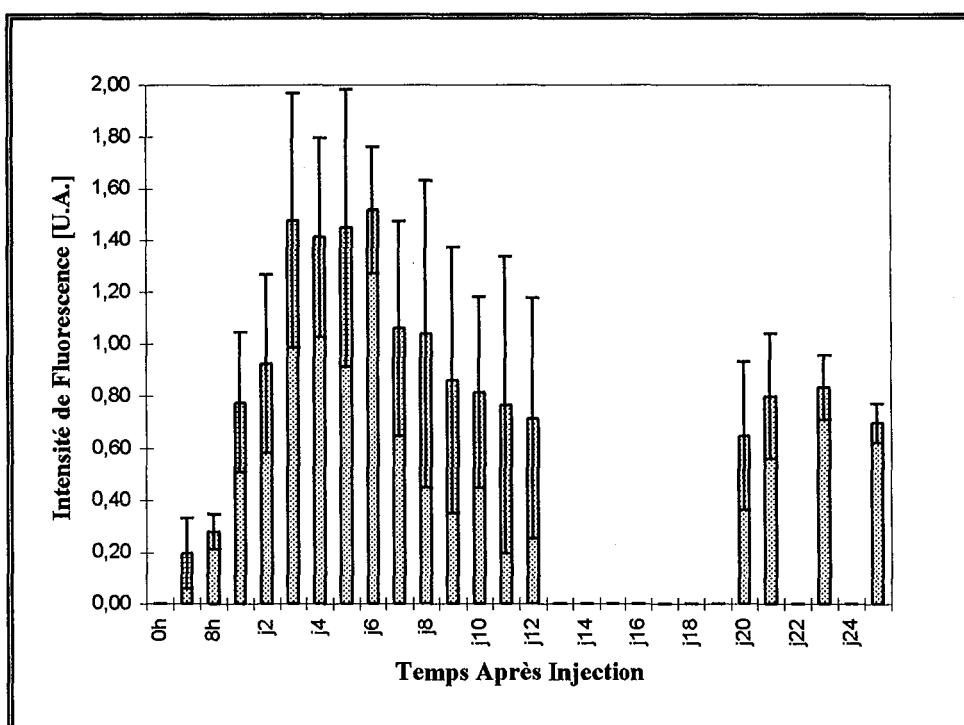


Figure 109 : Répartition de la mTHPC (0,5 mg/kg) dans la tumeur en fonction du temps après injection (h : heure ; j : jour). Chaque valeur d'intensité de fluorescence représente la moyenne de 9 mesures.

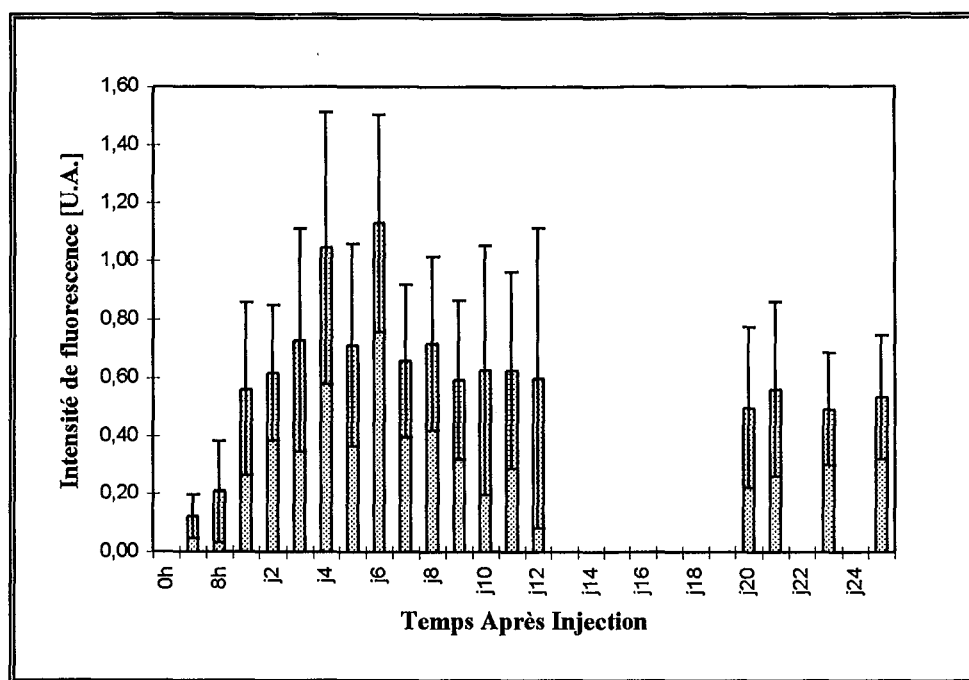


Figure 110 : Répartition de la mTHPC (0,5 mg/kg) dans le tissu sain (muscle) en fonction du temps après injection (h : heure ; j : jour). Chaque valeur d'intensité de fluorescence représente la moyenne de 9 mesures.

En ce qui concerne la sélectivité de la mTHPC, elle est donnée par le ratio d'intensité de fluorescence à 652 nm entre la tumeur et le tissu sain. En fait, cette dénomination de "tissu sain" est très critiquable en particulier pour démontrer une sélectivité de rétention du photosensibilisant. La tumeur représente du tissu colique d'origine humaine, le tissu sain est du muscle de souris. Les ratios d'intensité sont donnés à titre indicatif mais ne peuvent être transposés ultérieurement à la clinique humaine. Ce mauvais modèle expérimental pour définir un ratio est très largement utilisé dans la littérature, son seul intérêt pouvait alors permettre de comparer la cinétique de divers photosensibilisants. Les tableaux 12 et 13 résument respectivement les valeurs du ratio d'intensité de fluorescence calculés pour les doses de 0,3 mg/kg et 0,5 mg/kg de mTHPC. D'après ces résultats, la sélectivité optimale de la mTHPC est atteinte 72 heures après l'injection du photosensibilisant. L'histogramme de la figure 111 représente une comparaison des ratios obtenus avec les deux doses utilisées. A la dose de 0,3 mg/kg de mTHPC, la sélectivité maximale s'élève à $2,0 \pm 0,8$. Elle est de $2,1 \pm 0,3$ à la dose de 0,5 mg/kg. Ceci démontre (sous réserve d'une faible significativité des résultats) que la sélectivité du mTHPC est indépendante de la dose injectée. Le même

résultat a été constaté par Morlet *et al.* en 1995. Cependant, pour le même modèle tumoral, ils ont trouvé une sélectivité de 18, 24 heures après l'injection.

Avec la même technique utilisée dans cette expérience et pour la même dose injectée (0,3 mg/kg), la sélectivité maximale de la mTHPC dans des tumeurs induites par voie chimique sur souris hairless s'élevait à $5,1 \pm 1,65$, 72 heures après l'injection (Paragraphe III.1). Ainsi, nous pouvons constater que la variabilité du ratio de sélectivité n'est pas essentiellement liée au système de détection. Elle est plutôt liée au modèle tumoral examiné. La vascularisation des tumeurs traduite par l'augmentation de la concentration de l'oxyhémoglobine influence fortement la sélectivité du photosensibilisant. La rétention instantanée du photosensibilisant dans les tumeurs après une injection intraveineuse confirme l'influence de la vascularisation des tumeurs sur la sélectivité du photosensibilisant.

Tableau 12 : Ratios d'intensité de fluorescence à 652 nm [tumeur/peau saine] à différents temps après injection intrapéritonéale (i.p.) de 0,3 mg/kg de mTHPC.

Temps après injection [Heures]	4	8	24	48	72	96
Ratio±Ecart-type	1,5±0,7	1,5±0,5	1,4±0,1	1,6±0,1	2,0±0,8	1,1±0,3

Tableau 13 : Ratios d'intensité de fluorescence à 652 nm [tumeur/peau saine] à différents temps après injection intrapéritonéale (i.p.) de 0,5 mg/kg de mTHPC.

Temps après injection [Heures]	4	8	24	48	72	96
Ratio±Ecart-type	1,9±1,1	1,8±0,6	1,5±0,3	1,6±0,4	2,1±0,3	1,5±0,4

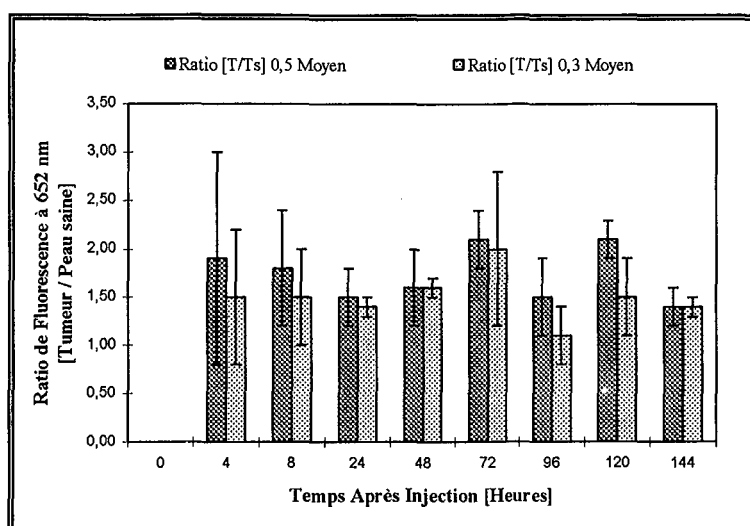


Figure 111 : Ratio d'intensité de fluorescence à 652 nm tumeur/peau saine après injection intrapéritonéale de 0,3 et de 0,5 mg/kg mTHPC.

Afin de valider la technique spectroscopique dans la quantification des photosensibilisants *in vivo*, une quantification de la mTHPC dans les mêmes tumeurs examinées dans cette étude a été réalisée, dans notre laboratoire, par chromatographie liquide haute performance (HPLC) [Rezzoug 1997]. La quantification de la mTHPC par HPLC a été réalisée sur des tumeurs prélevées 4, 8, 24, 48, 72, 96 et 120 heures après l'injection. Les résultats sont donnés dans le tableau 14. L'erreur de mesure est exprimée par le coefficient de variation (CV = Ecart-type/valeur moyenne).

Tableau 14 : Concentration intratumorale de mTHPC chez des souris nudes porteuses de tumeurs d'adénocarcinome colique humain, injectée de 0,3 mg/kg.

Temps après injection [Heures]	4	8	24	48	72	96	120
Concentration moyenne [ng/g]	216±6	176±4	384±46	180±5	220±14	169±10	165±7

La concentration de la mTHPC mesurée par HPLC atteint un premier optimum 4 heures après l'injection. Une diminution de cette concentration est observée à 8 heures. Deux autres optimums sont obtenus 24 et 72 heures après l'injection. Cependant, la concentration optimale est enregistrée à 24 heures. En appliquant le test de significativité non paramétrique de Wilcoxon ($p < 10\%$), la différence n'apparaît pas significative entre les

concentrations obtenues 4, 24, 48 et 72 heures après injection. Par contre, la différence est significative entre 4 et 8 heures ($p=0,04$). Il en résulte que la concentration intratumorale de la mTHPC est maximale entre 24 et 72 heures.

Les résultats obtenus par spectroscopie de la fluorescence induite montrent que la concentration intratumorale, liée à l'intensité de fluorescence, est maximale entre le deuxième et le douzième jour. En croisant les résultats spectroscopiques avec ceux obtenus par HPLC, il en résulte que la concentration intratumorale maximale de la mTHPC est atteinte entre 48 et 72 heures après l'injection. Ceci soulève la question de la signification réelle de la mesure par fluorescence pour définir le meilleur moment du traitement, c'est à dire celui où l'effet de destruction tumorale est maximal ou en d'autres termes celui où les espèces réactives du photosensibilisant sont disponibles et situées dans les sites "sensibles" des cellules ou des tissus.

III.3. EVALUATION DU TAUX DE PHOTOBLANCHIMENT DE L'HPD SUR TUMEURS PHOTOIRRADIEES

La photodétection par fluorescence induite étant associée à la thérapie photodynamique, elle peut provoquer une photodégradation du photosensibilisant lors de l'irradiation dans le bleu. Afin d'estimer l'effet d'une telle irradiation des tumeurs sur l'efficacité thérapeutique de l'HpD, nous avons évalué le taux de photoblanchiment de l'HpD suite aux photoirradiations alternatives dans bleu et le rouge ainsi que suite à l'association séquentielle de deux photoirradiations.

III.3.1. Matériels et Méthodes

Modèle animal : souris athymiques femelles (swiss nude) porteuses de tumeurs HT29 d'environ 1 cm³ induites par injection de cellules tumorales HT29 viables.

Photosensibilisant : Hématoporphyrine dérivée (HpD) diluée à partir de solutions à 5 mg/ml (Queen Elizabeth Hospital, Woodville, Australie). Ses pics d'excitation et d'émission maximale sont respectivement situés à 400 et 630 nm.

Source d'excitation : lampe Xénon filtrée à 410 nm.

Puissance d'excitation : 1 mW.

Temps d'acquisition : 0,5 s/spectre.

Normalisation: les spectres de fluorescence induite ont été normalisés par rapport aux spectres d'autofluorescence mesurés avant l'injection du photosensibilisant en se référant au pic de flavine à 520 nm.

Source de photoirradiation : la lumière rouge de 630 nm est émise par un laser à colorant (Spectra-Physic 375 B) pompé par un laser Argon (Spectra-Physic 2030). La lumière violette < 415 nm est émise par un laser Krypton (Spectra-Physic 2020). La lumière est transmise par une fibre optique HCG en silice de diamètre de cœur de 600 µm (SEDI, France).

L'énergie utilisée dans la détection de fluorescence de l'HpD par spectroscopie est 0,5 mJ. Elle correspond à une fluence en sortie de fibre optique de 0,21 J/cm². On considère que le photoblanchiment de l'HpD provoqué par cette fluence est négligeable, bien que le rapport entre la bande de Soret et la bande Q à 630 nm soit de l'ordre de 40.

Vingt-quatre heures après l'administration intrapéritonéale d'une dose d'HpD de 10 mg/kg, les spectres de fluorescence induite ont été mesurés sur trois groupes de souris : le groupe K constitué des souris dont les tumeurs sont photoirradiées au laser krypton (1 J/cm^2), le groupe C constitué des souris dont les tumeurs sont photoirradiées au laser à colorant (150 J/cm^2) et le groupe KC constitué des souris dont les tumeurs sont photoirradiées séquentiellement au laser krypton (1 J/cm^2) puis au laser à colorant (150 J/cm^2). Les fluences utilisées dans cette expérimentation correspondent aux fluences communément utilisées en diagnostic et en traitement [Zeghari 1995]. Les spectres de fluorescence induite ont été mesurés sur les trois groupes photoirradiés en trois points de mesure par souris.

III.3.2. Résultats et discussion

Les figures 112, 113 et 114 représentent les spectres obtenus respectivement avant et après photoirradiation en lumière rouge, en lumière bleue et en association séquentielle des deux lumières. Les spectres de fluorescence de l'HpD présentent deux pics d'émission principaux, l'un vers 630 nm et l'autre vers 690 nm. Le pourcentage de photoblanchiment est déduit de la diminution de l'intensité du pic de fluorescence à 630 nm. En associant les deux lumières, nous observons une modification de l'allure du spectre illustré par une augmentation de fluorescence entre 655 et 665 nm qui témoigne de l'apparition de photoproduits qui fluorescent à ces longueurs d'onde [Zeghari 1995].

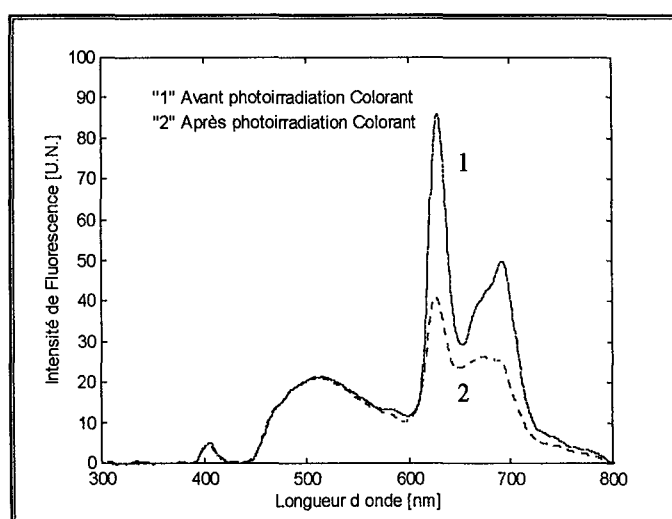


Figure 112 : Spectres d'émission de fluorescence sur tumeurs HT29 mesurés 24h après injection d'une dose d'HpD de 10 mg/kg. Spectres avant et après photoirradiation en lumière rouge (laser à colorant) dont la fluence est 150 J/cm^2 .

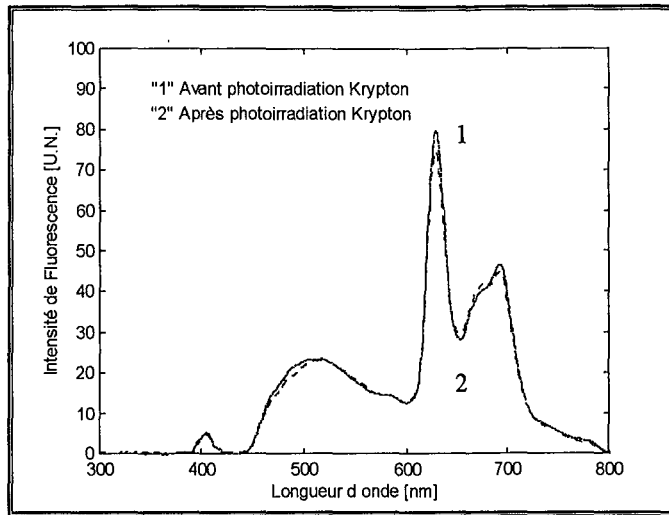


Figure 113 : Spectres d'émission de fluorescence sur tumeurs HT29 mesurés 24h après injection aux souris d'une dose d'HpD de 10 mg/kg. Spectres avant et après photoirradiation en lumière bleue (laser krypton) dont la fluence est 1 J/cm².

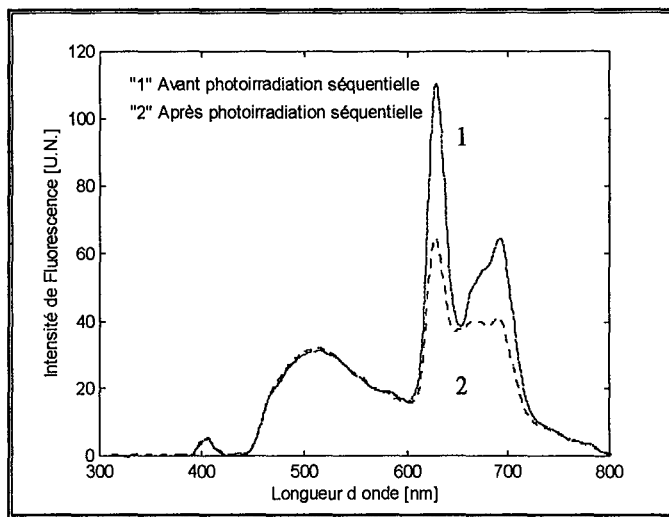


Figure 114 : Spectres d'émission de fluorescence sur tumeurs HT29 mesurés 24h après injection aux souris d'une dose d'HpD de 10 mg/kg. Spectres avant et après photoirradiation séquentielle en lumière bleue (1 J/cm²) et rouge (150 J/cm²).

Le taux de photoblanchiment est calculé pour chaque modalité de traitement sur quatre souris différentes. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 15.

Tableau 15 : Pourcentage de photoblanchiment déduit de la diminution du pic d'émission à 630 nm sur les spectres d'émission de fluorescence obtenus après photoirradiation des tumeurs en lumière bleue ($1\text{J}/\text{cm}^2$), en lumière rouge ($150\text{J}/\text{cm}^2$) et en associant les deux lumières. Les résultats représentent la moyenne sur un nombre minimale de quatre souris ($\% \pm \text{écart-type}$).

Lumière bleue	Lumière rouge	Association séquentielle des deux lumières
11,8 \pm 2,4	42,0 \pm 6,7	35,0 \pm 2,6

Les résultats obtenus démontrent que le taux de photoblanchiment observé sur le groupe "lumière bleue" (K) est d'environ 3,5 fois inférieur au groupe "lumière rouge" (C) et environ 3 fois inférieur au groupe "lumière bleue - lumière rouge" (KC). Le résultat obtenu par l'application séquentielle des deux lumières est surprenant ; en effet le photoblanchiment sous lumière rouge s'applique à la quantité de photosensibilisant restant. Si on avait un effet seulement additif le pourcentage de photoblanchiment devait être de $11,8 + \{(100 - 11,8) \times 42 / 100\} = 49,2$. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence : l'état agrégé ou non du photosensibilisant, des liaisons avec les constituants du milieu, la genèse de photoproduits... toutes modifications induites par la première irradiation et modifiant l'efficacité de la seconde et/ou la non-adaptation de la spectrométrie pour mesurer les phénomènes de photodégradation de photosensibilisant dans leur ensemble.

IV. MODELISATION DE LA FLUORESCENCE TISSULAIRE

Les variations de l'allure et de l'intensité spectrales de l'autofluorescence entre les différents types de tissus sont liées d'une part, à la variabilité de la concentration des fluorophores endogènes et/ou au changement de l'équilibre entre les formes oxydées et les formes réduites de ces derniers. D'autre part, à cause de la complexité et de l'hétérogénéité des structures tissulaires, ainsi que la réabsorption due à l'hémoglobine, les caractéristiques de fluorescence sont parfois modifiées. De plus, puisque les fluorophores endogènes possèdent des spectres larges, leur fluorescence se recouvre (overlapping). Ainsi, l'identification de ces fluorophores ne peut pas être précisément réalisée sans l'aide d'un modèle permettant de mettre en évidence toutes les composantes du spectre.

IV.1. OBJECTIF DE LA MODELISATION

L'objectif de la modélisation des spectres d'autofluorescence est l'estimation des taux de participation des fluorophores responsables de l'allure spectrale. Ceci peut apporter des informations utiles au diagnostic *in vivo* des états précancéreux comme la composition biochimique des tissus. D'autre part, la modélisation doit nous permettre de séparer l'influence de la réabsorption de fluorescence due à l'oxyhémoglobine.

Dans ce but, nous avons développé un modèle permettant de reconstruire le spectre de fluorescence. Ce modèle est établi à partir de données spectrales mesurées sur des fantômes simulant l'absorption, la diffusion et l'autofluorescence des tissus.

IV.2. ANALYSE SPECTRALE DE L'AUTOFLUORESCENCE

L'analyse des spectres d'autofluorescence mesurés sur les différents tissus sains et pathologiques a abouti aux résultats suivants :

- un spectre d'autofluorescence est composé d'un nombre limité de bandes d'émission qui sont définies par le nombre de fluorophores répartis dans le milieu examiné ;

- chaque bande de fluorescence est caractérisée par une amplitude, un pic principal et une largeur à mi-hauteur ;
- l'amplitude de cette bande est liée aux conditions d'excitation et d'acquisition, à la concentration du fluorophore, au rendement quantique de fluorescence et aux coefficients optiques du milieu.

IV.3. SPECTRES DE FLUORESCENCE DES FLUOROPHORES ENDOGENE EN SOLUTION

Afin d'étudier les caractéristiques spectrales des fluorophores isolés, nous avons mesuré les spectres de fluorescence de certains fluorophores pouvant être à l'origine de l'autofluorescence dans des solutions. Les fluorophores sont obtenus à partir des extraits tissulaires et ou synthétiques (voir deuxième partie, § VI.2.1). Comme le montre la figure 115, les spectres de fluorescence du tryptophane, du collagène, du NADH et des flavines sont caractérisés par une bande d'émission unique. La répartition de l'intensité spectrale autour du pic principal est quasi symétrique. Dans le cas de l'HpD, on observe la présence de deux bandes d'émission dont chacun est uniformément répartie autour de son pic principal.

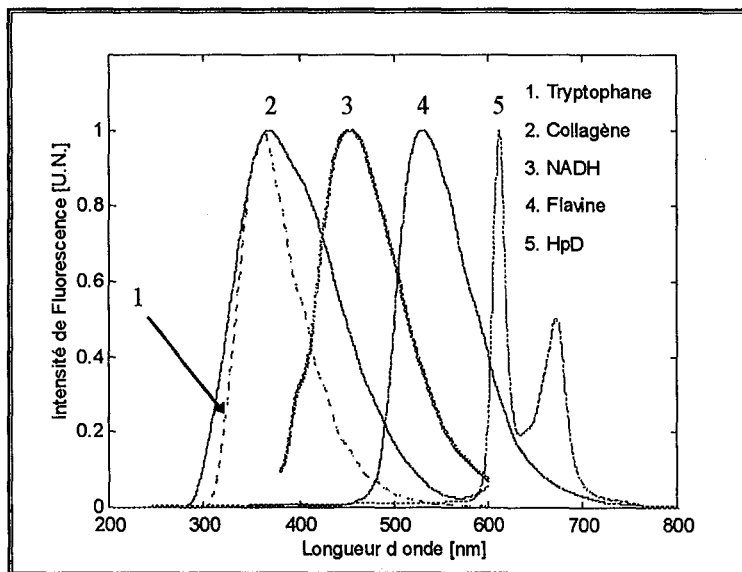


Figure 115 : Spectres de fluorescence des fluorophores endogènes mesurés en solutions.

IV.4. CHOIX DU MODELE

Il est difficile de vouloir proposer un modèle théorique fiable pour représenter des phénomènes physiques d'un organisme vivant. Pour cette raison, notre choix du modèle s'est porté sur l'allure du phénomène. Ainsi, nous avons choisi une courbe décrite par une équation très simple ayant des paramètres faciles à interpréter, qui prend compte de la forme des données observées. Cette courbe suit une loi de Gauss.

IV.4.1. Spectre de fluorescence à bande unique

On appelle bande de fluorescence, un spectre qui suit une loi de Gauss de sorte que la répartition énergétique de l'émission fluorescente à bande unique se ramène à [Tisserand 1987] :

$$I(\lambda) = a \cdot \exp - \beta(\lambda - \lambda_p)^2$$

Ainsi, l'intensité totale de la fluorescence est donnée par la loi suivante :

$$I_t = \int \frac{I(\lambda)}{\partial \lambda} d\lambda$$

D'où :

$$I_t = \pi^{\frac{1}{2}} \cdot a \cdot \beta^{-\frac{1}{2}}$$

IV.4.2. Spectre de fluorescence à bandes multiples

Dans le cas où le spectre de fluorescence est structuré de pics multiples ou quand la répartition énergétique de la fluorescence n'est pas symétrique, ce spectre peut être composé de plusieurs bandes d'émission. Chaque bande est caractéristique de la molécule ayant émis la fluorescence. La figure 116 montre un spectre d'auto fluorescence mesuré sur la face supérieure de la langue. Ce spectre est composé de plusieurs bandes, à des

proportions variables, dont la somme constitue l'allure globale. Les données spectrales obtenues en solution permettront de lier ces bandes à la composition biochimique des tissus.

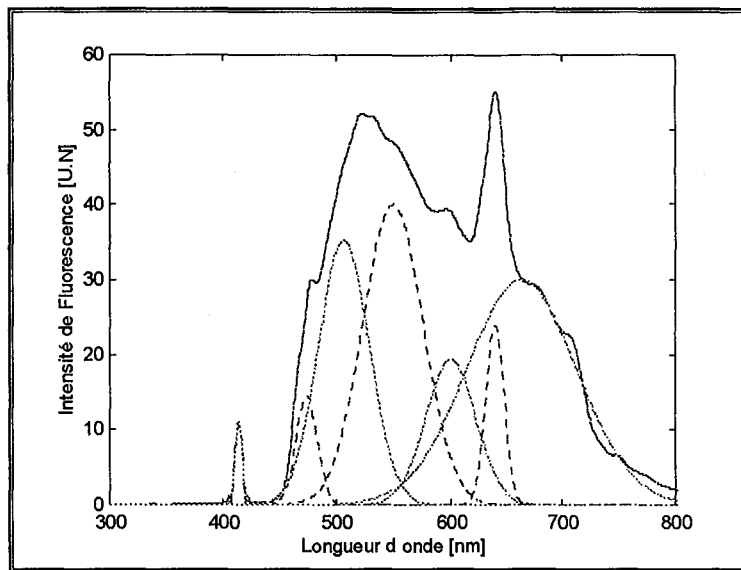


Figure 116 : Schéma d'un spectre à plusieurs bandes d'émission. Spectre d'autofluorescence de la face supérieure de la langue.

Ainsi, la répartition de l'intensité de fluorescence de ce spectre peut être donnée par une somme de fonctions de Gauss telle que :

$$I(\lambda) = \sum_n a_n \cdot \exp - \beta_n (\lambda - \lambda_{pn})^2$$

IV.5. INTERPRETATION DES PARAMETRES

Lorsque le choix du modèle correspond à une théorie bien établie, les paramètres ont en général une signification physique cohérente. De même, lorsque c'est l'allure du phénomène qui guide le choix du modèle, nous serons amenés à le sélectionner de façon à ce que ses paramètres puissent être interprétés en termes corrects [Huet 1992]. Alors, pour un spectre à bande de fluorescence unique (Figure 117), la répartition de l'intensité est donnée par :

$$I(\lambda) = a \cdot \exp - \beta (\lambda - \lambda_p)^2$$

où :

a : une constante de proportionnalité liée aux conditions d'excitation et d'acquisition, aux coefficients optiques du milieu et au rendement quantique de fluorescence ;

$I(\lambda)$: l'intensité spectrale de fluorescence [U. N.] ;

λ : la longueur d'onde [nm] ;

λ_p : la longueur d'onde au pic [nm].

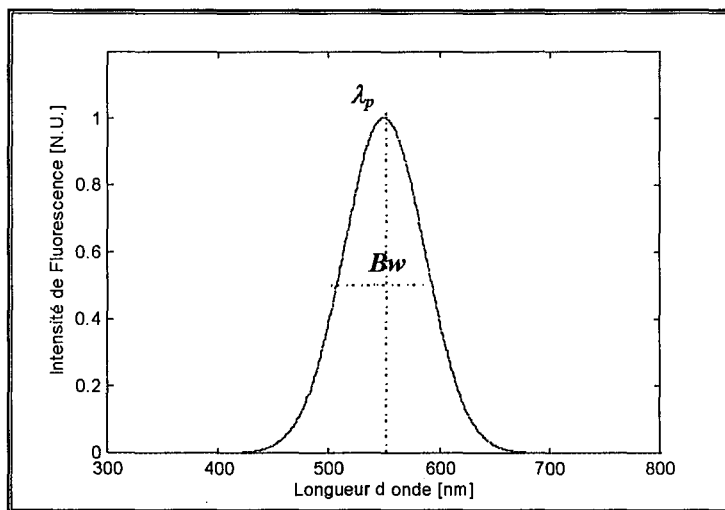


Figure 117 : Schéma d'un spectre de fluorescence à bande unique.

Ainsi, pour une gaussienne normée ($a = 1$), la largeur à mi-hauteur du spectre Bw en fonction du paramètre β est donnée par :

$$Bw^2 = 2.7726 \beta^{-1}$$

D'où :

$$I(\lambda) = \exp - 2.7726 \left(\frac{\lambda - \lambda_p}{Bw} \right)^2$$

Ainsi, pour n composantes fluorescentes ou fluorophores à bande unique de fluorescence, le spectre global peut être donné par une somme de gaussiennes, telle que :

$$I(\lambda) = \sum_1^n \alpha_n \exp - 2.7726 \left(\frac{\lambda - \lambda_{pn}}{Bw_n} \right)^2$$

où, α est un coefficient de proportionnalité donnant le taux de participation de chaque fluorophore par rapport au pic maximal dans le spectre global. Comme le spectre global est normé à 1 à son maximum de fluorescence, le coefficient α constitue un pourcentage.

IV.6. METHODE D'OPTIMISATION

Le modèle que nous avons choisi pour approximer le signal de fluorescence est fonction de paramètres linéaires (α_n) et de paramètres non linéaires (Bw_n, λ_{pn}). L'optimisation de ces paramètres peut être réalisée par une méthode mixte hiérarchisée [Richard 1994]. La méthode des moindres carrés simples permet d'estimer les paramètres α_n , alors qu'une méthode de programmation non linéaire sera nécessaire pour estimer les paramètres Bw_n et λ_{pn} .

Ainsi, pour estimer le vecteur de paramètres $P=[\alpha_n, Bw_n, \lambda_{pn}]$ nous avons choisi une fonction critère $J(P)$ défini par l'estimateur des moindres carrés :

$$J(P) = \sum_n [I - I_m(P)]^2$$

où :

I représente le spectre mesuré ;

$I_m = \hat{I}$ représente le spectre approximé par le modèle gaussien.

La minimisation de ce critère aboutit à l'optimisation des paramètres P du modèle. Pour déterminer un minimum on applique la condition de détermination d'un extremum du premier ordre (Gradient) :

$$\nabla J(P) = \left[\frac{\partial J(P)}{\partial \alpha_1} \quad \dots \quad \frac{\partial J(P)}{\partial \alpha_n} \quad \frac{\partial J(P)}{\partial Bw_1} \quad \dots \quad \frac{\partial J(P)}{\partial Bw_n} \quad \frac{\partial J(P)}{\partial \lambda_{p1}} \quad \dots \quad \frac{\partial J(P)}{\partial \lambda_{pn}} \right]^T = 0$$

$$P^T = [\alpha_1 \quad \dots \quad \alpha_n \quad Bw_1 \quad \dots \quad Bw_n \quad \lambda_{p1} \quad \dots \quad \lambda_{pn}]$$

La condition de deuxième ordre (Hessien) doit aboutir à l'obtention d'une matrice de dérivée secondes définie et non négative :

$$H(P) = \begin{bmatrix} \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \alpha_1^2} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \alpha_1 \partial \alpha_n} & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \alpha_1 \partial BW_1} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \alpha_1 \partial BW_n} & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \alpha_1 \partial \lambda_{p1}} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \alpha_1 \partial \lambda_{pn}} \\ \vdots & & \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots & & \vdots \\ \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \alpha_n \partial \alpha_1} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \alpha_n^2} & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \alpha_n \partial BW_1} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \alpha_n \partial BW_n} & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \alpha_n \partial \lambda_{p1}} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \alpha_n \partial \lambda_{pn}} \\ \frac{\partial^2 J(P)}{\partial BW_1 \partial \alpha_1} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial BW_1 \partial \alpha_n} & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial BW_1^2} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial BW_1 \partial BW_n} & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial BW_1 \partial \lambda_{p1}} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial BW_1 \partial \lambda_{pn}} \\ \vdots & & \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots & & \vdots \\ \frac{\partial^2 J(P)}{\partial BW_n \partial \alpha_1} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial BW_n \partial \alpha_n} & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial BW_n \partial BW_1} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial BW_n^2} & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial BW_n \partial \lambda_{p1}} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial BW_n \partial \lambda_{pn}} \\ \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \lambda_{p1} \partial \alpha_1} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \lambda_{p1} \partial \alpha_n} & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \lambda_{p1} \partial BW_1} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \lambda_{p1} \partial BW_n} & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \lambda_{p1}^2} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \lambda_{p1} \partial \lambda_{pn}} \\ \vdots & & \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots & & \vdots \\ \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \lambda_{pn} \partial \alpha_1} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \lambda_{pn} \partial \alpha_n} & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \lambda_{pn} \partial BW_1} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \lambda_{pn} \partial BW_n} & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \lambda_{pn} \partial \lambda_{p1}} & \dots & \frac{\partial^2 J(P)}{\partial \lambda_{pn}^2} \end{bmatrix}$$

Pour trouver le minimum de la fonction $J(P)$, on utilise des méthodes itératives d'analyse numérique. A partir d'une valeur initiale $J(0)$, nous nous dirigeons pas à pas vers la solution qui donne une valeur minimale à $J(P)$. Ceci permet de déterminer une suite P_i telle que :

$$J(P_0) \geq J(P_1) \dots \geq J(P_i) \geq J(P_{i+1})$$

Cette suite doit converger vers un minimum local $J(P)$.

Différents algorithmes de programmation non linéaire peuvent être utilisés afin de minimiser la fonction critère. En effet, il existe des méthodes d'optimisation directes comme la méthode des moindres carrés non linéaire et des méthodes analytiques telles que la méthode du gradient, la méthode de Newton-Raphson, la méthode de Levenberg-Marquardt, et la famille Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS). Les deux dernières méthodes sont très adaptées à l'optimisation des paramètres des courbes gaussiennes [Press 1986, Scales 1985]. Cependant, lorsque le nombre de données est assez important et les paramètres initiaux sont bien choisis, la méthode BFGS converge plus rapidement vers la solution [Scales 1985]. Vu la connaissance préalable des données spectrales mesurées dans des

solutions, nous avons choisi cette méthode pour estimer les paramètres. Le nombre des données de chaque spectre est compris entre 600 et 1200 points.

Le principe de cette méthode consiste à établir des informations sur la courbure de la surface représentative du critère de moindres carrés à chaque itération [Scales 1985, Press 1986, Matlab User guide 1994]. Ces informations permettent de formuler une présentation quadratique du critère à minimiser :

$$\underset{P \in \mathbb{R}^n}{\text{Minimise}} \left\{ J(P) = \frac{1}{2} P^T H P + b^T P + c \right\}$$

où H est le Hessien du critère J (matrice de dérivées secondes), b est un vecteur de constantes et c est une constante.

La solution optimale de ce problème quadratique est atteinte lorsque les dérivées partielles (le gradient) du critère J tend vers zéro :

$$\nabla J(P^*) = P^* + b = 0$$

où P^* est le vecteur de paramètres qui donne la solution optimale de l'équation précédente. Il peut être écrit comme suit :

$$P^* = -H^{-1}b$$

La méthode BFGS donne une approximation du Hessien, à chaque itération, en observant le comportement de la courbure de la surface représentative de $J(P)$ et $\nabla J(P)$. La formule d'actualisation du Hessien par cette méthode est donnée par :

$$H_{k+1} = H_k + \frac{q_k q_k^T}{q_k^T S_k} - \frac{H_k^T H_k}{S_k^T H_k S_k}$$

où :

$$S_k = P_{k+1} - P_k$$

$$q_k = \nabla J(P_{k+1}) - \nabla J(P_k)$$

La matrice initiale du Hessien (H_0) peut être une matrice symétrique positive et définie quelconque. Ainsi, pour cette méthode, nous devons fixer la longueur de déplacement ou le pas pour chaque étape d'itération, ainsi que le critère d'arrêt. Dans ce travail, nous avons fixé le pas de déplacement à 10^{-6} . Le gradient de l'estimateur des moindres $J(P)$ carrés a été considéré comme critère d'arrêt. Nous avons fixé sa valeur à 10^{-5} . Ainsi, le nombre d'itération était très variable. Il était fonction du nombre de gaussiennes du modèle. Des valeurs comprises entre 128 et 10^4 ont été utilisées pour l'optimisation des paramètres.

IV.7. MODELISATION DES SPECTRES DE FLUORESCENCE DES FLUOROPHORES

Selon l'allure des spectres de fluorescence des fluorophores endogènes et exogènes, la modélisation est effectuée par une ou deux courbes gaussiennes. Tous les spectres des fluorophores endogènes mesurés à leur maximum d'excitation, dans des solutions, ont été normés à 1 à leur maximum de fluorescence (voir deuxième partie, § VI.2.1). Chacun des spectres de fluorescence de la flavine, du NADH, du collagène et du tryptophane a été représenté par une seule courbe gaussienne. Celui de l'HpD et la mTHPC a été modélisé par deux courbes. La précision de l'estimation est exprimée par la ressemblance entre le spectre mesuré et la courbe estimée. Cette ressemblance est donnée par le coefficient de corrélation linéaire (R). Le résidu (la somme des erreurs au carré $[I-\hat{I}]^2$) est également donné pour chaque estimation. Les résultats de la modélisation sont résumés dans la tableau 16.

Tableau 16 : Paramètres des spectres de fluorescence estimés à partir du modèle gaussien.

fluorophore	α_1	α_2	Bw ₁ [nm]	Bw ₂ [nm]	λ_{p1} [nm]	λ_{p2} [nm]	Résidu	R
Tryptophane	1	-	65	-	360	-	0,50	0,996
Collagène	1	-	120	-	370	-	6,42	0,926
NADH	1	-	105	-	450	-	1,88	0,982
Flavine	1	-	90	-	530	-	3,80	0,980
HpD	0,95	0,45	18,50	44,60	612	667	0,57	0,992
mTHPC	0,99	0,08	15,20	72,20	650	695	0,09	0,998

Les courbes des figures de 118A à 120A montrent des exemples des spectres de fluorescence estimés par une ou deux gaussiennes, comparés aux spectres mesurés. Les courbes de 118B à 120B donnent la répartition de l'erreur en fonction de la longueur d'onde. Malgré que le résidu atteigne dans certains cas des valeurs supérieures à 1, il tend vers une moyenne proche de zéro. Ceci peut être observé sur les courbes de la répartition de l'erreur d'estimation. Il est également exprimé par les valeurs supérieures à 0,92 du coefficient de corrélation linéaire.

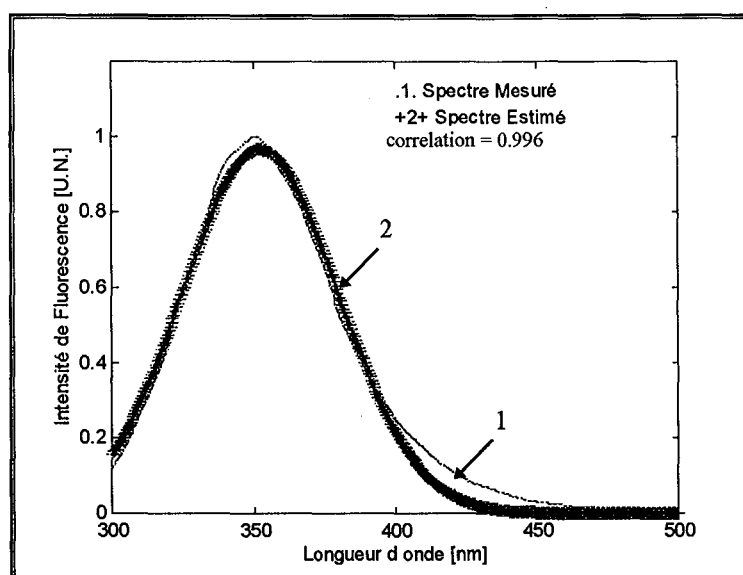


Figure 118A : Spectre de fluorescence du tryptophane modélisé par une gaussienne.

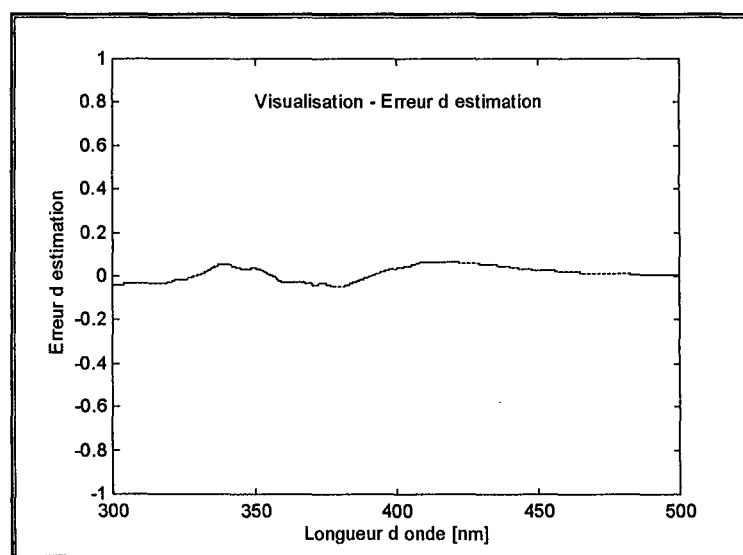


Figure 118B : Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre du tryptophane en fonction de la longueur d'onde.

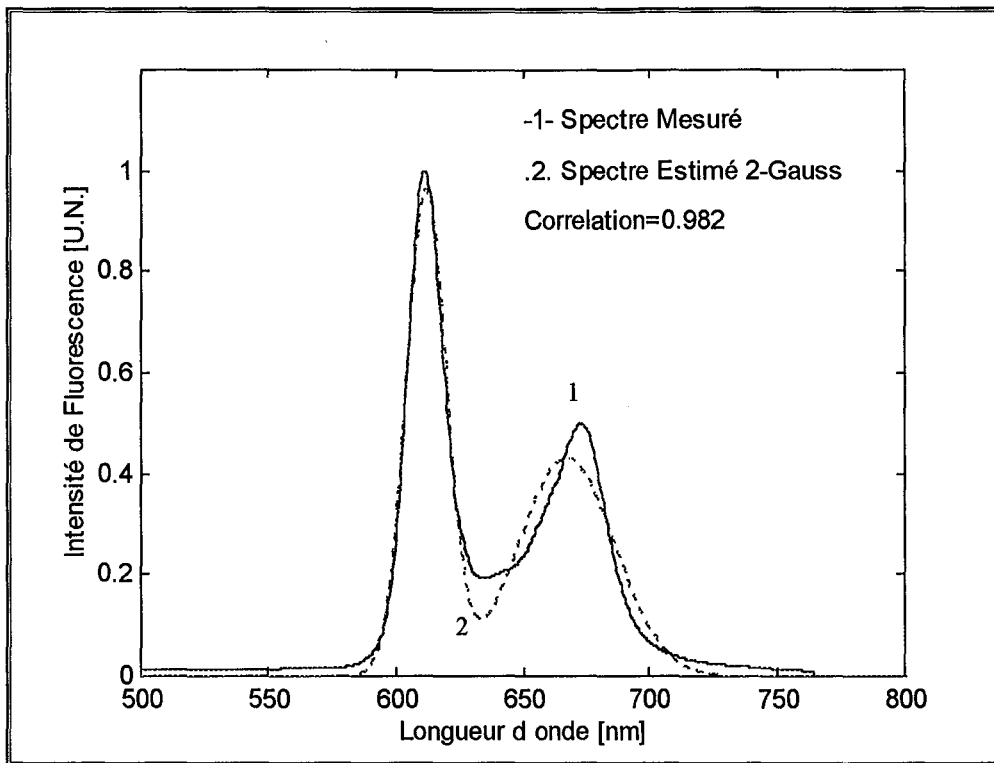


Figure 119A : Spectre de fluorescence de l'HpD modélisé par deux gaussiennes.

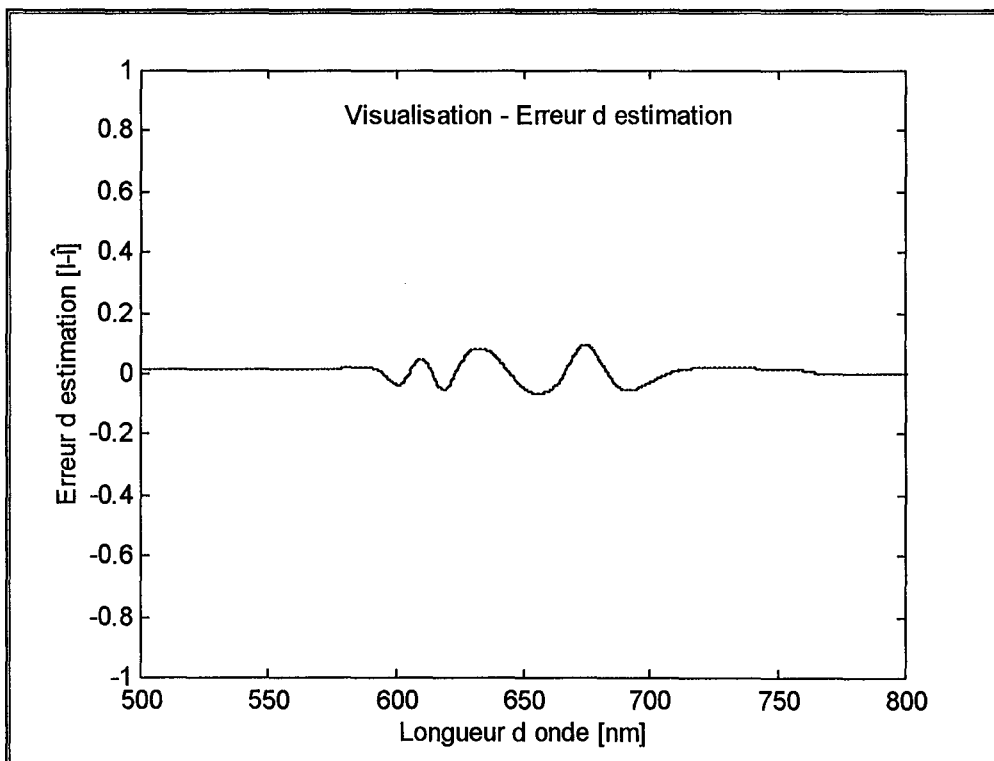


Figure 119B : Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre de l'HpD en fonction de la longueur d'onde.

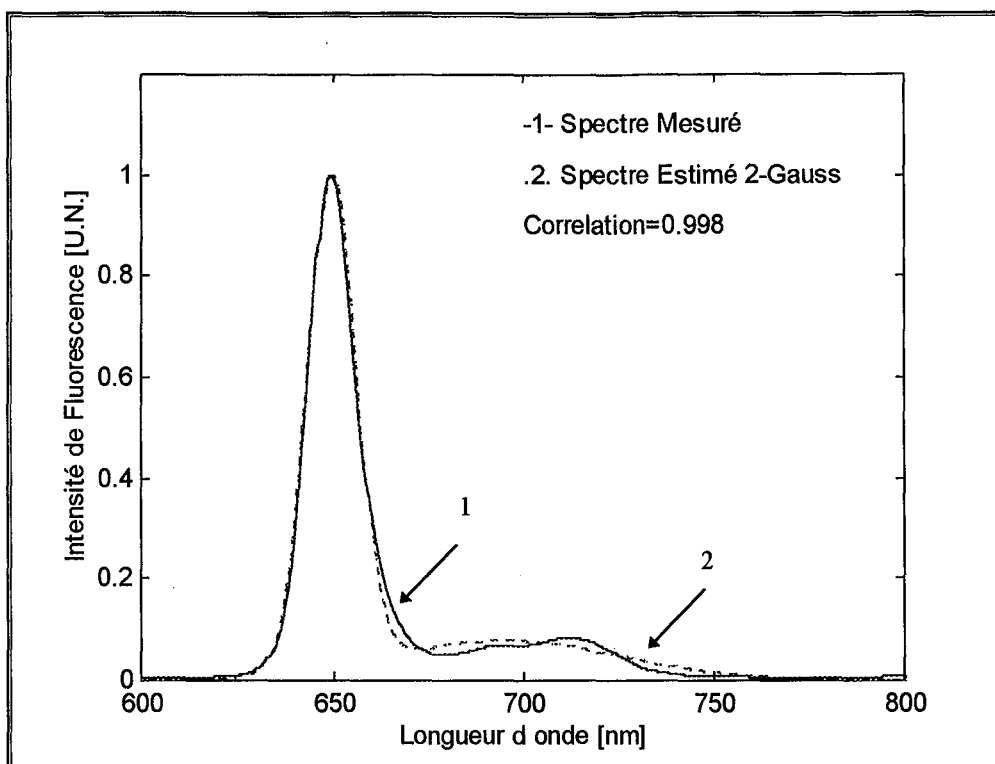


Figure 120A : Spectre de fluorescence de la mTHPC modélisé par deux gaussiennes.

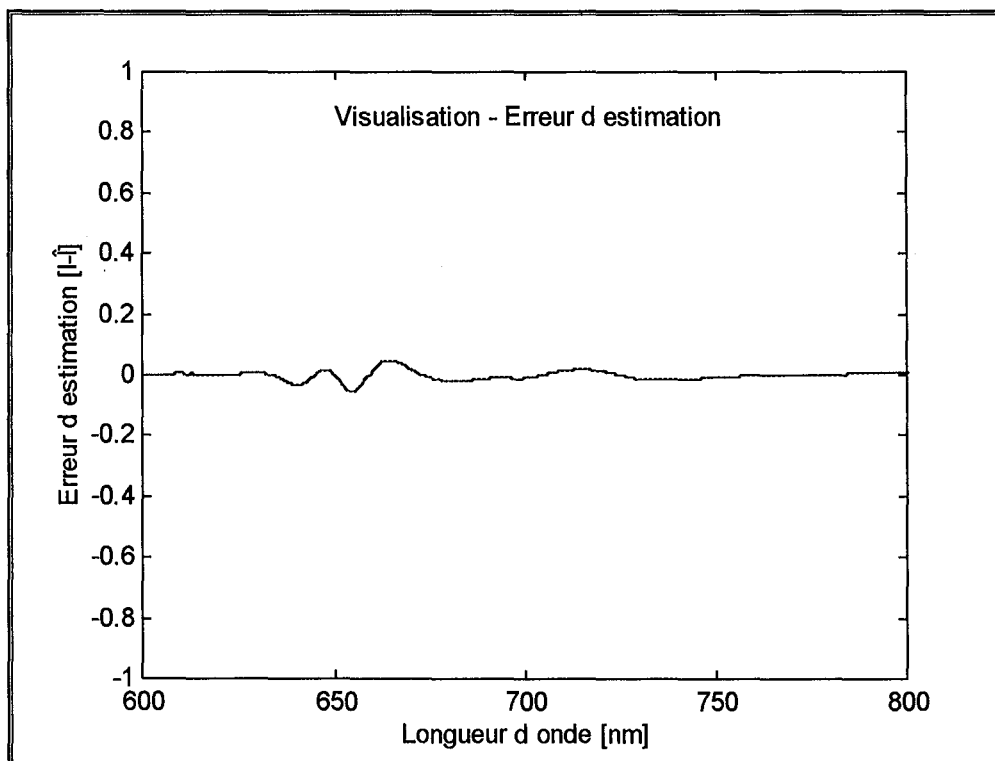


Figure 120B : Répartition de l'erreur d'estimation ($I - \hat{I}$) du spectre de la mTHPC en fonction de la longueur d'onde.

IV.8. VALIDATION GRAPHIQUE DU MODELE SUR FANTOME

Dans l'objectif de valider notre modèle, nous avons effectué des mesures spectroscopiques de fluorescence sur des fantômes qui ont été conçus de façon à simuler le comportement des tissus vivants (atténuation et autofluorescence). La Flavine (5 µg/ml) et la NADH (100 µg/ml) ont été sélectionnées pour simuler l'autofluorescence tissulaire lors d'une excitation de 364 et de 410 nm. L'HpD (5 µg/ml et 7,5 µg/ml) a été utilisée pour simuler la fluorescence des porphyrines endogènes. Les intralipides (100 mg/µl) ont été utilisés pour reproduire la diffusion des tissus. Pour l'absorption, nous avons utilisé le rouge de méthyle (70 µg/ml), qui possède une absorption maximale à 432 nm (voir deuxième partie, § VI.2.1 et troisième partie, § II.1.1). Les dilutions sont faites dans du sérum physiologique.

Ces fantômes ont été excités à 364 et à 410 nm. A la longueur d'onde d'excitation de 410 nm, seules la flavine et l'HpD sont excitables. Malgré ce fait, nous avons utilisé un modèle composé de quatre gaussiennes, comme dans l'excitation à 364 nm, afin de tester la robustesse de la méthode d'optimisation dans l'estimation des paramètres. Ainsi, cette estimation a aboutit à un coefficient de proportionnalité du NADH proche de zéro. Par conséquent un modèle à trois gaussiennes était suffisant pour reproduire le spectre de ce fantôme.

Les données initiales utilisées dans l'estimation des paramètres sont celles présentées dans le tableau 16 (page 261). Pour une première modélisation nous avons optimisé les trois paramètres de chaque gaussienne (12 paramètres pour le modèle global). Par la suite, les paramètres représentant le pic maximal (λ_{pn}) et la largeur à mi-hauteur (Bw_n) ont été fixés. Seuls les coefficients de proportionnalités ont été ajustés. Chacun de ces derniers donne le taux de participation du fluorophore correspondant dans le spectre global. Par conséquent, une combinaison linéaire des gaussiennes identifiées séparément par une méthode de moindres carrés simple devrait aboutir aux mêmes résultats. Ceci est valable dans le cas d'une excitation à 410 nm. Cependant, les valeurs des paramètres qui estiment la courbe du fantôme excité à 364 nm ont changé par rapport à celles données dans le tableau 16. En effet, les largeurs à mi-hauteur et les pics principaux de l'émission de la flavine et du NADH ont pris les valeurs suivantes : λ_p (NADH)=446 nm, Bw (NADH)=48 nm, λ_p (flavine)=512 nm, Bw (flavine)=108. Concernant la flavine, le pic principal a été décalé

de 18 nm vers les longueurs d'onde les plus courtes. De plus, un élargissement de la largeur à mi-hauteur de 18 nm a été observé. Ceci peut être lié au fait du changement de la longueur d'onde d'excitation. Pour la NADH, la diminution de la largeur à mi-hauteur peut être liée à la réabsorption du rouge de méthyle.

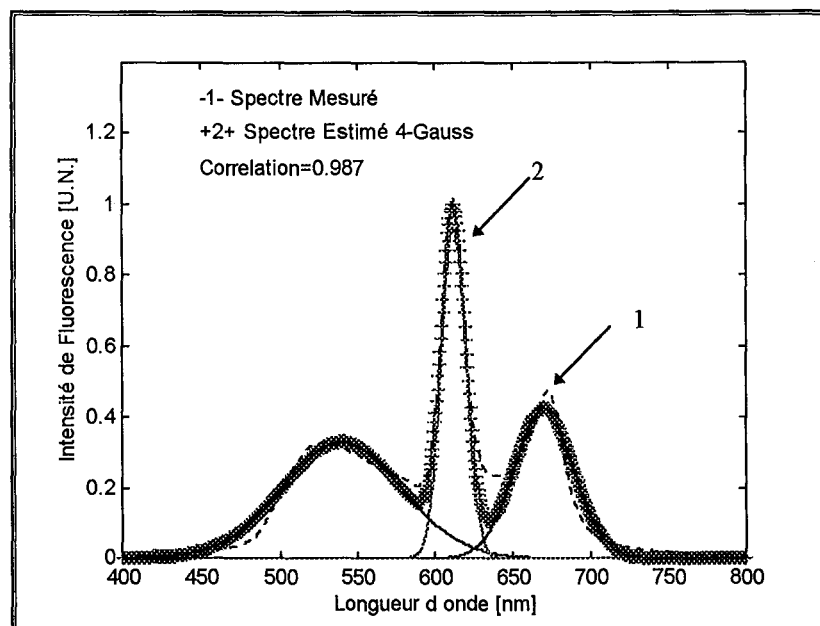


Figure 121A : Spectre de fluorescence d'un fantôme simulant l'autofluorescence tissulaire, excité à 410 nm, et le spectre estimé par quatre gaussiennes.

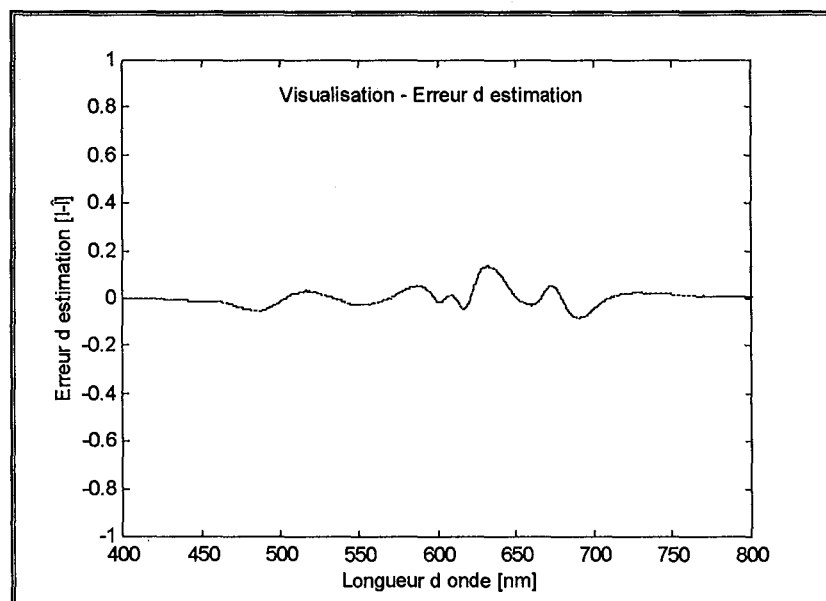


Figure 121B : Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre du fantôme simulant l'autofluorescence tissulaire en fonction de la longueur d'onde.

La représentation graphique de la courbe estimée à partir du modèle gaussien global, ainsi que le spectre du fantôme mesuré à 410 nm sont illustrés sur la figure 121A. Un coefficient de corrélation de 0,983 et un résidu de 0,99 ont été obtenus. La figure 121B montre la répartition de l'erreur d'estimation en fonction de la longueur d'onde.

La figure 122A montre la courbe estimée par quatre gaussiennes du même fantôme excité à 364 nm. La répartition de l'erreur d'estimation est donnée par la figure 122B.

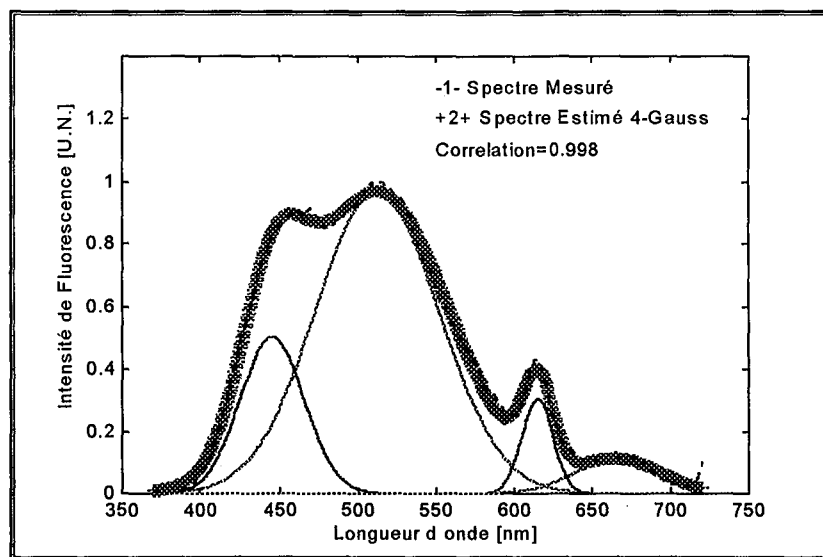


Figure 122A : Spectre de fluorescence d'un fantôme simulant l'autofluorescence tissulaire, excité à 364 nm, et le spectre estimé par quartes gaussiennes.

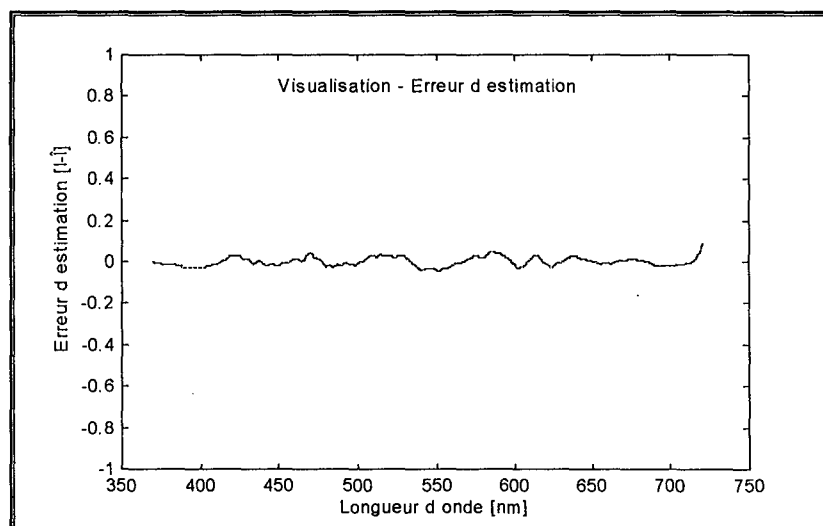


Figure 122B : Répartition de l'erreur d'estimation $(I-\hat{I})$ du spectre du fantôme simulant l'autofluorescence tissulaire en fonction de la longueur d'onde.

IV.9. APPLICATION DU MODELE GAUSSIEN A L'AUTOFLUORESCENCE TISSULAIRE

Les résultats de modélisation obtenus sur les fantômes montrent que le modèle gaussien peut être utilisé pour reconstruire les spectres de fluorescence. Cependant, l'application de ce modèle à l'identification des fluorophores responsables de l'autofluorescence tissulaire est plus délicate. En effet, les caractéristiques spectrales comme la largeur à mi-hauteur, des fluorophores endogènes mesurées en solution diffèrent de celles mesurées en milieux tissulaires. Elles varient aussi au sein d'un même organe (tumeur/tissu sain) [Anidjar 1996]. D'autre part, la réabsorption de l'autofluorescence par l'oxyhémoglobine a pour conséquence de modifier l'allure du spectre. Ainsi, la reconstruction de l'autofluorescence à partir d'une combinaison linéaire des spectres modélisés séparément ne donne qu'une approximation peu précise.

Schomacker *et al.* ont utilisé une combinaison linéaire des spectres de trois fluorophores mesurés en solution pour reconstruire le spectre d'autofluorescence des tissus du colon excités à 337 nm. Les spectres de fluorescence du collagène, du NADH et des flavines représentent les composantes de leur modèle. La variance entre le spectre d'autofluorescence et les spectres de ces composantes a été minimisée sur deux régions spectrales : 300-400 nm et 460-600 nm. Ceci a été réalisé en ajustant des coefficients de proportionnalité liés aux amplitudes des spectres de fluorescence des fluorophores utilisés. La région spectrale comprise entre 400 et 460 nm, correspondant au maximum d'absorption de l'hémoglobine a été négligée dans cette approximation [Schomacker 1992]. Cependant, l'effet de la réabsorption de l'hémoglobine a été analysé séparément.

Ainsi, afin d'identifier les fluorophores responsables de l'autofluorescence, nous devons prendre en considération le fait de la réabsorption due à l'oxyhémoglobine et le changement des caractéristiques de fluorescence dans les tissus. Pour cela notre modèle global sera composé de deux termes : le premier représente le spectre de fluorescence sans atténuation, le deuxième représente le spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine. En fait, nous supposons que la fluorescence absorbée par l'oxyhémoglobine correspond à la forme spectrale du spectre d'absorption de ce dernier. Ainsi, le modèle global s'écrit comme suit :

$$I(\lambda) = \sum_n \alpha_{nF} \cdot \exp - 2.7726 \left(\frac{\lambda - \lambda_{pnF}}{Bw_{nF}} \right)^2 - \sum_n \alpha_{nH} \cdot \exp - 2.7726 \left(\frac{\lambda - \lambda_{pnH}}{Bw_{nH}} \right)^2$$

où l'indice F représente les fluorophores et l'indice H représente les pics d'absorption de l'oxyhémoglobine.

Pour réaliser l'estimation des paramètres du modèle global, nous avons utilisé les caractéristiques des fluorophores endogènes mesurées en solution comme données initiales. Concernant l'oxyhémoglobine, nous avons fixé ces paramètres après les avoir estimés. La modélisation du spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine nous a permis d'utiliser la partie du spectre qui coïncide avec le spectre d'autofluorescence. Par exemple, pour une excitation de 410 nm on observe deux zones d'absorption "vallées" dans le spectre d'autofluorescence vers 540 et 580 nm. En appliquant uniquement les gaussiennes qui correspondent à ces zones, on peut déduire l'influence de la réabsorption sur la totalité du spectre de fluorescence, car l'amplitude de chaque gaussienne constitue une fraction de l'amplitude globale. Les gaussiennes représentant les zones d'absorption dans le spectre d'autofluorescence sont associées avec un seul coefficient de proportionnalité.

IV.9.1. Modélisation du spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine

Le spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine normé à 1 à son maximum (413 nm) a été modélisé par quatre gaussiennes dont les paramètres sont donnés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Paramètres du spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine estimés à partir du modèle gaussien.

α_{nH}	Bw_{nH} [nm]	λ_{pnH} [nm]
0,22	193	360
0,80	28	413
0,10	32	542
0,11	22	576

Le résidu et le coefficient de corrélation ont été respectivement, de 0,068 et 0,998. Le spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine et le spectre estimé sont présentés sur la figure 123A. La répartition de l'erreur d'estimation est donnée par la courbe de la figure 123B.

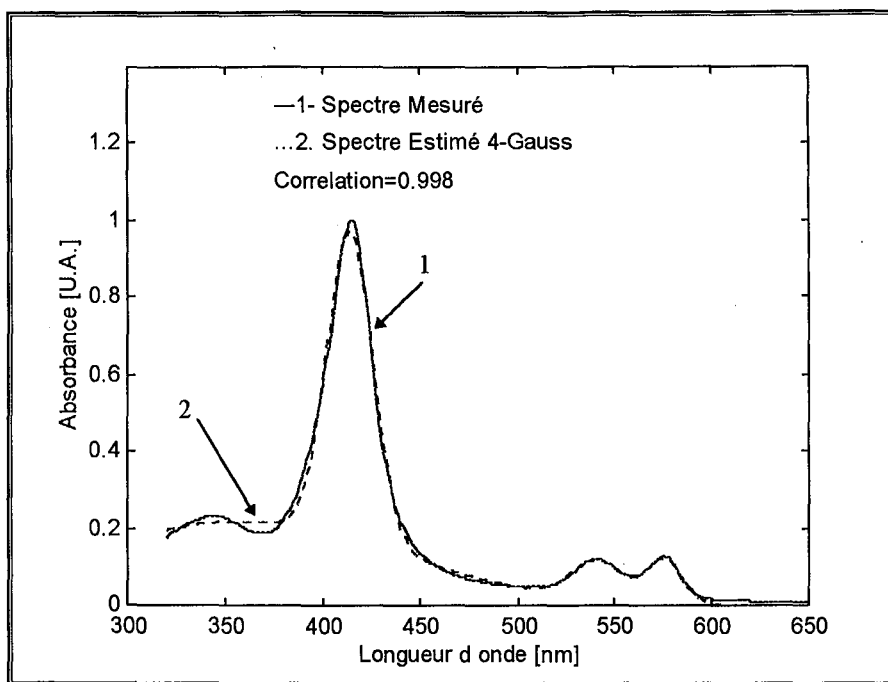


Figure 123A : Spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine et le spectre estimé par quatres gaussiennes.

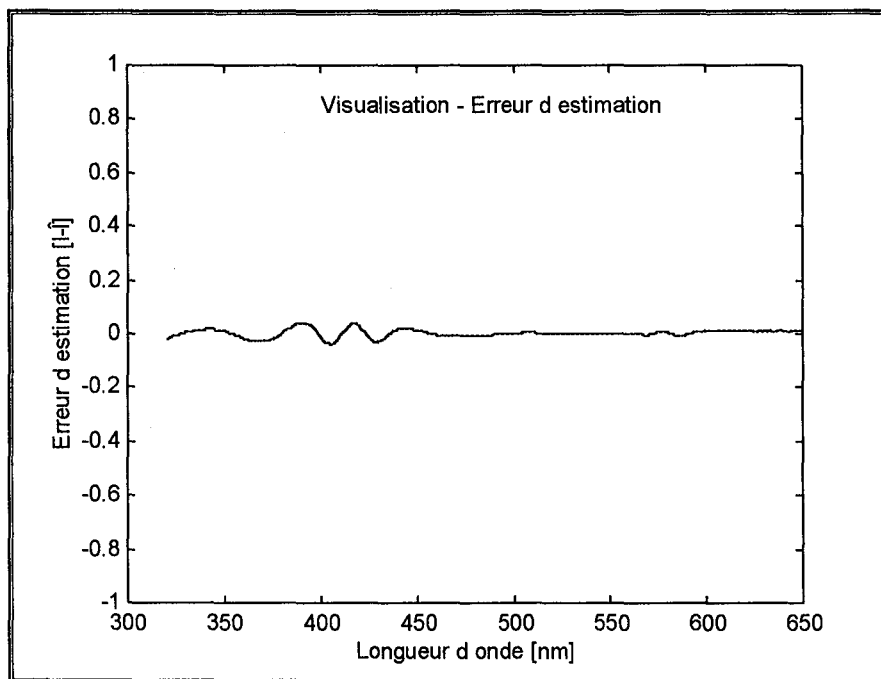


Figure 123B : Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre en fonction de la longueur d'onde.

IV.9.2. Modélisation des spectres d'auto fluorescence tissulaire

Selon l'allure du spectre d'auto fluorescence nous avons déterminé le nombre des gaussiennes nécessaires pour le reconstruire. Chaque pic ou zone d'absorption dans le spectre a été représenté par une gaussienne. Dans ce paragraphe nous donnons deux exemples des spectres d'auto fluorescence modélisés par une somme de gaussiennes. Le premier exemple est un spectre mesuré à 364 nm sur un papillome induit sur souris "hairless". Le spectre d'auto fluorescence ne montre aucune zone d'absorption de l'oxyhémoglobine (Figure 124A). Ainsi, pour une première optimisation, nous avons utilisé un modèle composé de 5 gaussiennes correspondant à l'elastine, le NADH, la flavine et les porphyrines endogènes. Les porphyrines ont été modélisées par deux gaussiennes (630 et 667 nm). Les paramètres estimés sont donnés dans le tableau 18. Le résidu de l'estimation et le coefficient de corrélation sont respectivement de 0,76 et de 0,997.

Tableau 18 : Paramètres du spectre de fluorescence d'un papillome induit sur souris "hairless" estimés à partir du modèle composé de 5 gaussiennes.

α_{nF}	Bw_{nF} [nm]	$\lambda_{p_{nF}}$ [nm]
0,26	20	411
0,50	40	445
0,77	141	503
0,16	15	630
0,14	138	667

Si nous utilisons un modèle composé de 6 gaussiennes dans lequel on fixe les longueurs d'onde de 5 pics données dans le tableau précédent, on obtient une approximation qui se superpose parfaitement au spectre mesuré. Les paramètres estimés dans ce cas sont donnés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Paramètres du spectre de fluorescence d'un papillome induit sur souris "hairless" estimés à partir du modèle composé de 6 gaussiennes.

α_{nF}	BW_{nF} [nm]	$\lambda_{p_{nF}}$ [nm]
0,37	27	411
0,65	42	445
0,77	103	503
0,23	90	630
0,86	15	595
0,12	123	667

La gaussienne supplémentaire de longueur d'onde centrale de 595 nm a permis d'approximer le spectre d'autofluorescence avec un résidu de 0,099 et un coefficient de corrélation de 1. La largeur à mi-hauteur des différentes composantes a pris des valeurs très proches de celles mesurées en solution à l'exception du NADH. Il est possible que la largeur à mi-hauteur du spectre du NADH oxydé est plus étroite que celle du NADH réduit (mesuré en solution). La réabsorption de l'oxyhémoglobine peut également à l'origine de la diminution de la largeur à mi-hauteur. Cependant, comme le spectre d'autofluorescence manqué de zones d'absorption dues à l'oxyhémoglobine (540 et 580 nm), nous avons exclu cette hypothèse. Ainsi, il paraît que le pic identifié à 595 nm est dû aux porphyrines endogènes ou à un fluorophore non identifié. En considérant la présence de ce pic, différents spectres d'autofluorescence de la voie aérodigestive supérieure, de la vessie et des bronches ont été approximés avec des résidus très faibles et des coefficients de corrélation égale à 1. Des analyses supplémentaires sur différents types de lésions et de tissus sains doivent nous permettre de confirmer la présence d'un fluorophore émettant à 595 nm.

La courbe approximée par six gaussiennes ainsi que la courbe donnant la répartition de l'erreur d'estimation sont présentées sur les figures 125A et 125B.

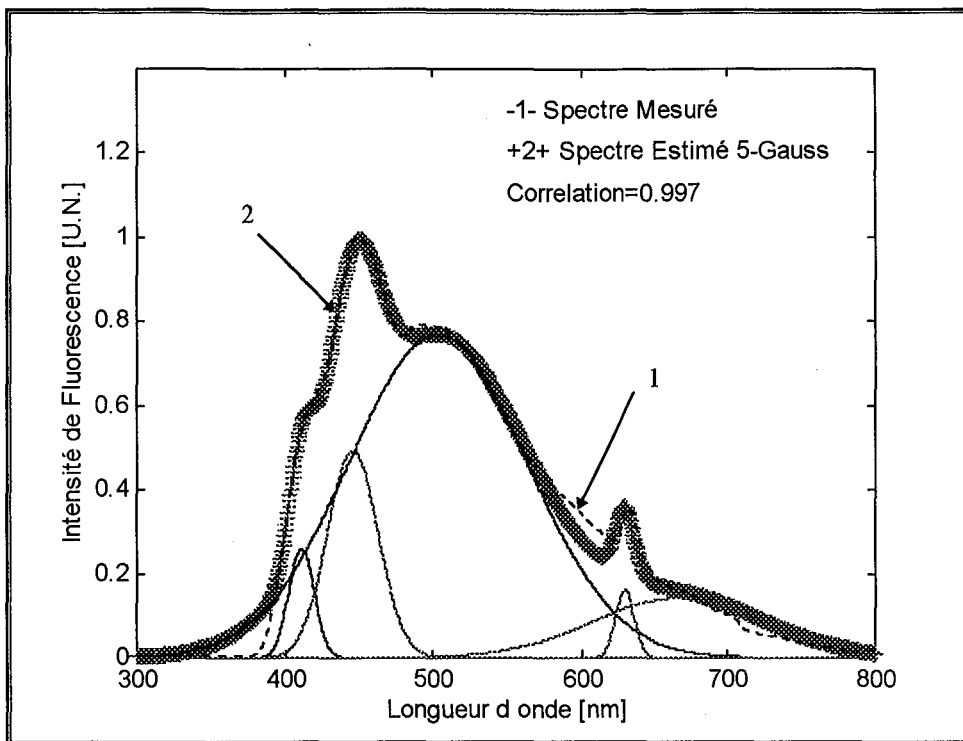


Figure 124A : Spectre d'autofluorescence d'un papillome induit sur souris, mesuré à une excitation de 364 nm et le spectre estimé par cinq gaussiennes.

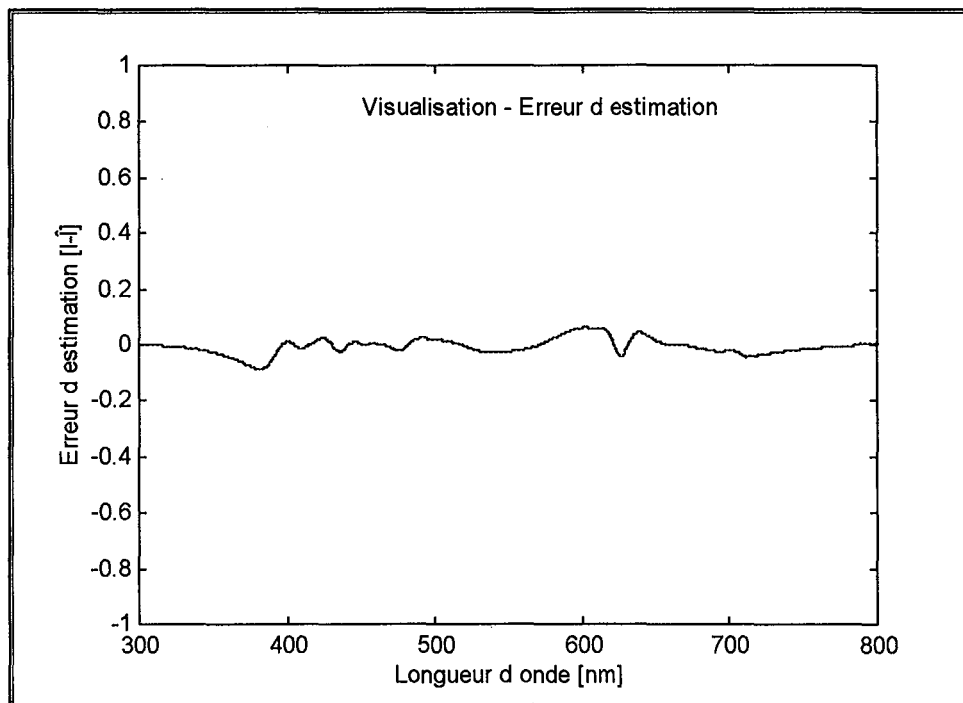


Figure 124B : Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre du papillome en fonction de la longueur d'onde.

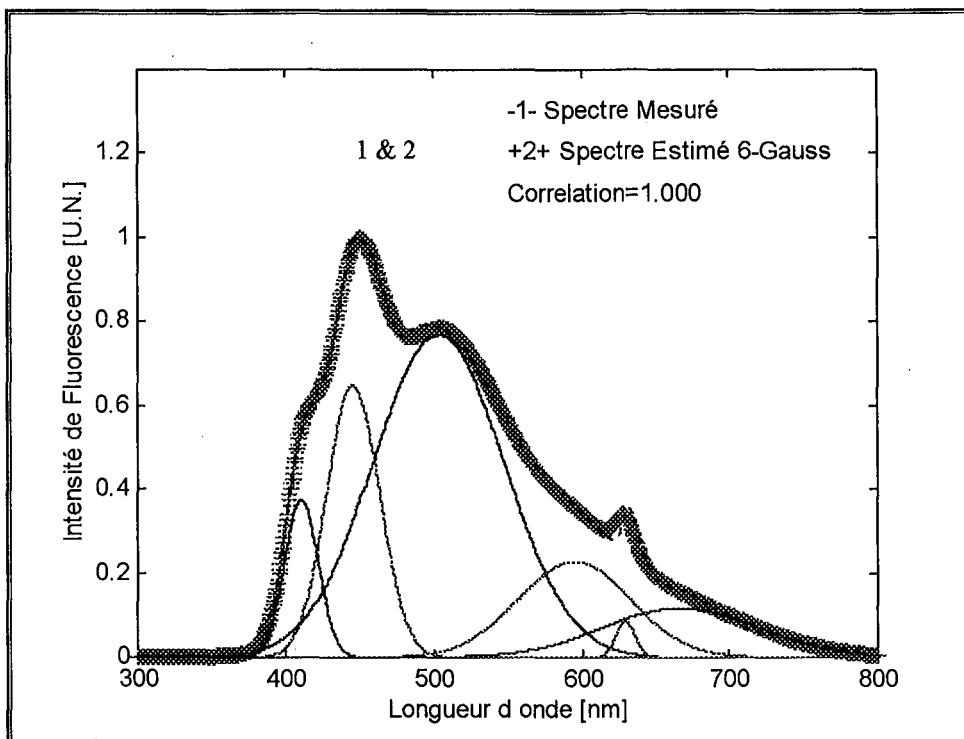


Figure 125A : Spectre d'auto fluorescence d'un papillome induit sur souris, mesuré à une excitation de 364 nm et le spectre estimé par six gaussiennes.

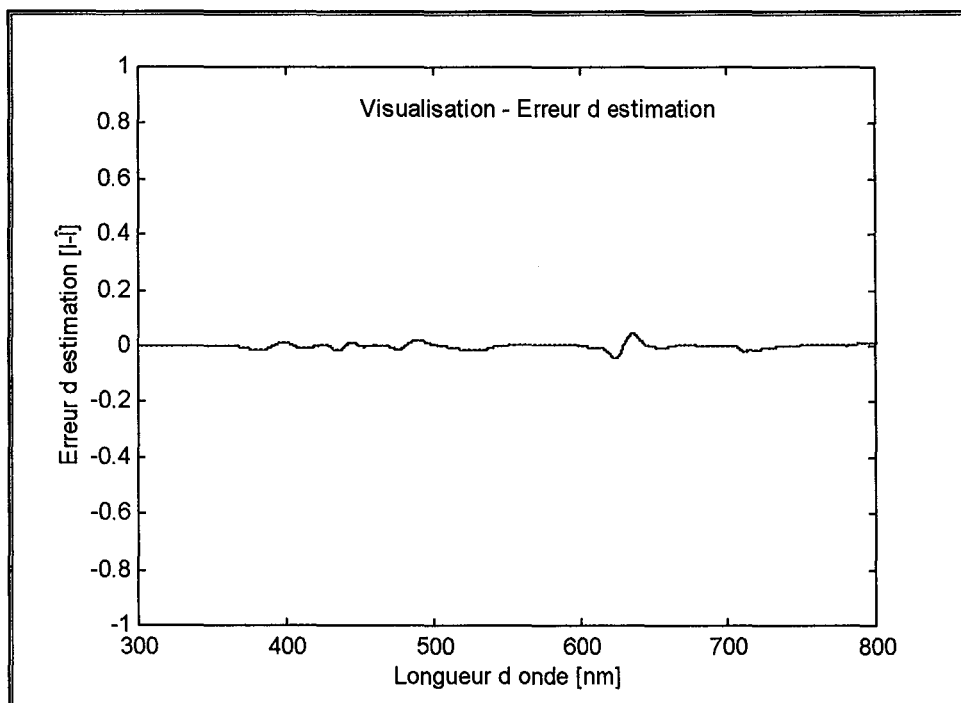


Figure 125B : Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre du papillome en fonction de la longueur d'onde.

Le deuxième exemple que nous présentons dans ce paragraphe est un spectre mesuré sur un carcinome urothélial à une excitation de 364 nm (Figure 126A). Sur ce spectre nous observons la présence des zones d'absorption de l'oxyhémoglobine ainsi que trois pics de fluorescence autour de 458, 500 et 610 nm. Dans cette exemple nous avons utilisé un modèle composé de trois gaussiennes. Avec ce modèle nous avons déduit l'absorption de l'oxyhémoglobine en fixant les paramètres de son spectre d'absorption. Un coefficient de proportionnalité global a été appliqué à ces paramètre comme suit.

$$\hat{I} = I - \alpha_H \cdot S_H$$

où \hat{I} est le spectre estimé, I est le spectre mesuré, α_H est un coefficient de proportionnalité lié à la concentration de l'hémoglobine et S_H représente le spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine normé à 1, et dont les paramètres sont estimé par le modèle gaussien.

Les paramètres estimés pour ce spectre sont donnés dans le tableau 20. Les valeurs données dans ce tableau montrent un changement de la largeur à mi-hauteur des fluorophores ayant induit l'autofluorescence par rapport à ceux obtenus dans le cas précédent. De plus, le pic situé vers 610 nm est clairement discriminé. Ceci peut être expliqué par la forte absorption de l'oxyhémoglobine, notamment pour le pic du NADH. Le décalage de ce pic de 445 à 458 et la diminution de la largeur à mi-hauteur de 54% sont probablement dus à la réabsorption. D'autre part, la modification des caractéristiques du microenvironnement physico-chimique comme le pH peut être à l'origine de ces changements. L'autre hypothèse est que les fluorophores modélisés ne soient pas forcément ceux qui en cause.

Tableau 20 : Paramètres du spectre de fluorescence d'un carcinome urothélial humain estimés à partir du modèle composé de 3 gaussiennes et du spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine.

α_H	α_{nF}	Bw_{nF} [nm]	$\lambda_{p_{nF}}$ [nm]
1	0,25	21	458
	0,99	81	494
	0,57	111	609

En additionnant la proportion absorbée par l'oxyhémoglobine au spectre mesuré, on obtient un spectre corrigée. La figure 126A montre le spectre mesuré, le spectre estimé et le spectre

corrigé du carcinome urothélial. La répartition de l'erreur d'estimation est donnée par la courbe de la figure 126B. Le spectre obtenu ainsi est probablement représentatif de l'allure spectrale avant la réabsorption. Cependant, la connaissance des paramètres spectraux des fluorophores endogènes des tissus sera nécessaire pour tirer des conclusions. Ceci peut être réalisé par la décomposition de nombreux spectres d'autofluorescence.

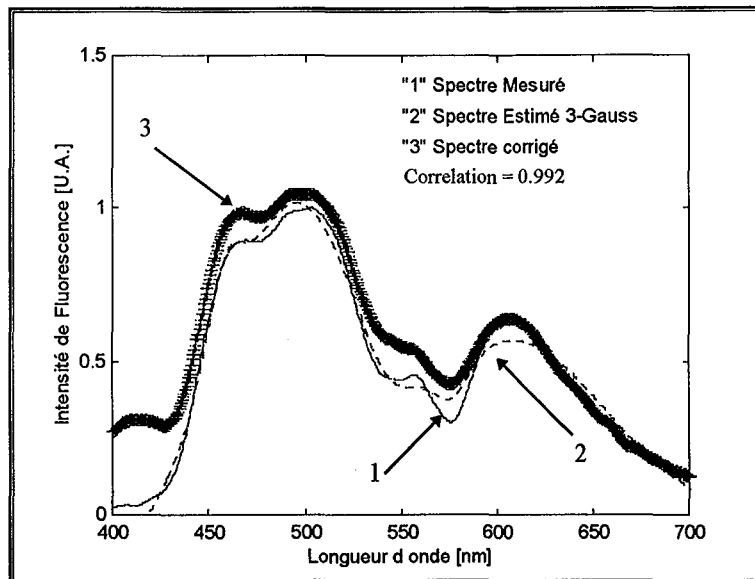


Figure 126A : Spectre d'autofluorescence d'un carcinome urothélial, mesuré à une excitation de 364 nm et le spectre estimé par trois gaussiennes.

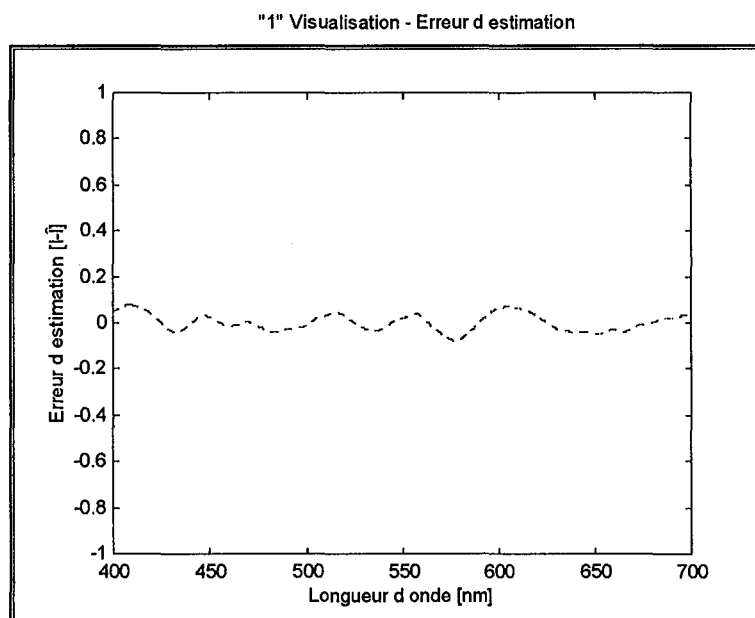


Figure 126B : Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre du carcinome en fonction de la longueur d'onde.

IV.10. INTERETS CLINIQUES DU MODELE

Avec les différents spectres d'autofluorescence analysés dans ce travail, nous avons constaté que l'autofluorescence des tissus sains est essentiellement due au NADH et à la flavine. Les porphyrines endogènes et/ou d'autres fluorophores émettant à 600-610 nm s'ajoutent à ces fluorophores dans les lésions tumorales. Les taux de participation ainsi que l'intensité absolue de l'ensemble de ces fluorophores varie d'un tissu à un autre.

L'application du modèle gaussien à la décomposition des spectres d'autofluorescence des différents types de tissus doit nous permettre d'établir des données cohérentes sur les caractéristiques spectrales des fluorophores *in situ*. Des valeurs moyennes des paramètres estimés dans les différents spectres d'autofluorescence pourraient être utilisées dans un modèle à combinaison linéaire. Ainsi, seulement les coefficients de proportionnalité seront ajustés pour reconstruire les spectres d'autofluorescence. Les coefficients déduits ainsi peuvent être utilisés dans des modèles statistiques d'analyse discriminante multivariable pour définir les critères de distinction optimale entre tissu sain et tissu pathologique. En effet, comme tous les spectres d'autofluorescence mesurés avec notre système ont une échelle d'intensité identique, leur transformation à un spectre unitaire ne modifie pas la réalité des intensités mesurées au départ. Lorsque les coefficients de proportionnalité sont multipliés par l'intensité spectrale maximale normalisée de l'autofluorescence, on obtient l'intensité individuelle de chaque fluorophore. Une telle approche permet d'exploiter des critères de distinction liés à la composition biochimique des tissus. Ces paramètres tiennent compte de l'intensité de fluorescence et de la structure spectrale. De plus, toute modification spectrale due à la réabsorption de l'oxyhémoglobine peut être distinguée. En utilisant des modèles intermédiaires liés à l'absorbance de l'hémoglobine et à l'intensité de fluorescence, on peut estimer la concentration de l'hémoglobine dans le site examiné. Ceci peut être bénéfique pour l'application de la thérapie photodynamique : il permet d'estimer la dose d'énergie réellement absorbée par le photosensibilisant en prenant compte de l'énergie absorbée par l'hémoglobine, il permet d'estimer le capital oxygène présent dans le tissu avant traitement.

CONCLUSION

Le travail réalisé dans cette troisième partie consistait à optimiser les possibilités de détection des lésions tumorales en utilisant leurs caractéristiques d'autofluorescence. L'instrumentation de détection développée pour cet objectif a été validée par des applications cliniques *in vivo et ex vivo*. La technique de spectroscopie de fluorescence nous a permis de caractériser les tissus sains et pathologiques de la voie aérodigestive supérieure, des poumons et de la vessie. Les faibles intensités d'autofluorescence des lésions inflammatoires de la vessie ont été liées à la forte absorption de la lumière d'excitation et de la lumière de fluorescence par l'hémoglobine. Ceci montre que la distinction des tissus cancéreux des tissus normaux ne peut pas être uniquement basée sur l'intensité de fluorescence. De même, la différenciation des lésions tumorales uniquement par rapport à l'autofluorescence des porphyrines endogènes paraît non adéquate. Nous avons montré que les porphyrines endogènes ne sont pas seulement caractéristiques des lésions tumorales mais également du tissu sain de la face supérieure de la langue. Néanmoins, leurs pics peuvent être utilisés pour caractériser les lésions tumorales car ils sont associés à des faibles intensités relatives d'autofluorescence.

La longueur d'onde d'excitation de 410 nm paraît plus adaptée à la photodétection des carcinomes urothéliaux que la longueur d'onde de 364 nm. Les spectres d'autofluorescence mesurés à 410 nm sont peu modifiés par la réabsorption de l'oxyhémoglobine.

La spectroscopie de la fluorescence induite nous a permis d'évaluer la cinétique et la biodistribution des photosensibilisants. L'HPLC a confirmé les résultats obtenus avec cette technique.

Le modèle gaussien a permis une représentation adéquate des spectres de fluorescence ; ces paramètres sont commodes à interpréter. Les résultats préliminaires obtenus avec ce modèle montrent qu'il peut être utilisé pour séparer l'influence de la réabsorption due à l'oxyhémoglobine.

CONCLUSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Notre étude théorique et expérimentale a abouti à la conception et à la réalisation d'une instrumentation spectroscopique de détection d'autofluorescence et de fluorescence induite. Le capteur à trois fibres optiques que nous avons conçu a permis de réaliser des mesures spectrales indépendantes des paramètres instrumentaux. Ceci a permis de valider l'analyse comparative entre les différents spectres. Grâce à la faible dimension du capteur et à la nature non invasive de la photodétection, des mesures spectroscopiques de fluorescence peuvent être effectuées à l'occasion de toutes explorations endoscopiques.

La synchronisation entre l'acquisition de fluorescence et l'excitation du tissu examiné a participé à l'optimisation des conditions de la photodétection, car elle a permis de diminuer l'effet du photoblanchiment des fluorophores exogènes et endogènes.

La détection des états pathologiques tissulaires par spectroscopie d'autofluorescence a été démontrée. Les résultats obtenus à partir des différents carcinomes épidermoïdes et urothéliaux montrent bien une différence entre les tissus normaux et les tissus pathologiques. La différence d'intensité spectrale entre les tissus sains et les tissus pathologiques était en majorité due à la différence d'absorption de la lumière d'excitation entre ces tissus. Les longueurs d'ondes d'excitation dans l'ultraviolet générant une fluorescence qui coïncide avec le spectre d'absorption des chromophores tissulaires ne permettaient pas une distinction optimale des tissus pathologiques. L'utilisation des longueurs d'onde d'excitation dans le bleu était mieux adaptée à la photodétection par autofluorescence. Cependant, seul l'examen anatomo-pathologique sur biopsie permet d'affirmer la nature et éventuellement la malignité des lésions ainsi révélées.

L'analyse des cinétiques de la mTHPC et de l'HpD rentre dans le cadre d'un protocole du traitement des carcinomes épidermoïdes superficiels des voies aérodigestives supérieures. A l'aide du système spectroscopique, nous suivons la biodistribution du photosensibilisant et nous déduisons le meilleur intervalle de temps pour le traitement photodynamique (entre 48 et 72 heures après l'injection pour la mTHPC et à 48 heures pour l'HpD).

La spectroscopie de fluorescence ne constitue pas une technique indépendante de diagnostic. En effet, elle ne permet que des mesures ponctuelles. Elle peut être associée à des systèmes d'imagerie de fluorescence afin d'affiner la détection sur les zones localisées. Beaucoup de travail reste à faire pour affirmer le potentiel de cette technique comme un outil de diagnostic. D'autres campagnes de mesures sur lésions précoces seront nécessaires. Ceci doit nous permettre de définir des critères de distinction. De plus, afin de séparer l'influence des paramètres optiques sur le signal de fluorescence, nous pensons coupler notre système avec une spectroscopie de réflectance diffuse. Une telle démarche permet de lier les changements des caractéristiques de fluorescence à l'état pathologique du tissu examiné.

Des modèles intermédiaires seront nécessaires pour lier l'influence des paramètres optiques et celle de la concentration des fluorophores aux coefficients de proportionnalité du modèle gaussien. Ceci nous permettra d'identifier tous les fluorophores participant à l'émission de fluorescence et de déterminer leur concentration ainsi que la spécificité de certains fluorophores aux états pathologiques. Afin d'aboutir à une meilleure distinction des lésions tumorales, nous voudrions estimer des valeurs moyennes, dans différents types de tissus, des paramètres spectraux des fluorophores endogènes.

La biopsie optique n'est pas encore une technique pour aujourd'hui. Mais l'intérêt médical pour le principe d'une mesure de la fluorescence spontanée ou induite non invasive et répétitive justifie pleinement la poursuite des recherches, tant dans le domaine de reconnaissance des signaux significatifs que pour des méthodes pour les produire.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **A'Amar O.**, "Méthodes et expérimentations pour la détermination du coefficient d'atténuation totale de la lumière dans les tissus vivants. *Rapport de Recherche de DEA-ATS, INPL, 1993.*
- [2] **A'Amar O.**, "Résultats obtenus pour la détermination des coefficients d'absorption et de diffusion de la lumière dans les tissus vivants", *Rapport Bibliographique de DEA-ATS, INPL, 1993.*
- [3] **A'Amar O., Lignon D., Menard O., Begorre H., Guillemain F., Yvroud E.**, "Autofluorescence spectroscopy of normal and malignant tissues: both in vivo and ex-vivo measurements in the upper aero-digestive tract and lung tissues", *Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancers and Other Diseases III: Optical Biopsy, Proc. SPIE 2679 :42-50, 1996.*
- [4] **A'Amar O., Lignon D., Begorre H., Guillemain F., Yvroud E.** "Gaussian Analyzing Model of Tissue Light-Induced Fluorescence for the Detection of Early Cancers", *SPIE: Optical Tomography and Spectroscopy of Tissue: Theory, Instrumentation, Model, and Human Studies II*, à paraître, *Proc. SPIE 2979, 1997.*
- [5] **Abdul Nour C.** "Identification de paramètres optiques de structures tissulaires : Instrumentation prototype associée, application à la dosimétrie de la thérapie photodynamique", *Thèse de doctorat en Automatique et Traitement du Signal de L'INPL, 1994.*
- [6] **Alfano R. R., Pradhan A., Tang G. C.**, "Optical spectroscopic diagnosis of cancer and normal breast tissues", *Optical Society of America B, 6 : 1015-1023, 1989.*
- [7] **Alian W., Andersson-Engels S., Svanberg K., Svanberg S.**, "Laser-induced fluorescence studies of meso-tetra (hydroxyphenyl) chlorin malignant and normal tissues in rats", *British Journal of Cancer 70 :880-885, 1994.*
- [8] **Ambroz M., MacRobert A. J., Morgan J., Rumbles G., Foley M. S. C., Phillips D.**, "Time-resolved fluorescence spectroscopy and intracellular imaging of disulphonated aluminium phthalocyanine", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 22 : 105-117, 1994.*
- [9] **Amiel M., Doyon D., Fischgold H., Schmidt R.**, "Actualités en radiodiagnostic, nouvelles technologies", *Masson, 1982.*
- [10] **Amler E., Mazzanti L., Bertoli E., Kotyk A.**, "Lifetime determination of low sample concentrations: A new cuvette for highly accurate and sensitive fluorescence measurements", *Biochemistry International 27(5) : 771-776, 1992.*

- [11] **Andersson P. S., Kjellen E., Montan S., Svanberg K., Svanberg S.**, "Autofluorescence of various rodent tissues and human skin tumour samples", *Lasers in Medical Science* 2(41) : 41-49, 1987.
- [12] **Andersson T, Berg R., Johansson J., Killander D., Svanberg K., Svanberg S., Yuanlong Y.**, "Photodynamic therapy in interplay with fluorescence diagnostics in the treatment of human superficial malignancies", *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection, Proc. SPIE 1645* : 187-199, 1992.
- [13] **Andersson-Engels S., Wilson B. C.**, "In vivo fluorescence in clinical oncology : Fundamental and practical issues", *Journal of Cell Pharmacology*. 3 :66-79, 1992.
- [14] **Andersson-Engels S., Ankerst J., Johansson J., Svanberg K., Svanberg S.**, "Laser-induced fluorescence in malignant and normal tissue of rats injected with benzoporphyrin derivative", *Photochemistry and Photobiology* 57(6) : 978-983, 1993.
- [15] **Andersson-Engels S., Johansson J., Svanberg S.**, "Medical diagnostic system based on simultaneous multispectral fluorescence imaging", *Applied Optics* 33(34) : 8022-8029, 1994.
- [16] **Andersson-Engels S., Berg R., Svanberg K., Svanberg S.**, "Multi-colour fluorescence imaging in connection with photodynamic therapy of δ -aminolevulinic acid (ALA) sensitised skin malignancies", *Bioimaging* 3 : 134-143, 1995.
- [17] **Andersson-Engels S., Afkintenberg C., Svanberg K., Svanberg S.**, "In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics", *Physics in Medicine and Biology* 42(5) : 815-824, 1997.
- [18] **Anidjar M., Cussenot O., Avrillier S., Etori D., Teillac P., Le Duc A.**, "Assessment of different excitation wavelengths for photodetecting neoplastic urothelial lesions by laser-induced autofluorescence spectroscopy", *Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancer and Other Diseases III : Optical Biopsy, Proc. SPIE 2679* :204-214, 1996.
- [19] **Anidjar M., Cussenot O., Blais J., Bourdon O., Avrillier S., Etori D., Villette J.-M., Fiet J., Teillac P., LE Duc A.**, "Argon laser induced autofluorescence ay distinguish between normal and tumor urothelial cells : A microspectrofluorimetric study", *The Journal of Urology* 155 : 1771-1774, 1996.
- [20] **Ankerst J., Montan S., Svanberg K., Svanberg S.**, "Laser-induced fluorescence studies of hematoporphyrin derivative (HPD) in normal and tumor tissue of rat", *Applied Spectroscopy* 38(6) : 890-896, 1984.
- [21] **Asch G. et col. J.**, "Les capteurs en instrumentation industrielle", *Dunod-Bordas*,1982.
- [22] **Avrillier S., Tinet E., Delettre E.**, "Monte Carlo simulation of collimated beam transmission through turbid media", *Journal de Physique* 51 : 2521-2542, 1990.

- [23] **Avrillier S., A., Godard B., (Coordinateur Chavoïn J.-P.),** "Principe physique des lasers continus et impulsions", *Encyclopédie des Lasers en médecine et en chirurgie, Bases physiques et principes fondamentaux, PICCIN, Italie, I.1 : 3-24, 1995.*
- [24] **Antonetti A., Godard B., Lecarpentier Y., (Coordinateur Chavoïn J.-P.),** "Principe physique des lasers continus et impulsions", *Encyclopédie des Lasers en médecine et en chirurgie, Bases physiques et principes fondamentaux, PICCIN, Italie, I.2 : 25-47, 1995.*
- [25] **Balasubramanian S., Elangovan V., Govindasamy S.,** "Fluorescence spectroscopic identification of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis", *Carcinogenesis 16(10) : 2461-2465, 1995.*
- [26] **Baraga J. J., Rava R. P., Taroni P., Kittrell C., Fitzmaurice M., Feld M. S.,** "Laser induced fluorescence spectroscopy of normal and atherosclerotic human aorta using 306-310 nm excitation". *Lasers in Surgery and Medicine, 10 : 245-261, 1990.*
- [27] **Barber D. C., VanDerMeid K. R., Gibson S. L., Hilf R., Whitten D. G.,** "Photosensitizing activities of picket fence porphyrins *in Vitro* and *in Vivo*", *Cancer Research 51 : 1836-1845, 1991.*
- [28] **Barriol J., Rivall J.-L.,** Spectroscopies de la molécule, *Presses Universitaires de France, 1970.*
- [29] **Berenbaum M. C., Bonnett R., Chevretton E. B., Akande-Adebakin S. L., Ruston M.,** "Selectivity of meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrins and chlorins and of photofrin II in causing photodamage in tumour, skin, muscle and bladder. The concept of cost-benefit in analysing the results", *Lasers in Medical Science 8 : 235-243, 1993.*
- [30] **Betz V., Schneckenburger H., Alleröder H. P., Sybrecht G. W., Meyer J.-U.,** "Evaluation of changes in the NADH level between carcinogenic and normal tissue samples by use of fluorescence spectroscopy", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE 2324 : 284-291, 1995.*
- [31] **Beuthan J., Bocher T., Roggan A., Schmitt I., Weber A., Müller G.,** "Investigations concerning the determination of NADH-concentrations using optical biopsy", *Proc. SPIE 2135 : 147-156, 1994.*
- [32] **Bigio I. J., Boyer J. D., Johnson T. M., Lacey J., Mourant J. R., Conn R. L., Bohorfooush A. G.,** "Optical diagnostics based on elastic scattering : An update of clinical demonstrations with the optical biopsy system", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE 2324 : 46-54, 1995.*
- [33] **Bjorkman D. J., Samowitz W. S., Brigham E. J., Peterson B. J., Straight R.,** "Fluorescence localization of early colonic cancer in the rat by hematoporphyrin derivative", *Lasers in Surgery and Medicine 11 : 263-270, 1991.*

- [34] **Bodaness R. S., Heller D. F., Krasinski J., King D. S.**, "The two-photon laser-induced fluorescence of tumor-localizing photosensitizer hematoporphyrin derivative", *The Journal of Biological Chemistry* 261(26) : 12098-12101, 1986.
- [35] **Bottiroli G., Balzarini P., Croce A. C.**, "Autofluorescence properties of colonic mucosa : dependence on excitation wavelength", *Proc. SPIE* 2927 : 173-179, 1996.
- [36] **Boulnois J.-L.**, "Sur les processus photophysiques dans les applications médicales des lasers (1^{ère} partie) ", *RBM* 9(1) : 26-30, 1986.
- [37] **Boulnois J.-L.**, "Sur les processus photophysiques dans les applications médicales des lasers (2^e partie) ", *RBM* 9(2) : 69-76, 1986.
- [38] **Boustany N. N., Manoharan R., Dasari R. R., Feld M. S.**, "Analysis of normal and diseased colon mucosa using ultraviolet resonance Raman spectroscopy", *Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancer and Other Diseases III : Optical Biopsy, Proc. SPIE* 2679 : 66-70, 1996.
- [39] **Bossu E., A'Amar O., Notter D., Labrude P., Vigneron C., Guillemin F.**, "Determination of the maximal tumor/normal skin ratio after HpD or m-THPC administration in hairless mouse (Skh-1) by fluorescence spectroscopy, a non invasive method", *Anti-Cancer Drugs* 8 : 67-72, 1997.
- [40] **Braichotte D., Wagnières G., Monnier Ph., Savary M., Bays R., van den Bergh H., Châtelain A.**, "Endoscopic tissue autofluorescence measurements in the upper aerodigestive tract and the bronchi", *Future Trends in Biomedical Applications of Lasers, Proc. SPIE* 1525 : 212-218, 1991.
- [41] **Braichotte D., Wagnières G., Monnier Ph., Bays R., van den Bergh H.**, "Clinical pharmacokinetics studies of photofrin II by fluorescence spectroscopy", *Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers, Proc. SPIE* : 883-888, 1992.
- [42] **Braichotte D., Wagnières G., Philippoz J.-M., Bays R., Ris H.-B., van den Bergh H.**, "Preliminary clinical results on a second generation photosensitizer : mTHPC". *Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers, Proc. SPIE* : 461-464, 1992.
- [43] **Braichotte D., Wagnières G., Philippoz J.-M., Bays R., Ris H.-B., Monnier Ph., Châtelain A., van den Bergh H.**, "Clinical LIF pharmacokinetic measurements with Photofrin II for optimizing the photodetection of early cancer", *Optical methods for Tumor Treatment and Detection, Proc. SPIE* 1645 : 229-240, 1992.
- [44] **Braichotte D. R., Wagnières G. A., Philippoz J.-M., Bays R., Monnier Ph., van den Bergh H. E.**, "Clinical Pharmacokinetics studies of photofrin by fluorescence spectroscopy in the oral cavity, the esophagus and the bronchi", *Cancer* 75(11) : 2768-2778, 1995.

- [45] Braichotte D. R., Savary J.-F., Glanzmann T., Westermann P., Folli S., Wagnières G., Monnier Ph., van den Bergh H., "Clinical pharmacokinetics studies of tetra (meta-hydroxyphenyl)chlorin in squamous cell carcinoma by fluorescence spectroscopy at 2 wavelengths", *International Journal of Cancer* 63 : 198-204, 1995.
- [46] Brault D., (Coordinateur Chavoïn J.-P.), "Effet photochimiques : Principe de la photochimiothérapie", *Encyclopédie des Lasers en médecine et en chirurgie, Bases physiques et principes fondamentaux, PICCIN, Italie, III.2* : 215-231, 1995.
- [47] Brennan III J. F., Romer T. J., Wang Y., Fitzmaurice M., Lees R. S., Kramer J. R., Feld M. S., "Histochemical analysis of human coronary artery using near-infrared Raman spectroscopy", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE 2324* : 98-102, 1995.
- [48] Brown M. B., Edmonds T. E., Miller J. N., Riley D. P., Seare N. J., "Novel instrumentation and biomedical applications of very near infrared fluorescence", *Analyst* 118 : 407-410, 1993.
- [49] Buchelt M., Katterschafka T., Horvat R., Kutschera H.-P., Kicking W., Laufer G., "Fluorescence guided excimer laser ablation of intervertebral discs in vitro", *Lasers in Surgery and Medicine* 11 : 280-286, 1991.
- [50] Buthiau D., "Progrès en scanner et I.R.M., Perspective cliniques", *Vigot*, 1994.
- [51] Castellino R. A., Delapaz R. L., Larson S. M., "Specialized techniques of cancer management and diagnosis: Imaging techniques in cancers", *Cancer Principales & Practice of Oncology, 4^{ème} édition, Lippincott Co, Philadelphia, 21-2* : 507-530, 1993.
- [52] Chardot C., Bey P., Groupe Médical du Centre Alexis Vautrin., "Protocoles d'investigations et de traitements pour les cancers", *Centre Alexis Vautrin* 1991.
- [53] Chaudhry H. W., Richards-Kortum R., Kolubayev T., Kittrell C., Partovi F., Kramer J. R., Feld M. S., "Alteration of spectral characteristics of human artery wall caused by 476-nm laser irradiation", *Lasers in Surgery and Medicine. 9* : 272-580, 1989.
- [54] Chen W. R., Jassemnejad B., Crull J., Knobee E. T., Nordquist R. E., "Detection and characterization of chemical-induced abnormal tissue and rat tumors at different stages using fluorescence spectroscopy", *Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancer and Other Diseases III : Optical Biopsy, Proc. SPIE 2679* : 55-64, 1996.
- [55] Cordeiro P. G., Kirschner R. E., Hu Q.-Y., Chiao J. J. C., Savage H., Alfano R. R., Hoffman L. A., Hidalgo D. A., "Ultraviolet excitation fluorescence spectroscopy : A noninvasive method for the measurement of redox changes in ischemic myocutaneous flaps", *Plastic and Reconstructive Surgery* 96(3) : 673-680, 1995.

- [56] **Coremans J. M. C. C., Ince C., Bruining H. A., Puppels G. J.**, "The NADH fluorescence : UV reflectance ratio provides a semi-quantitative measure for NADH fluorometry of blood perfused rat heart", *Proc. SPIE 2927* : 180-191, 1996.
- [57] **Cothren R. M., Richards-Kortum R., Sivac M. V., Fitzmaurice M., Rava R. P., Boyce G. A., Doxtader M., Blackman R., Ivanc T. B., Hayes G. B., Feld M. S., Petras R. E.**, "Gastrointestinal tissue diagnosis by laser-induced fluorescence spectroscopy at endoscopy", *Gastrointestinal Endoscopy 36(2)* : 105-111, 1990.
- [58] **Courtot P.**, "Eléments de photochimie avancée", *Hermann*, 1972.
- [59] **Cubeddu R., Taroni P., Valentini G.**, "Use of time-gated fluorescence imaging for diagnosis in biomedicine", *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology 12* : 109-113, 1992.
- [60] **Cubeddu R., Canti G. L., Taroni P., Valentini G.**, "Decay time images of HpD fluorescence for tumor detection in mice", *Optical Biopsies, Proc. SPIE 2627* : 138-144, 1995.
- [61] **Cui W., Ostrander L. E., Lee B. Y.**, "In vivo reflectance of blood and tissue as a function of light wavelength", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering 37(6)* : 632-639, 1990.
- [62] **Cui W., Ostrander L. E.**, "The relationship of surface reflectance measurements to optical properties of layered biological media", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering 39(2)* : 194-201, 1992.
- [63] **Cutruzzola F. W., Stetz M. L., O'Brien K. M., Gindi G. R., Laifer L. I., Garrand T. J., Deckelbaum L. I.**, "Change in laser-induced arterial fluorescence during ablation of atherosclerotic plaque", *Lasers in Surgery and Medicine 9* : 109-116, 1989.
- [64] **Deckelbaum L. I., Stetz M. L., O'Brien K. M., Cutruzzola F. W., Gmitro A. F., Laifer L. I., Gindi G. R.**, "Fluorescence spectroscopy guidance of laser ablation of atherosclerotic plaque", *Lasers in Surgery and Medicine 9* : 205-214, 1989.
- [65] **Demtröder W.**, *Laser spectroscopy: Basic concepts and instrumentation, 2^{ème} édition*, Springer, 1995.
- [66] **Denk W., Strickler J. H., Webb W. W.**, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy", *Science 248* : 73-76, 1990.
- [67] **Diebold S.**, "Contribution à la définition d'une dosimétrie laser en thérapie photodynamique anticancéreuse", *Thèse de doctorat en Génie Electrique de L'INPL*, 1990.

- [68] **Diller M.-L.**, "Détection, traitement du signal et modélisation de l'image de fluorescence in vitro et sur tissus biologiques : Application au diagnostic des tumeurs cancéreuses par thérapie photodynamique, métrologie associée", *Thèse de Doctorat en automatique et traitement du signal de L'INPL*, 1994.
- [69] **Docchio F.**, "Ocular fluorometry : Principles, fluorophores, instrumentation, and clinical applications", *Lasers in Surgery and Medicine* 9 : 515-523, 1989.
- [70] **Ebert B., Nolte D., Rinneberg H. H., Moesta K., Nowak Ch., Schlag P. M.**, "Characteristic porphyrin-like autofluorescence in primary colon tumors and lymph nodes", *Optical Biopsies, Proc. SPIE 2627* : 57-67, 1995.
- [71] **Ettori D., Avrillier S., Anidjar M., Cussenot O., Le Duc A.**, "Clinical laser-induced autofluorescence diagnosis of bladder tumors : dependence on the excitation wavelength", *Optical Biopsies, Proc. SPIE 2627* : 25-32, 1995.
- [72] **Ettori D.**, "Spectroscopie d'autofluorescence induite par laser appliquée à la détection précoce des tumeurs", *Thèse de Doctorat en physique de l'Université Paris-Nord*, 1996.
- [73] **Falcoz-Vigne V.**, "Définition d'un principe de détection de fluorescence induite appliqué au diagnostic en cancérologie", *Thèse de Doctorat en Génie Electrique de l'INPL*, 1992.
- [74] **Fisher A. M. R., Murphree A. L., Gomer C. J.**, "Clinical and preclinical photodynamic therapy", *Lasers in Surgery and Medicine* 17 : 2-31, 1995.
- [75] **Fiarman G. S., Nathanson M. H., West A. B., Deckelbaum L. I., Kelly L., Kapadia C. R.**, "Differences in laser-induced autofluorescence between adenomatous and hyperplastic polyps and normal colonic mucosa by confocal microscopy", *Digestive Diseases and Sciences* 6 : 1261-1268, 1995.
- [76] **Flock S. T., Patterson M. S., Wilson B. C., Wyman D. R.**, "Monte Carlo modeling of light propagation in highly scattering tissues-I: Model predictions and comparison with diffusion theory", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 36(12) : 1162-1168, 1989.
- [77] **Flock S. T., Wilson B. C., Patterson M. S.**, "Monte Carlo modeling of light propagation in highly scattering tissues-II: Comparison with measurement in phantoms", *IEEE Transactions Biomedical Engineering* 36(12) : 1169-1173, 1989.
- [78] **Folli S., Westermann P., Braiochtt D., Pèlerin A., Wagnieres G., van den Bergh. H., Mach J.-P.**, "Antibody-indocyanin conjugates for immunophotodetection of human squamous cell carcinoma in nude mice", *Cancer Research* 54 : 2643-2649, 1994.

- [79] **Forrer M., Glanzmann T., Mizeret J., Braichotte D., Wagnières G., van den Bergh H., Leisinger H. J.**, "Fluorescence excitation and emission spectra of ALA-induced protoporphyrin IX in normal and tumoral tissue of the human bladder", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE 2324* : 84-88, 1995.
- [80] **Forrer M., Glanzmann T., Braichotte D., Wagnières G., van den Bergh H., Savary J.-F., Monnier Ph.**, "In-vivo measurement of fluorescence bleaching of meso-tetra hydroxy phenyl chlorin (mTHPC) in the esophagus and the oral cavity", *Optical Biopsies, Proc. SPIE 2627* : 33-39, 1995.
- [81] **Forrer M., Mizeret J., Braichotte D., Wagnières G., Savary J. F., Monnier Ph., Jichlinski P., Leisinger H. J., van den Bergh H.**, "Fluorescence imaging photodetection of early cancer in the bronchi with mTHPC and in the bladder with ALA-induced protoporphyrin IX : Preliminary clinical results", *SPIE 2371* : 109-114, 1995.
- [82] **Forrer M., Wagnières G., Folli S., Jichlinski P., Leisinger H. J.**, "Diagnostic par Fluorescence ", *Cours du DIUE : Lasers Médicaux*, 1995.
- [83] **Françon M.**, "L'optique moderne et ses développements depuis l'apparition du laser", *Hachette*, 1992.
- [84] **Ganesan S., Masilamani V., Nambi J. U., Nambi G., Koteeswaran D.**, "Autofluorescence from tissue as a marker for carcinoma", *Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancer and Other Diseases III : Optical Biopsy, Proc.SPIE 2679* : 190-194, 1996.
- [85] **Garrand T. J., Stetz M. L., O'Brien K. M., Gindi G. R., Sumpio B. E., Deckelbaum L. I.**, "Design and evaluation of a fiberoptic fluorescence guided laser recanalization system", *Lasers in Surgery and Medicine 11* : 106-116, 1991.
- [86] **Geacintov N. E.**, "Principles and applications of fluorescence techniques in biophysical chemistry", *Photochemistry and Photobiology 45(4)* : 547-553, 1986.
- [87] **Gindi G. R., Darken C. J., O'Brien K. M., Stetz M. L., Deckelbaum L. I.**, Neural network and convontional classifiers for fluorescence-guided laser angioplasty, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering 38(3)* : 246-252, 1991.
- [88] **Girardeau-Montaut (Coordinateurs Girardeau-Montaut et J.-P., Lambert R.)**, "Les lasers et leurs applications médicales", *Editions Médicales Internationales, Paris, s I, II & III* : 1-135, 1987.
- [89] **Giron J., Joffre F.**, Bases physiques et évolution de l'imagerie radiologique, *Masson*, 1993.
- [90] **Giron J. , Sénac J.-P., Joffre F.**, Cahiers du manipulateur en imagerie médicale, tom I : Le thorax, *Simep*, 1992.

- [91] Glanzmann T., Theumann J.-F., Braichotte D., Forrer M., Wagnières G., van den Bergh H., Andrejevic S., Savary J.-F., Monnier P., "Pharmacokinetics of meso-(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) studied by fluorescence spectroscopy on early cancer of the cheek pouch mucosa of Golden Syrian hamsters", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE 2324* : 89-96, 1995.
- [92] Glasgold R., Glasgold M., Savage H., Pinto J., Alfano R., Schantz S., "Tissue autofluorescence as an intermediate endpoint in NMBA-induced esophageal carcinogenesis", *Cancer Letters 82* : 33-41, 1994.
- [93] Glassman W. S., Liu C. H., Tang G. C., Lubicz S., Alfano R. R., "Ultraviolet excited fluorescence spectra from non-malignant and malignant tissues of the gynecological tract", *Laser in the Life Sciences 5(1-2)* : 49-58, 1992.
- [94] Gomer C. J., "Preclinical examination of first and second generation photosensitisers used in photodynamic therapy", *Photochemistry and Photobiology 54(6)* : 1093-1107, 1991.
- [95] Grossweiner L., Karagiannes J., Johnson P., Zhang Z., "Gaussian beam spread in biological tissues", *Applied Optics 29(3)* : 379-383, 1990.
- [96] Guillemin F., A'amar O., Rezzoug H., Lignon D., Jaffry F., Abdounour C., Müller L., Yvroud E., Merlin J.-L., Granjon Y., Bolotina-Bezdetnaya L., Zeghari N., Khemis K., Barberi-Heyob M., Meunier-Reynes A., Potapenko A., Notter D., Vigneron C., "Optical instrumentation suitable for a real time dosimetry during Photodynamic therapy", *Optical Biopsies, Proc. SPIE 2627* : 92-99, 1995.
- [97] Guillemin F., "Applications Médicales des lasers", *Récents progrès en Génie de Procédés, 10(46)* : 107-117, 1996.
- [98] Halley P., "Les systèmes à fibres optiques", *Eyrolles, 1985*.
- [99] Harris D.M., Wekhaven J., "Endogenous porphyrin fluorescence in tumors", *Lasers in Surgery and Medicine 7* : 467-472, 1987.
- [100] Henderson B. W., Dougherty T. J., "How does photodynamic therapy work ? ", *Photochemistry and Photobiology 55(1)* : 145-157, 1992.
- [101] Höhne W., Schramm W., Nittka M., Kronfeldt H.-D., "Characterization of endogenous fluorophores by picosecond laser fluorescence spectroscopy", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE 2324* : 300-306, 1995.
- [102] Hoyt C. C., Richards-Kortum R. R., Costello B., Sacks B. A., Kittrell C., Ratliff N. B., Kramer J. R., Feld M. S., "Remote biomedical spectroscopic imaging of human artery wall", *Lasers in Surgery and Medicine 8* : 1-9, 1988.

- [103] **Hsiang Y., Stonefield M., Bower R. D., Fragoso M., Tsang V., Crespo T., M., Lundkvist A.**, "Assessing photofrin uptake in atherosclerosis with a fluorescent probe: Comparison with photography and tissue measurements", *Lasers in Surgery and Medicine* 13 : 271-278, 1993.
- [104] **Hung J., Lam S., LeRiche J.-C., Palcic B.**, "Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue", *Lasers in Surgery and Medicine*, 11 : 99-105, 1991.
- [105] **Huet S., Jolivet E., Messéan A.**, "La régression non-linéaire : méthodes et application en biologie", *INRA*, 1992.
- [106] **Jacques S. L.**, "Time-resolved reflectance spectroscopy in turbid tissues", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 36(12) : 1155-1161, 1989.
- [107] **Jacques S. L.**, "Simple optical theory for light dosimetry during PDT. ", *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection*, *SPIE* 1645 : 155-165, 1992.
- [108] **Jacques S. L., Joseph R., Gofstein G.**, "How photobleaching affects dosimetry and fluorescence monitoring of PDT in turbid media", *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection*, *Proc. SPIE* 1881 : 168-179, 1993.
- [109] **Janssen F. J.**, "A study of the absorption and scattering factors of light in whole blood", *Medical & Biological Engineering* 10 : 231-240, 1972.
- [110] **Jichlinski P., Forrer M., Mizeret J., Braichotte D., Wagnières G., Zimmer G., Guillou L., Schmidlin F., Graber P., van den Bergh H., Leisinger H.-J.**, "Usefulness of fluorescence photodetection of neoplastic urothelial foci in bladder cancer following intravesical instillation of delta-aminolevulinic acid (5-ALA) ", *SPIE* 2671 (reprint) 1996.
- [111] **Kapadia.C. R., Cutruzzola F. W., O'Brien K. M., Stetz M. L., Enriquez R., Deckelbaum L. I.**, "Laser-induced fluorescence spectroscopy of human colonic mucosa", *Gastroenterology* 99 : 150-157, 1990.
- [112] **Kato H., Coretese D. A.**, "Early detection of lung cancer by means of hematoporphyrin derivative fluorescence and laser photoradiation", *Clinics in Chest Medicine* 6(2) : 237-253, 1985.
- [113] **Kato H., Imaizumi T., Aizawa K., Iwabuchi H., Yamamoto H., Ikeda N., Tsuchida T., Tamachi Y., Ito T., Hayata Y.**, "Photodynamic diagnosis in respiratory tract malignancy using an excimer dye laser system", *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology* 6 : 189-196, 1990.
- [114] **Katz A., Ganesan S., Yang Y., Tang G. C., Budansky Y., Celmer E. J., Savage H. E., Schantz S. P., Alfano R. R.**, "Optical biopsy fiber-based fluorescence spectroscopy instrumentation", *Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancer and Other Diseases III : Optical Biopsy*, *Proc. SPIE* 2679 : 118-123, 1996.

- [115] **Kessel D.**, "Use of fluorescent probes for characterizing sites of photodamage", *The Spectrum* 6(2) : 3-6, 1993.
- [116] **Keijzer M. , Richards-Kortum R. R., Jacques L. S., Feld M. S.**, "Fluorescence spectroscopy of turbid media: Autofluorescence of the human aorta", *Applied Optics* 28(20) : 4286-4292, 1989.
- [117] **Kinsey H., Cortese D. A.**, "Scopic system for simultaneous visual nation and electronic detection of fluorescence", *Rev. Sci. Instrum.* 51(10) : 1403-1406, 1980.
- [118] **Kohl M., Neukammer J., Sukowski U., Rinneberg H., Wöhrle D., Sinn H.-J., Friedrich E. A.**, "Delayed observation of laser-induced fluorescence for imaging of tumors", *Applied Physics B* 56 : 131-138, 1993.
- [119] **Kohl M., Sukowski U., Ebert B., Neukammer J., Rinneberg H., Nowak Ch.**, "Imaging of superficially growing tumors by delayed observation of laser-induced fluorescence", *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection, SPIE* 1881 : 206, 1993.
- [120] **Kolli V. R., Shaha A. R., Savage H. E., Sacks P. G., Casale M. A., Schantz S. P.**, "Native cellular fluorescence can identify changes in epithelial thickness in-vivo in the upper aerodigestive tract", *The American Journal of Surgery* 170 : 495-498, 1995.
- [121] **König K., Meyer H., Schneckenburger H., Rück A.**, "The Study of endogenous porphyrins in human skin and their potential for photodynamic therapy by laser induced fluorescence spectroscopy", *Lasers in Medical Science* 8 : 127-132, 1993.
- [122] **König K., Schneckenburger H., Rück A., Steiner R.**, "In vivo photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrins", *Journal of Photochemistry and Photobiology* 18 : 287-290, 1993.
- [123] **Kozlov V. K., Krasilnikov D. M., Turkin V. V.**, "Laser fluorescence diagnostics", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE* 2324 : 269-275, 1995.
- [124] **Krug A., Kessler M., Höper J., Batz M., Otto A., Zellner S., Gärtner**, "Simultaneous monitoring of NAD(P)H, cytochromes, pO₂, and HbO₂ in liver tissue", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE* 2324 : 155-165, 1995.
- [125] **Kubelka P.**, "New contributions to the optics of intensely light-scattering materials, Part I", *Journal of the Optical Society of America* 38(5) : 448-457, 1948.
- [126] **Kubelka P.**, "New contributions to the optics of intensely light-scattering materials. Part II : Nonhomogeneous layers", *Journal of the Optical Society of America* 44(4) : 330-335, 1954.

- [127] Kurtz R. C., Lightdale C. J., Cinsberg R. J., "Specialized techniques of cancer management and diagnosis: Endoscopy", *Cancer Principales & Practice of Oncology*, 4^{ème} édition, Lippincott Co, Philadelphia, 21-1 : 507-530, 1993.
- [128] Lakowicz J. R., Gryczynski I., "Frequency-domain spectroscopy instrumentation and applications", *Arabian Journal for Science and Engineering* 17(2B) : 261-286, 1992.
- [129] Lam S., MacAulay C., LeRiche C. J., Qu J., Krosi G., Zeng H., Korbelik M., Palcic B., "Fluorescence imaging of pre-malignant and malignant tissues with and without photosensitizers", *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection, Proc. SPIE 1881* : 160-167, 1993.
- [130] Lam S., MacAulay C., LeRiche J., Ikeda N., Palcic B., "Fluorescence imaging of early lung cancer", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE 2324* : 2-8, 1994.
- [131] Langevin F., Durand-Gasselien F., "L'imagerie par résonance magnétique", *Technologie et Santé*, 16 : 26-35, 1994.
- [132] Laufer G., Wollenek G., Rüeckle B., Buchelt M., Kuckla C., Ruatti H., Buxbaum P., Fasol R., Zilla P., "Characteristics of 308 nm excimer laser activated tissue photoemission under ablative and non-ablative conditions", *Lasers in Surgery and Medicine* 9 : 556-571, 1989.
- [133] Linkov K. G., Loschenov V. B., Kiselev G. L., Edinak N. E., Steiner R., "Determination of photosensitizer concentration in normal skin tissue and in tumour with the use of two-wavelength laser light", *SPIE 2625* : 519-526, 1996.
- [134] Lipson D., Loebel N. G., Mcleaster K. D., Liu B., "Multifiber, multiwavelength, fiber optic fluorescence spectrophotometer", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 39(9) : 886-892, 1992.
- [135] Loh C. S., MacRobert A. J., Bedwell J., Regula J., Krasner N., Bown S. G., "Oral versus intravenous administration of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy", *British Journal of Cancer* 68 : 41-51, 1993.
- [136] Lohmann W., Dreyer T., Nilles M., Bohle R. M., Schill W.-B., Glanz H., Fryen A., G. Horn B. Pollich, "Tissue diagnosis by means of endogenous fluorophores", *SPIE: Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging 2324* : 64-75, 1994.
- [137] Lohmann W., Mußmann J., Lohmann C., Künzel W., "Native fluorescence of the cervix uteri as a marker for dysplasia and invasive carcinoma", *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 31 : 249-253, 1989.
- [138] Loschenov V. B., Baryshev M. V., Kuzin M. I., Zavodnov V. Ya., Uspensky L. V., Ablitsov U. A., Loginov L. E., Rybin V. K., "Spectral autofluorescent diagnostics of stomach and lungs cancer", *Proc. SPIE 1641* : 177-192, 1992.

- [139] **Ma L. W., Moan J., Berg K.**, "Comparison of the photobleaching effect of three photosensitizing agents : Meso-tetra (*m*-hydroxyphenyl) chlorin, meso-tetra (*m*-hydroxyphenyl) porphyrin and photofrin during photodynamic therapy", *Lasers in Medical Science* 9 : 127-132, 1994.
- [140] **Ma L. W., Moan J., Berg K.**, "Evaluation of a new photosensitiser, meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin, for use in photodynamic therapy : A comparison of its photobiological properties with those of two other photosensitisers", *International Journal of Cancer* 57 : 883-888, 1994.
- [141] **Mahdevan A., Mitchell M. F., Silva E., Thomsen S., Richrds-Kortum R. R.**, "Study of the fluorescence properties of normal and neoplastic human cervical tissue", *Lasers in Surgery and Medicine* 13 : 647-655, 1993.
- [142] **Manyak M. J., Russo A., Smith P. D., Glatstein E.**, "Photodynamic therapy", *Journal of Clinical Oncology* 6(2) : 380-391, 1988.
- [143] **Marchesini R., Brambilla M., Pignoli E.**, "Light-induced fluorescence spectroscopy of adenomas, adenocarcinomas and non-neoplastic mucosa in human colon, I. *In vitro* measurements", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 14 : 219-230, 1992.
- [144] **Marchesini R., Fumagalli S., Pignoli E., Sichirollo A. E., Tomatis S., Di Palma S., Dal Fante M., Spinelli P., Croce A. C., Bottiroli G. F.**, "Light-induced fluorescence of human colon tissue : dependence on histological and histochemical properties studied by means of a simplified model for simulation", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE* 2324 : 76-83, 1995.
- [145] **Martin G. R., Jain R. K.**, "Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy", *Cancer Research* 54 : 5670-5674, 1994.
- [146] **Martin A., Tope W. D., Grevelink J. M., Starr J. C., Fewkes J. L., Flotte T. J., Deutsch T. F., Anderson R. R.**, "Lack of selectivity of photoporphyrin IX fluorescence for basal cell carcinoma after topical application of 5-aminolevulinic acid : implications for photodynamic treatment", *Arch. Dermatol. Res.* 287 : 665-674, 1995.
- [147] **Melnik I. S., Dets S. M., Denisov N. A., Ovcharuk A. M., Joffe A. Yu.**, "Spatial distribution of tissue fluorescence", *Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancer and Other Diseases III : Optical Biopsy, Proc. SPIE* 2679 : 176-180, 1996.
- [148] **Meunier A.**, "La thérapie photodynamique : Réflexion à partir de la littérature et de l'expérience clinique de l'unité de recherche en Thérapie photodynamique (Centre Alexis Vautrin ; CRAN-CNRS, Nancy), *Thèse de Doctorat en Médecine de L'Université Nancy I*, 1992.

- [149] Mizeret J., Wagnières G., Studzinski A., Shangguan C., van den Bergh H., "Endoscopic tissue fluorescence life-time imaging by frequency domain light induced fluorescence", *Optical Biopsies, Proc. SPIE 2627* : 40-47, 1995.
- [150] Monnier Ph., Fontolliet Ch., Wagnières G., Braichotte D., van den Bergh H., "Photo détection et photothérapie des carcinomes épidermoïdes précoces du pharynx, de l'oesophage et des bronches", *Revue Française de Gastro-Entérologie XXVII(277)* : 103-112, 1992.
- [151] Mordon S., Devoisselle J. M., Soulié S., "Fluorescence spectroscopy of pH in vivo using a dual-emission fluorophore (C-SNAFL-1)", *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology 28* : 19-23, 1995.
- [152] Morlet L., Vonarx-Coinsmann V., Lenz P., Foulter M.-T., Brito L. X. de, Stewart C., Thierry P., "Correlation between *meta*(tetrhydroxyphenyl)chlorin (*m*-THPC) biodistribution and photodynamic effects in mice", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 28* : 25-63, 1995.
- [153] Mourant J. R., Hielschner A. H., Bigio I. J., "Monte Carlo simulations incorporating Mie calculations of light transport in tissue phantoms : examination of photon sampling volumes for endoscopically compatible fiber optic probes", *Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancer and Other Diseases III : Optical Biopsy, Proc.SPIE 2679* : 124-130, 1996.
- [154] Muller L., "Modélisation et traitement du signal lumineuse dans les tissus vivants appliquées à la détection de bas niveaux de saturation en oxygène. Contribution à l'optimisation de la dosimétrie en thérapie photodynamique anticancéreuse", *Thèse de doctorat en Automatique et Traitement du signal de l'INPL*, 1994.
- [155] Niay P., Bernace P., (Coordinateur Chavoïn J.-P.), "Etude des principes de la transmission des radiations lasers", *Encyclopédie des Lasers en médecine et en chirurgie, Bases physiques et principes fondamentaux, PICCIN, Italie, I.3* : 47-112, 1995.
- [156] Neev J., Liaw L.-H. L., Raney D. V., Fujishige J. T., Ho P. D., Berns M. W., "Selectivity, efficiency, and surface characteristics of hard dental tissues ablated with ArF pulsed excimer laser", *Lasers in Surgery and Medicine 11* : 499-510, 1991.
- [157] Nilsson A. M. K., Holstein C. S. von, Andersson-Engels S., Willén R., Walther B., Svanberg K., "Clinical detection studies of Barrett's metaplasia and oesophageal adenocarcinoma by means of laser-induced fluorescence", *Optical Biopsies, Proc. SPIE 2627* : 49-56, 1995.
- [158] O'Brien K. M., Gmitro A. F., Gindi G. R., Stetz M. L., Cutruzzola F. W., Laifer L. I., Deckelbaum L. I., "Development and evaluation of spectral classification algorithms for fluorescence guided laser angioplasty", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering 36(4)* : 420-430, 1989.

- [159] Okunaka T., Kato H., Aizawa K., Ohtani T., Kawabe H., Asahara T., Nakajima H., Yamasawa I., Ibukiyama C., O'Hata S., Hayata Y., "Hematoporphyrin derivative uptake by atheroma in atherosclerotic rabbits : The spectra of fluorescence from hematoporphyrin derivative demonstrated by an excimer dye laser", *Photochemistry and Photobiology* 46(5) : 769-775, 1987.
- [160] Oraevsky A. A., Jacques S. L., G. H. Pettit, Saidi I. S., Tittel F. K., Henry P. D., "XeCl laser ablation of atherosclerotic aorta: Optical properties and energy pathways", *Lasers in Surgery and Medicine*, 12 : 585-597, 1992.
- [161] Panjehpour M., Sneed R. E., Frazier D. L., Barnhill M. A., O'Brien S. F., Harb B., Overholt B. F., "Laser-induced fluorescence quantitation of chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate concentration in rat tissue", *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection, SPIE 1645* : 171-179, 1992.
- [162] Panjehpour M., Sneed R. E., Frazier D. L., Barnhill M. A., O'Brien S. F., Harb W., Overholt B. F., "Quantification of phthalocyanine concentration in rat tissue using laser-induced fluorescence spectroscopy", *Lasers in Surgery and Medicine* 13 : 23-30, 1993.
- [163] Panjehpour M., Overholt B. F., Vo-Dinh T., Farris C., Schmidhammer J. L., Sneed R. E., Buckley P. F., "Fluorescence spectroscopy for diagnosis of esophageal cancer", *Proc. SPIE 2133* : 185-191, 1994.
- [164] Panjehpour M., Overholt B. F., Schmidhammer J. L., Farris C., Buckley P. F., Vo-Dinh T., "Spectroscopic diagnosis of esophageal cancer new classification model, improved measurement system", *Gastrointestinal Endoscopy*, 41(6) : 577-581, 1995.
- [165] Panjehpour M., Overholt B. F., Vo-Dinh T., Edwards D. M., Buckley F. P., Decosta J. F., Haggitt R. C., "Laser-induced fluorescence detection of dysplasia in Barrett's esophagus", *Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancer and Other Diseases III : Optical Biopsy, Proc. SPIE 2679* : 16-25, 1996.
- [166] Panjehpour M., Overholt B. F., Vo-Dinh T., Haggitt R. C., Edwards D. H., Buckley F. P., "Endoscopic fluorescence detection of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus", *Gastroenterology* 111(1) : 93-101, 1996.
- [167] Panou-Diamandi O., Uzunoglu N. K., Koutsouris D., "Tissue fluorescence based on electromagnetic inelastic scattering theory", *Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancer and Other Diseases III : Optical Biopsy, Proc. SPIE 2679* : 71-78, 1996.
- [168] Papazoglou T. G., Liu W. Q., Manolopoulos A., "Influence of medium's optical properties on laser induced fluorescence measurements : experimental study on solutions and a gel model of biological significance", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE 2324* : 322-328, 1995.
- [169] Patrice T., "Photochimothérapie des cancers ", *Cours du DIUE : Lasers Médicaux*, 1995.

- [170] **Periasamy A., Herman B.**, "Computerized fluorescence microscopic vision in the biomedical sciences", *Journal of Computer-Assisted Microscopy* 6(1) : 1-26, 1994.
- [171] **Perk M., Flynn G. J., Smith C., Bathgate B., Tulip J., Yue W., Lucas A.**, "Laser induced fluorescence emission : I. The identification of fibrotic endocardium and myocardium", *Lasers in Surgery and Medicine* 11 : 523-534, 1991.
- [172] **Pfeifer L., Schmalzigaug K., Paul R., Lichey J., Kemnitz K., Fink F.**, "Time-resolved autofluorescence measurements for the differentiation of lung tissue states", *Optical Biopsies, Proc. SPIE* 2627 : 129-135, 1995.
- [173] **Policard A.**, "Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood", *C.R. Soc. Biol.*, 91 : 1423-1424, 1924.
- [174] **Press W. H., B. P. Flannery, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling**, "Numerical Recipes: The art of scientific computing", *Cambridge University Press*, 1986.
- [175] **Profio A. E.**, "Review of fluorescence diagnosis using porphyrins", *Laser Surgery : Characterization and Therapeutics, SPIE* 907 : 150-156, 1988.
- [176] **Profio A. E.**, "Fluorescence diagnosis and dosimetry using porphyrins", *Photodynamic Therapy of Neoplastic Disease, CRC, vol.1, ch. 5* : 77-89, 1990.
- [177] **Profio A. E., Shusen X., Shu K.-H.**, "Diagnosis of tumors by fluorescence: quantification of photosensitizer concentration", *Photodynamic therapie mechanisms II, Proc. SPIE* 1203 : 12-18, 1990.
- [178] **Putten M. van der, Gemert M. J. C. van**, *Physics, Medicin and Biology.*, 28(6) : 639-645, 1982.
- [179] **Qu J., MacAulay C., Lam S., Palcic B.**, "Laser-induced fluorescence spectroscopy at endoscopy", *Proc. SPIE* 2133 : 162-169, 1994.
- [180] **Qu J., MacAulay C., Lam S., Palcic B.**, "Laser-induced fluorescence spectroscopy at endoscopy :tissue optics, Monte Carlo modeling,and in vivo measurements", *Optical Engineering* 34(11) : 3334-3343, 1995.
- [181] **Ramanujam N., Mitchell M. F., Mahadevan A., Warren S., Thomsen S., Silva E., Richards-Kortum R.**, "*In vivo* diagnosis of cervical interaepithelial neoplasia using 337 nm excited laser-induced fluorescence", *Proc. National Academy of Science, USA* 91 : 10193-10197, 1994.
- [182] **Rava P. R., Richards-Kortum R., Fitzmaurice M., Cothren R., Petras R., Sivak M., Levin H., Feld M. S.**, "Early detection of dysplasia in colon and bladder tissue laser induced fluorescence", *Optical Methods for Tumor Treatment and Early Diagnosis: Mechanisms and Tachniques Proc. SPIE* 1426 : 68-78, (1991).
- [183] **Reichman J.**, "Determination of absorption and scattering coefficients for nonhomogeneous media.1: Theory", *Applied Optics* 12(8) : 1811-1815, 1973.

- [184] Reynolds L., Johnson C., Ishimaru A., "Diffuse reflectance from a finite blood medium: applications to the modeling of fiber optic catheters", *Applied Optics* 15(9) : 2059-2067, 1976.
- [185] Rezzoug H., A'amar O., Barberi-Heyob M., MERLIN J.-L., Guillemin F., "In vivo photodynamic therapy with meso-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) : influence of light intensity and optimization of photodynamic efficiency", *Photochemotherapy : Photodynamic Therapy and other II, Proc. SPIE 2924* : 181-186, 1996.
- [186] Rezzoug H., "Activité photodynamique thérapie in vitro et in vivo de la mTHPC : Etude préclinique", *Thèse de Doctorat en Genie-Biologique de l'INPL* 1997.
- [187] Richard A., "Identification des systèmes : Aspects théoriques et pratiques", *Cours de DEA-ATS, INPL, 1994*.
- [188] Richards-Kortum R., Rava R. P., Cothren R., Matha A., Fitzmaurice M., Ratliff N. B., Kramer J. R., Kittrel C., Feld M. S., "A model for extraction of diagnostic information from laser induced fluorescence spectra of human artery wall", *Spectrochimica Acta* 45A(1) : 87-93, 1989.
- [189] Richards-Kortum R., Rava R. P., Petras R. E., Fitzmaurice M., Sivak M., Feld M. S., "Spectroscopic diagnosis of colonic dysplasia", *Photochemistry and Photobiology* 53(6) : 777-786, 1991.
- [190] Richards-Kortum R., Rava R. P., Fitzmaurice M., Kramer J. R., Feld M. S., "476 nm Excited laser-induced fluorescence spectroscopy of human coronary arteries: Applications in cardiology", *American Heart Journal* 122(4 part 1) : 1141-1150, 1991.
- [191] Richards-Kortum R., Rava R. P., Fitzmaurice M., Tong L. L., Ratliff N. B., Kramer J. R., Feld M. S., "A One-layer model of laser-induced fluorescence for diagnosis of disease in human tissue: Applications to atherosclerosis", *IEEE Transactions On Biomedical Engineering* 36(12) : 1222-1232, 1989.
- [192] Ris H.-B., Altermatt H. J., Stewart C. M., Schaffner T., Wang Q., Lim C. K., "Photodynamic therapy with m-tetrahydroxyphenylchlorin *in vivo* : Optimization of the therapeutic index", *International Journal of Cancer* 55 : 245-249, 1993.
- [193] Rogers D. W., Raymond J., Lanzafame R. J., Blackman J., Naim J. O., Herrera H. R., Hinshaw J. R., "Methods for the endoscopic photographic and visual detection of helium cadmium laser-induced fluorescence of photofrin II", *Lasers in Surgery and Medicine* 10 : 45-51, 1990.
- [194] Rokahr I., Andersson-Engels S., Svanberg S., D'Hallewin M.-A., Baert L., Wang I., Svanberg K., "Optical detection of human urinary bladder carcinoma utilizing tissue autofluorescence and protoporphyrin IX induced fluorescence following low-dose ALA instillation", *Optical Biopsies, Proc. SPIE 2627* : 2-12, 1995.

- [195] Römer Tj. J., Fitzmaurice M., Cothren R. M., Richards-Kortum R., Petras R., Sivak M. V., Kramer J. R., "Laser-induced fluorescence of normal colon and dysplasia in colonic adenomas: Implications for spectroscopic diagnosis", *The American Journal of Gastroenterology* 90(1) : 81-87, 1995.
- [196] Rosai J., "Principales of oncologic pathology", *Cancer Principales & Practice of Oncology*, 4^{ème} édition, Lippincott Co, Philadelphia, 13 : 228-234, 1993.
- [197] Royston D. R., Poston R. S., Prahl S. A., "Optical properties of scattering and absorbing materials used in the development of optical phantoms at 1064 nm", *Journal of Biomedical Optics* 1(1) : 110-116, 1996.
- [198] Santus R., "Récents développements en photochimiothérapie anticancéreuse", *Pathologie Biologie* 39(1) : 54-58, 1991.
- [199] Scales, "Introduction to non-linear Optimization", *MacMillan*, 1985.
- [200] Schneckenburger H., Feyh J., Götz A., Frenz M., Brendel W., "Quantitative *in vivo* measurement of the fluorescent components of photofrin II", *Photochemistry and Photobiology* 46(5) : 765-768, 1987.
- [201] Schneckenburger H., König K., Dienersberger T., Hahn R., "Time-gated microscopic imaging and spectroscopy in medical diagnosis and photobiology", *Optical Engineering* 33(8) : 2600-2605, 1994.
- [202] Schneckenburger H., König K., Kunzi-Rapp K., Westphal-Frösch C., Rück A., "Time-resolved *in-vivo* fluorescence of photosensitizing porphyrins", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 21 : 143-147, 1993.
- [203] Schneckenburger H., Gschwend M. H., Paul R.-J., Stepp H., Rick, Betz V., Strauß W. S., "Time-gated spectroscopy of intrinsic fluorophores in cells and tissues", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE* 2324 : 187-196, 1995.
- [204] Scholz T. D., Laughlin M. R., Balaban R. S., Kupriyanov V. V., Heineman R. S., "Effect of substrate on mitochondrial NADH, cytosolic redox state, and phosphorylated compounds in isolated hearts", *American Journal of Physiology* 268 (Heart Circ. Physiol. 37) : H82-H91, 1995.
- [205] Schomacker K. T., Frisoli J. K., Compton Carolyn C., Flotte T. J., Richter J. M., Nishioka N. S., Deutsch T. F., "Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: Basic biology and diagnostic potential, *Lasers in Surgery and Medicine* 12 : 63-78, 1992.
- [206] Schramm W., Höhne W., Stepp H., Leunig A., "Noninvasive NADH measurements for clinical applications", *Proc. SPIE* 2927 : 106-109, 1996.

- [207] **Schuitmaker J. J., Baas P., Leengoed H. L. L. M. van, Meulen F. W. van den, Star W. M., Zandwijk N. van,** "Photodynamic therapy : a promising new modality for the treatment of cancer", *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology* 34 : 3-12, 1996.
- [208] **Smith G. J., Ghigginio K. P., Bennet L. E., Nero T. L.,** "The 'Q-Band' absorption spectra of hematoporphyrin monomer and aggregate in aqueous solution", *Photochemistry and Photobiology* 49(1) : 49-52, 1989.
- [209] **Spectrum,** "Bulletin d'informations techniques, d'innovation et de service", *Oriel* n°4, 1993..
- [210] **Stepp H., Baumgartner R., Beyer W., Rick K., Steinbach P., Stepp H. G., Kriegmair M.,** "Bladder tissue diagnostics utilizing Protoporphyrin IX fluorescence detection", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE* 2324 : 20-31, 1995.
- [211] **Stepp H., Baumgartner R., Beyer W., Knüchel R., Körner T. O., Kriegmair M., Rick K., Steinbach P., Stepp H. G., Hofstetter A. G.,** "Fluorescence imaging and spectroscopy of ALA-induced Protoporphyrin IX preferentially accumulated in tumor tissue", *Optical Biopsies, Proc. SPIE* 2627 : 13-24, 1995.
- [212] **Sterenborg H. J. C. M., Motamedi M., Wagner R. F., Duvic M., Thomsen S. L., Jacques S. L.,** "In vivo fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumours", *Lasers in Medical Science* 9 : 191-201, 1994.
- [213] **Sterenborg H. J. C. M., Thomsen S. L., Jacques S. L., Motamedi M.,** "In vivo autofluorescence of an unpigmented melanoma in mice. Correlation of spectroscopic properties to microscopic structure", *Melanoma Research* 5 : 211-216, 1995.
- [214] **Sterenborg H. J. C. M., Motamedi M., Wagner R. F., Thomsen S. L., Jacques S. L.,** "In vivo fluorescence spectroscopy for the diagnosis of skin diseases", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE* 2324 : 32-38, 1995.
- [215] **Straight R. C., Benner R. E., McClane R. W., Go P. M. N. Y. H., Yoon G., Dixon J. A.,** "Application of charge-coupled device technology for measurement of laser light and fluorescence distribution in tumors for photodynamic therapy", *Photochemistry and Photobiology* 53(6) : 787-796, 1991.
- [216] **Ströbele S., Dressler C., Ismail M., Daskalaki A., Philipp C. M., Berlien H.-P., Weitzel H., Liebsch M., Spielmann H.,** "Optimized fluorescence diagnosis of tumors by comparing five ALA-induced xenofluorescence and autofluorescence intensities of a murine tumor/nontumor tissue system cultivated on the CAM", *Optical Biopsies, Proc. SPIE* 2627 : 129-135, 1995.
- [217] **Szabo K., Lichtenthaler H. K., Kocsanyi L., Richter P.,** A CCD-OMA device for the measurement of complete chlorophyll fluorescence emission spectra of leaves during the fluorescence induction kinetics, *Radiation and Environmental Biophysics* 31 : 153-160, 1992.

- [218] **Tang G. C., Celmer E. J., Alfano R. R.**, "Phosphorescence and fluorescence spectra from breast tissues", *Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancer and Other diseases III : Optical Biopsy, Proc. SPIE 2679* : 71-78, 1996.
- [219] **Tang G. C., Pradhan A., Sha W., Chen J., Liu C. H., Wahl S. J., Alfano R. R.**, "Pulsed and cw laser fluorescence spectra from cancerous, normal and chemically treated normal human breast and lung tissues", *Applied Optics 28(12)* : 2337-2343, 1989.
- [220] **Tang G. C., Pradhan A., Alfano R. R.**, "Spectroscopic differences between human cancer and normal lung and breast tissues", *Lasers in Surgery and Medicine, 9* : 290-295, 1989.
- [221] **Tanke H. J.**, "Does light microscopy have a future?", *Journal of Microscopy 155* : 405-418, 1989.
- [222] **Tisserand E.**, "Modélisation, conception et réalisation d'un capteur thermométrique à fibres optiques", *Thèse de Doctorat en Génie Electrique de l'Université Nancy I*, 1987.
- [223] **Tomassone R., Dervin C., Masson J.-P.**, "Biométrie, modélisation de phénomènes biologiques", *Masson*, 1993.
- [224] **Tsai J.-C., Kao M.-C., Hsiao Y.-Y.**, "Fluorescence study of the rat brain and glioma in vivo", *Lasers in Surgery and Medicine 13* : 321-331, 1993.
- [225] **Ungar S.**, "Fibres optiques, théorie et applications", *Dunod*, 1989.
- [226] **Utts S. R., Sinichkin Yu. P., Pilipenko E. A.**, "Laser fluorescence spectroscopy of human skin in vivo: The effect of erythema", *Optics and Spectroscopy 76(5)* : 864-868, 1994.
- [227] **Utz S. R., Sinichkin Y. P., Meglinski I. V., Pilipenko H. A.**, "Fluorescence spectroscopy in combination with reflectance measurements in human skin examination : what for and how", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE 2324* : 125-136, 1995.
- [228] **Valat P., Reinhart G. D., Jameson D. M.**, "Application of time-resolved fluorometry to the resolution of porphyrin-photoproduct mixtures", *Photochemistry and Photobiology 47(6)* : 787-790, 1988.
- [229] **Valisa P., Sharonov S., Favard C., Herben C., Manfait M., Vigny P., Da Silva E.**, "Comparison and applications to in-vivo biology of two different methods of spectral imaging : confocal scanning full spectrum and global illumination spectral band pass imaging", *Optical Biopsies, Proc. SPIE 2627* : 156-164, 1995.

- [230] Vari S. G., Stavridi M., Papaioannou T., Papazoglou T. G., Pergadia V. R., Fishbein M. C., Wolfson D., Grundfest W. S., "Biodistribution of benzoporphyrin derivative in tumor bearing rate by laser induced fluorescence spectrometry", *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection SPIE 1881* : 195-205, 1993.
- [231] van der Veen N., Bruijn H. S., Berg R. J. W., Star W. M., "Kinetics and localisation of PpIX fluorescence after topical and systemic ALA application, observed in skin and skin tumours of UVB-treated mice", *British Journal of Cancer* 73 : 925-930, 1996.
- [232] van der Breggen E., Rem A., Christian M., Yang C. J., Calhoun K., Sterenberg H., Motamedi M., "Spectroscopic detection of oral and skin tissue transformation in a model for squamous cell carcinoma: Autofluorescence versus systemic aminolevulinic acid-induced fluorescence", *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum electronics* 2(4) : 977-1007, 1996.
- [233] Vo-Dinh T., Panjehpour M., Overholt B. F., Farris C., Buckley III F. B., Sneed R., "In vivo cancer diagnosis of the esophagus using differential normalized fluorescence (DNF) indices", *Lasers in Surgery and Medicine* 16 : 41-47, 1995.
- [234] Vo-Dinh T., Panjehpour M., Overholt B. F., Buckley F. B., Edwards D. M., "Detection of colon malignancy using differential normalized fluorescence", in *Advances in laser and light spectroscopy to diagnose cancer and other diseases III : Optical Biopsy, Proc. SPIE 2679* : 26-33, 1996.
- [235] Wagnières G., Depeursinge Ch., Monnier Ph., Savary M., Cornaz P., Châtelain A., van den Bergh H., "Photodetection of early cancer by laser induced fluorescence of a tumor-selective dye: apparatus design and realization", *Proc. SPIE 1203* : 43-52, 1990.
- [236] Wagnières G., Braichotte D., Châtelain A., Depeursinge Ch., Monnier Ph., Savary M., Fontollet Ch., Calmes J.-M., Givel J.-C., Chapuis G., Folli S., Pèlerin A., Buchegger F., Mach J.-P., van den Bergh H., "Photodetection of early cancer in the upper aerodigestive tract and the bronchi using photofrin II and colorectal adenocarcinoma with fluorescence monoclonal antibodies", *Future Trends in Biomedical Applications of Lasers, Proc. SPIE 1525* : 219-235, 1991.
- [237] Wagnières G., "Photochimiothérapie et photodétection du cancer à l'aide de photosensibilisateurs ou de colorant fluorescents", *Thèse de Doctorat en Physique de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne*, 1992.
- [238] Wagnières G., Mizeret J., Studzinski A., van den Bergh H., "Frequency-domain fluorescence lifetime imaging for endoscopic clinical cancer photodetection : Apparatus design and preliminary", *Journal of fluorescence*, 7(1) : 75-83, 1997.
- [239] Walker S., Straw H., "Spectroscopy, Vol. 2 : Ultra-violet, Visible, Infra-red and Raman Spectroscopy", *Chapman & Hall*, 1962.

- [240] Wang K. K., Gutta K., Laukka M. A., Densemores J., "Laser-induced fluorescence in the detection of esophageal carcinoma", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE 2324* : 14-18, 1995.
- [241] Wang L., Lin S.-P., Jacques S. L., Tittel F. K., Harder J., Jancarik J., Mammini B. M., Small W., Da Silva L. B., Oblique-incidence reflectometry : one relative profile measurement of diffuse reflectance yields two optical parameters, *Optical Biopsies, Proc. SPIE 2627* :165-175, 1995.
- [242] Wilson B., Jeeves W., Lowe D., "In vivo and post mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues", *Photochemistry and Photobiology*, 42(2) : 153-162, 1985.
- [243] Wilson B. C., Muller P. J., Yanch J. C., "Instrumentation and light dosimetry for intra-operative, photodynamic therapy (PDT) of malignant brain tumours", *Physics of Medical Biology* 31(2) : 125-133, 1986.
- [244] Wilson B. C., Patersson M. S., "The physics of photodynamic therapy", *Phys. Med. Biol.* 31(4) : 327-360, 1986.
- [245] Wilson B. C., Patersson M. S., Flock S. T., "Indirect versus direct techniques for the measurement of the optical properties of tissues", *Photochem. Photobiol.* 46(5) : 601-608, 1987.
- [246] Wilson B. C., Jacques S. L., "Optical reflectance and transmittance of tissues: Principles and applications", *IEEE Journal of Quantum Electronics* 26(12) : 2186-2199, 1990.
- [247] Wolfbeis O. S., Leiner M., "Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization", *Analytica Chimica Acta* 167 : 203-215, 1985.
- [248] Wu J., Wang Y., Perelman L., Itzkan I., Dasari R. R., Feld M. S., "Three-dimensional imaging of objects embedded in turbid media with fluorescence and Raman spectroscopy", *Applied Optics* 34(18) : 3425-3430, 1995.
- [249] Yang Y., Katz A., Celmar E. J., Zurawska-Szczepaniak M., Alfano R. R., "Optical spectroscopy of benign and malignant breast tissues ", *Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancer and Other Diseases III : Optical biopsy, Proc. SPIE 2679* : 51-54, 1996.
- [250] Yang Y., Katz A., Ye T., Li F., Ma P., "Characteristic autofluorescence for cancer diagnosis and its origin", *Lasers in Surgery and medicine*, 7 : 528-532, 1987.
- [251] Ye B., Abela G. S., "Carotene enhances plaque detection by fluorescence attenuation in an atherosclerotic rabbit model", *Lasers in Surgery and Medicine* 13 : 393-404, 1993.

- [252] **Zandomeneghi M., Festa C., Angeletti C.A., Menconi G., Sicuro T., Cozzani I.**, "Detection of near-infrared porphyrin fluorescence excited in experimental animal tumours by the HeNe laser", *Lasers in Medical Science* 3 : 99-102, 1988.
- [253] **Zeghari N.**, "Caractérisation et étude de conséquences biologiques du photoblanchiment de l'hématoporphyrine dérivée utilisée en thérapie photodynamique", *Thèse de Doctorat en Pharmacologie de l'Université Nancy I*, 1995.
- [254] **Zeng H., MacAulay C. E., McLean D. I., Palcic B.**, "Spectroscopy and microscopy studies of skin tissue autofluorescence emission", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE 2324* : 198-207, 1995.
- [255] **Zhakova N. N., Kozlov D. N., Polivanov Yu. N., Pykhov R. L., Smirnov V. V.**, "Laser-excited fluorescence spectrometric system for tissue diagnostics", *Proc. SPIE 2328* : 196-201, 1994.
- [256] **Zhadin N., Yang Y., Ganesan S., Ockman N., Alfano R. R.**, "Enhancement of the fluorescence cancer diagnostic method of tissues using diffuse reflectance and the analysis of oxygenation state", *Advances in Laser and Light spectroscopy to Diagnose Cancer and Other Diseases III : Optical Biopsy, Proc. SPIE 2679* : 142-148, 1996.
- [257] **Zonios G. I., Cothren R. M., Arendt J. T., Wu J., Crawford J. M., van Dam J., Manoharan R., Feld M. S.**, "Fluorescence spectroscopy for colon cancer diagnosis", *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Proc. SPIE 2324* : 9-13, 1994.
- [258] **Zonios G. I., Cothren R. M., Arendt J. T., Wu J., van Dam J., Crawford J. M., Manoharan R., Feld M. S.**, "Morphological model of human colon tissue fluorescence", *IEEE Transactions On Biomedical Engineering* 43(2) : 113-121, 1996.

***LISTE DES PUBLICATIONS ET DES
COMMUNICATIONS PERSONNELLES***

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS PERSONNELLES

[1] **O. A'Amar**, H. Rezzoug, M. Barberi-Heyob, L. Bezdetnaya, J-L. Merlin, H. Begorre, F. Guillemin

« Biodistribution of Foscan[®]: correlation between spectrofluorimetry and HPLC, influence of fluence rates », (cette publication sera soumise au Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology), 1997.

[2] H. Rezzoug, L. Bezdetnaya, **O. A'Amar**, M. Barberi-Heyob, J-L. Merlin, F. Guillemin
« Influence of different parameters on photodynamique activity of meta-tetra (m-hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC): *in vitro* and *in vivo* », (accepté dans Lasers in Medical Science), 1997.

[3] **O. A'Amar**, F. Guillemin, H. Begorre, E. Yvroud
« Autofluorescence spectroscopy of normal and pathological tissues of the bladder », *SPIE: Optical Biopsy*, (présentation orale), Vol. 3197, 1997.

[4] **O. A'Amar**, F. Guillemin, H. Begorre, E. Yvroud
« Identification of endogenous fluorophores in normal and pathological tissues by the decomposition of autofluorescence spectra », *World Congress on Biomedical Physics and Biomedical Engineering : Session of Biophysical and Biochemical Measurements*, Nice, France, (présentation orale), 14-19 September 1997.

[5] H. Rezzoug, **O. A'Amar**, M. Barberi-Heyob, J-L. Merlin, L. Bezdetnaya, F. Guillemin
« In vivo pharmacokinetics and photodynamic activity of meta-tetra (m-hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC) in human tumor bearing mice », *7th congress of the European Society for Photobiology*, Stresa, Italy, 8-13 September 1997.

[6] H. Rezzoug, **O. A'Amar**, M. Barberi-Heyob, D. Lignon, J-L. Merlin, F. Guillemin
« Biodistribution de la mTHPC sur modèle tumoral murin », *16ème Forum de cancérologie*, Paris, 17-19 Juin 1996, *Bull Cancer*, 83(6), 429, 1996.

[7] J.-J. Padilla-Ybarra, G. Bourg-Heckly, **O. A'Amar**, J. Blais, J. Etienne, F. Guillemin
« UV-induced autofluorescence spectroscopy in Barrett's esophagus », *SPIE: Optical Biopsy*, (accepté), Vol. 3197, 1997.

[8] **O. A'Amar**, D. Lignon, H. Begorre, F. Guillemin, E. Yvroud
« Gaussian Analyzing Model of Tissue Light-Induced Fluorescence for the Detection of Early Cancers », *SPIE: Optical Tomography and Spectroscopy of Tissue: Theory, Instrumentation, Model, and Human Studies II*, Vol. 2979, pp. 574-584, 1997.

[9] E. Bossu, **O. A'Amar**, D. Notter, P. Labrude, C. Vigneron, F. Guillemin.
« Determination of the maximal tumor/normal skin ratio after HpD or m-THPC administration in hairless mouse (Skh-1) by fluorescence spectroscopy, a non invasive method », *Anti-Cancer Drugs*, 8:67-72, 1997.

- [10] **O. A'Amar**, D. Lignon, H. Begorre, F. Guillemain, E. Yvroud
« Light Induced Fluorescence Spectroscopy: A Clinical Instrumentation For Tissue Characterization », *The Annual IAR Conference, Karlsruhe, Germany, 21-22 (à paraître), November 1996.*
- [11] H. Rezzoug, M. Barberi-Heyob, **O. A'Amar**, J-L. Merlin, F. Guillemain
« Pharmacocinétique intratumorale de la mTHPC : Optimisation du traitement Photodynamique », *6ème Journée du G.P.C.O., Ajaccio, Corse, 3-4 Octobre 1996.*
- [12] H. Rezzoug, **O. A'Amar**, M. Barberi-Heyob, J-L. Merlin, F. Guillemain
« In vivo photodynamic therapy with meso-tetra (m-Hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC): Optimization of photodynamic efficiency evaluation », *SPIE: Photochemotherapy: PDT and other Modalities, Vol. 2924, pp. 181-186, 1996.*
- [13] **O. A'Amar**, D. Lignon, O. Ménard, H. Begorre, F. Guillemain, E. Yvroud
« Ex vivo and in vivo autofluorescence spectroscopy measurements in normal and malignant tissues of the upper and lower respiratory tract », *The European Respiratory Journal, ERS annual Congress, Stockholm, Sweden, Vol. 9, Supplement 23, 7-11 September 1996, p.375s.*
- [14] F. Guillemain, **O. A'Amar**, H. Rezzoug, D. Lignon
« In vivo light induced fluorescence spectroscopy: kinetics of meso-tetra (m-Hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC) in normal and tumor mice tissues », *The Sixth Biennial Meeting Of The International Photodynamic Association, Melbourne, Australia, 10-14 March 1996, p. 3.*
- [15] **O. A'Amar**, D. Lignon, O. Ménard, H. Begorre, F. Guillemain, E. Yvroud
« Autofluorescence spectroscopy of normal and malignant tissues: both in vivo and ex-vivo measurements in the upper aero-digestive tract and lung tissues », *SPIE: Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancers and Other Diseases III: Optical Biopsy, Vol. 2679, pp. 42-50, 1996.*
- [16] **O. A'AMAR**
« Spectroscopie de fluorescence tissulaire induite par laser in vivo : Caractérisation des tissus pathologiques ; Cinétiques de photosensibilisants », *Prix Jeune Chercheur au Xve congrès de la Société Française des Lasers Médicaux (SFLM), Résumés, p. 30, ARCS 1800, 15-19 Janvier 1996.*
- [17] F. Guillemain, **O. A'Amar**, H. Rezzoug et al.
« Optical instrumentation suitable for a real time dosimetry during Photodynamic therapy », *SPIE: Optical methods for Tumor Treatment and Detection, Vol. 2627, pp. 92-99, 1995.*
- [18] D. Lignon, **O. A'Amar**, K. Khemis, F. Guillemain et al.
« Détection précoce des tumeurs cancéreuses par imagerie et spectres de la fluorescence endogène », *OPT-DIAG 95, premier Colloque National, Paris, Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine, p. 12, 18 et 19 Mai 1995.*

[19] F. Jaffry, **O. A'Amar**, D. Lignon, F. Guillemain et al.
« Dosimétrie en thérapie photodynamique, Paramètres optiques : Concentration du photosensibilisant, Coefficient global d'atténuation lumineuse, Pression partielle d'oxygène », *OPT-DIAG 95, premier Colloque National, Paris, Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine*, p. 27, 18 et 19 Mai 1995.

[20] **O. A'Amar**, K. Khemis, D. Lignon, O. Ménard, F. Guillemain
« Détection précoce des tumeurs cancéreuses par spectroscopie de la fluorescence des tissus », Poster et stand de manipulation, *Journée Electromagnétisme et Santé*, Faculté de Médecine de Nancy, GRITT et GBM, 6/04/1995.

TITRE HONORIFIQUE

Prix Jeune Chercheur de la Société Française des Lasers Médicaux (SFLM), Janvier 1996.

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Diagramme de Jablonsky, 1: absorption $S_0 - S_2$; 2: absorption $S_0 - S_1$; 3: fluorescence ; 4: phosphorescence ; 5: absorption triplet - triplet ($T_1 - T_2$). CI: Conversion interne, CIS: Conversion inter-système.	34
Figure 2	Principe de la photodétection des lésions tumorales par fluorescence induite. 1-Injection du fluorophore ; 2-Répartition du fluorophore dans l'organisme ; 3-Rétention préférentielle dans les tissus pathologiques, essentiellement cancéreux ; 4-Excitation lumineuse résonante et détection de fluorescence. T: tumeur, Ts: tissu sain.	38
Figure 3	Schéma de principe de la détection de fluorescence.	44
Figure 4	Principe de la photodétection à filtrage temporel.	53
Figure 5	Schéma d'un microspectromètre de fluorescence.	55
Figure 6	Présentation simplifiée d'un interféromètre de Sagnac.	60
Figure 7	Diagramme des niveaux d'énergie de la diffusion Raman. L'énergie E_2 peut être rotationnelle, vibrationnelle ou rotationnelle-vibrationnelle.	70
Figure 8	Principe de la thérapie photodynamique.	75
Figure 9	Schéma des phénomènes photochimiques.	77
Figure 10	Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de l'HpD ($3\mu\text{g/ml}$ en PBS+2% SVF).	80
Figure 11	Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de la mTHPC ($3\mu\text{g/ml}$ en PBS+2% SVF).	81
Figure 12	Principe de la photodétection par spectroscopie.	91
Figure 13	Principe de fonctionnement du laser.	95
Figure 14	Puissance émise par une diode laser en fonction du courant.	101
Figure 15	Schéma des niveaux d'énergie dans une diode semi-conductrice.	101
Figure 16	Structure spatiale d'une diode laser à hétérojonction à haut rendement à la température ambiante.	102
Figure 17	Exemple de structure des diodes lasers : homostructure et hétérostructure.	103
Figure 18	Modélisation plane des phénomènes de diffusion et d'absorption.	106

Figure 19	Evolution statistique des photons.	106
Figure 20	Propagation de la lumière dans un échantillon tissulaire suivant le modèle de Kubelka et Munk.	109
Figure 21	Absorption de la lumière dans un milieu homogène.	114
Figure 22	Spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine.	116
Figure 23	Fonction angulaire de phase de Henyey-Greestein.	117
Figure 24	Distribution de la lumière dans un tissu diffusant vers l'avant.	118
Figure 25	Réflexion totale de la lumière sur un dioptré plan.	121
Figure 26	Structure d'un guide optique de milieu inhomogène.	122
Figure 27	Géométrie d'une fibre multimode à saut d'indice.	123
Figure 28	Cône d'acceptance d'une fibre optique à saut d'indice.	125
Figure 29	Géométrie d'une fibre à gradient d'indice ($d_1 \geq 50\mu\text{m}$ et $d_2 = 125\mu\text{m}$).	126
Figure 30	Géométrie d'une fibre monomode.	127
Figure 31	Schéma d'un connecteur.	128
Figure 32	Coupleur passif 2×1 obtenu par polissage.	130
Figure 33	Perte de courbure - perte par réfraction.	131
Figure 34	Dispersion de la lumière dans un réseau concave. $L_A=L_B=F$ est la distance focale.	134
Figure 35	Profil instrumental. A : spectre réel d'une source monochromatique, B: spectre mesuré par un instrument parfait, C: spectre mesure par instrument réel.	136
Figure 36	Convolution des profils d'entrée et de sortie du spectrographe.	138
Figure 37	Principe d'un filtre interférentiel de Fabry-Pérot.	141
Figure 38	Principe d'une diode à avalanche.	147
Figure 39	Structure d'un tube Photomultiplicateur.	148

Figure 40	Structure et diagramme électronique d'une diode de la barrette PDA.	151
Figure 41	Principe des batteries CCD. (A) Tension appliquée alternativement sur les électrodes (... négative ; -- positive). (B) Transfert de la charge générée par les photons à la diode suivante.	152
Figure 42	Principe d'un intensificateur à galette de microcanaux.	153
Figure 43	Schéma du système expérimental.	155
Figure 44	Spectre d'absorption de fluorophores endogènes, de l'HpD et de l'oxyhémoglobine. 1 : collagène ; 2 : NADH ; 3 : HpD ; 4 : oxyhémoglobine ; 5 : flavine.	158
Figure 45	Spectres de fluorescence de fluorophores endogènes et spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine. 1 : collagène, 2 : oxyhémoglobine, 3 : NADH, 4 : flavine, 5 : HpD.	159
Figure 46	Distribution spectrale UV - Visible de la lampe Xénon.	162
Figure 47	Montage optique de la source d'excitation avec une lampe Xénon.	163
Figure 48	Courbe de transmission des fibres HCG UV-visible à saut d'indice.	167
Figure 49	Schéma du capteur à trois fibres optiques. d1 : fibre excitatrice ; d2 et d3 : fibres réceptrices.	169
Figure 50	Schéma du capteur à coupleur optique 50/50.	170
Figure 51	Influence de la distance inter-fibres sur le signal de fluorescence.	171
Figure 52	Influence de la géométrie du capteur sur l'allure spectrale. Spectres de fluorescence mesurés à 520 nm sur la paume de la main normés à 100.	174
Figure 53	Schématisation bidimensionnelle de l'acceptance de la lumière dans une fibre optique.	175
Figure 54	Spectres de transmission des filtres passe haut. Les longueurs d'onde de coupure à 50% sont (1) : 380 nm, (2) : 399 nm, (3) : 408 nm, (4) : 418 nm et (5) : 450 nm.	178
Figure 55	Courbe d'efficacité du réseau dispersif gravé à raison de 200 Traits/mm.	179
Figure 56	Courbe d'efficacité quantique de la CCD.	180
Figure 57	Schéma de détection.	181
Figure 58	Fonction de transfert (réponse) du système expérimental.	182

Figure 59	Fonction de transfert et fonction de correction du système expérimental.	183
Figure 60	Spectres de fluorescence d'un tissu buccal avant et après correction.	184
Figure 61	Spectre de luminance de la lampe de calibration HG(AR).	185
Figure 62	Schéma d'un adaptateur à deux lentilles plan-convexes.	188
Figure 63	Spectre moyen d'autofluorescence mesuré in vivo sur la face inférieure de la langue chez 25 individus sains (laser krypton <415 nm, 10 mW).	201
Figure 64	Spectre moyen d'autofluorescence mesuré in vivo sur la face supérieure de la langue chez 25 individus sains (laser krypton <415 nm, 10 mW).	201
Figure 65	Spectre moyen d'autofluorescence mesuré in vivo sur le plancher de la bouche chez 25 individus sains (laser krypton <415 nm, 10 mW).	202
Figure 66	Spectre moyen d'autofluorescence mesuré in vivo sur les joues chez 25 individus sains (laser krypton <415 nm, 10 mW).	202
Figure 67	Spectre moyen d'autofluorescence mesuré in vivo sur le palais chez 25 individus sains (laser krypton <415 nm, 10 mW).	203
Figure 68	Spectre moyen d'autofluorescence mesuré in vivo sur les gencives chez 25 individus sains (laser krypton <415 nm, 10 mW).	203
Figure 69	Spectre moyen d'autofluorescence mesuré in vivo sur les lèvres chez 25 individus sains (laser krypton <415 nm, 10 mW).	204
Figure 70	Intensité de fluorescence à 520 nm en fonction du type de tissu buccal. L : Lèvres ; FIL : Face inférieure de la langue ; PB : Plancher de bouche ; J : Joues ; G : Gencives ; P : Palais.	204
Figure 71	Intensité relative $[I(598 \text{ nm})/I(520 \text{ nm})]$ en fonction du type de tissu buccal. L : Lèvres ; FIL : Face inférieure de la langue ; PB : Plancher de bouche ; J : Joues ; G : Gencives ; P : Palais.	205
Figure 72	Spectres d'autofluorescence in vivo d'un carcinome épidermoïde de plancher de bouche (TPB) et d'un tissu sain voisin (TsPB). Le ratio d'intensité de fluorescence à 520 nm $R[Ts/t]=5$.	206
Figure 73	Spectres d'autofluorescence in vivo d'un carcinome épidermoïde de l'oro-pharynx (TO-Ph) et d'un tissu sain voisin (TsO-Ph). Le ratio d'intensité de fluorescence à 520 nm $R[Ts/t]=3,3$.	206
Figure 74	Spectres d'autofluorescence in vivo d'un carcinome épidermoïde de l'oro pharynx et d'un tissu sain voisin (TsO-Ph). La normalisation a été faite par rapport à l'intensité de fluorescence à 520 nm.	207

Figure 75	Ratios d'intensité de fluorescence $[I(635 \text{ nm})/I(520 \text{ nm})]$ des carcinomes épidermoïdes et des tissus sains en fonction des sites examinés.	208
Figure 76A	Spectres d'autofluorescence mesurés in vivo sur une lésion Radique (LRAD) angiodyplasique de la vessie et sur une muqueuse saine voisine (Ts). Le ratio d'intensité de fluorescence à 520 nm $R[Ts/LRAD]=22.5$ (410 nm, 1 mW).	210
Figure 76B	Spectres d'autofluorescence mesurés in vivo sur une lésion Radique angiodyplasique de la vessie et d'une muqueuse saine voisine (410 nm, 1 mW). Les spectres sont normés à 1 par rapport à la longueur d'onde de 515-520 nm.	210
Figure 77	Spectres d'autofluorescence mesurés in vivo sur un papillome de la vessie et sur une muqueuse saine voisine (410 nm, 1 mW).	211
Figure 78	Spectres d'autofluorescence d'une lésion angiodyplasique, d'une muqueuse saine voisine et de la zone frontière intermédiaire.	211
Figure 79	Ratios d'intensité de fluorescence à 520 nm entre tissu sain (muqueuse) et tissu pathologique de la vessie en fonction des sites examinés in vivo. 1 : lésion radique inflammatoire ; 2 et 5 : lésions radiques angiodyplasiques ; 3 et 4 : papillomes.	213
Figure 80	Ratios d'intensité de fluorescence $[I(635 \text{ nm})/I(520 \text{ nm})]$ des tissus sains (muqueuses) et tissus pathologiques de la vessie en fonction des sites examinés in vivo. 1 : lésion radique inflammatoire ; 2 et 5 : lésions radiques angiodyplasiques ; 3 et 4 : papillomes.	213
Figure 81	Spectres d'autofluorescence mesurés ex vivo sur une muqueuse saine de la vessie à 364 et 410 nm avec une puissance de 1 mW. Les spectres sont normalisés à 1 par rapport à la longueur d'onde de 500-520 nm.	214
Figure 82A	Spectres d'autofluorescence mesurés ex vivo sur un carcinome urothélial et sur une muqueuse saine voisine à 364 et 400 nm avec une puissance de 1 mW.	215
Figure 82B	Spectres d'autofluorescence mesurés ex vivo sur un carcinome urothélial et sur une muqueuse saine voisine à 364 et 400 nm avec une puissance de 1 mW. Les spectres sont normalisés à 1 par rapport aux longueurs d'onde de 500-520 nm et comparé au spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine.	215

Figure 83	Ratios d'intensité de fluorescence à 450 et 500 nm entre les tissus sains (muqueuse) et les carcinomes urothéliaux en fonction des cas examinés ex vivo.	217
Figure 84	Ratios d'intensité de fluorescence $[I(450 \text{ nm})/I(500 \text{ nm})]$ et $[I(635 \text{ nm})/I(500 \text{ nm})]$ des tissus sains (muqueuse) de la vessie et des carcinomes urothéliaux en fonction des cas examinés.	217
Figure 85	Ratios d'intensité de fluorescence à 520 nm entre les tissus sains (muqueuse) de la vessie et les carcinomes urothéliaux en fonction des cas examinés.	218
Figure 86	Ratios d'intensité de fluorescence $[I(635 \text{ nm})/I(520 \text{ nm})]$ des tissus sains (muqueuse) de la vessie et des carcinomes urothéliaux en fonction des cas examinés.	218
Figure 87A	Spectres d'autofluorescence d'un carcinome épidermoïde bronchique (LID) et d'un tissu sain voisin. Le ratio d'intensité de fluorescence à 520 nm $R[Ts/t]=3,6$.	220
Figure 87B	Spectres d'autofluorescence d'un carcinome épidermoïde bronchique (LID) et d'un tissu sain voisin. Les spectres sont normalisés à 1 par rapport au pic de fluorescence à 520 nm.	220
Figure 88A	Spectres d'autofluorescence d'un carcinome épidermoïde bronchique (LIG) et du tissu sain voisin. Le ratio d'intensité de fluorescence à 520 nm $R[Ts/t]=13$.	221
Figure 88B	Spectres d'autofluorescence d'un carcinome épidermoïde bronchique (LIG) et du tissu sain voisin. Les spectres sont normalisés à 1, par rapport à l'intensité à 520 nm.	221
Figure 89	Ratios d'intensité de fluorescence $[I(635 \text{ nm})/I(520 \text{ nm})]$ des tissus bronchiques sains et des carcinomes épidermoïdes en fonction des cas examinés.	222
Figure 90	Spectre d'absorption du rouge de méthyle comparé au spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine.	226
Figure 91	Spectres de fluorescence d'intralipides (1) et de flavine (2) décomposés à partir du spectre global (3).	228
Figure 92	Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration du rouge de méthyle.	229
Figure 93	Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration des intralipides.	230
Figure 94	Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration des Intralipides et du rouge de méthyle (RM).	231

Figure 95	Influence de la réabsorption du rouge de méthyle sur l'allure du spectre de fluorescence. 1: spectre d'absorption du rouge de méthyle, 2 et 3: spectres de fluorescence de flavin pure (5 µg/ml) et de flavine (5 µg/ml) associée à 50 µg/ml du rouge de méthyle.	231
Figure 96	Ratio d'intensité de fluorescence à 630 nm tumeur/peau saine après injection intrapéritonéale de 5 mg/kg d'HpD.	235
Figure 97	Ratio d'intensité de fluorescence à 652 nm tumeur/peau saine après injection intrapéritonéale de 0,3 mg/kg de mTHPC.	235
Figure 98	Spectres de fluorescence obtenus sur la tumeur (T) des souris hairless avant l'injection et 48h après l'injection de 5 mg/kg d'HpD.	237
Figure 99	Spectres de fluorescence obtenus sur un tissu sain (Ts) des souris hairless avant l'injection et 48h après l'injection de 5 mg/kg d'HpD.	237
Figure 100	Spectres de fluorescence obtenus sur la tumeur (T) des souris hairless avant l'injection et 72h après l'injection de 0.3 mg/kg de mTHPC.	238
Figure 101	Spectres de fluorescence obtenus sur les tissus sains (Ts) des souris hairless avant l'injection et 72h après l'injection de 0,3 mg/kg de mTHPC.	238
Figure 102	Spectres d'autofluorescence mesurés sur la tumeur et la peau saine des souris hairless excitées à 364 et 410 nm. Les spectres sont normalisés à 1 par rapport au pic de flavine (500 et 520 nm).	239
Figure 103	Spectres d'autofluorescence mesurés sur la tumeur et la peau saine des souris hairless excitées à 364 nm avec une puissance de 1 mW. Normalisation par rapport à la lumière d'excitation rétrodiffusée.	239
Figure 104	Spectres de fluorescence obtenus sur la tumeur des souris nues avant l'injection et 72h après l'injection de 0.3 mg/kg de mTHPC.	242
Figure 105	Répartition de la mTHPC (0,3 mg/kg) dans le foie en fonction du temps après injection (h : heure ; j : jour). Chaque valeur d'intensité de fluorescence représente la moyenne de 9 mesures.	242
Figure 106	Répartition de la mTHPC (0,3 mg/kg) dans la tumeur en fonction du temps après injection (h : heure ; j : jour). Chaque valeur d'intensité de fluorescence représente la moyenne de 9 mesures.	243
Figure 107	Répartition de la mTHPC (0,3 mg/kg) dans le tissu sain (muscle) en fonction du temps après injection (h : heure ; j : jour). Chaque valeur d'intensité de fluorescence représente la moyenne de 9 mesures.	243

Figure 108	Répartition de la mTHPC (0,5 mg/kg) dans le foie en fonction du temps après injection (h : heure ; j : jour). Chaque valeur d'intensité de fluorescence représente la moyenne de 9 mesures.	244
Figure 109	Répartition de la mTHPC (0,5 mg/kg) dans la tumeur en fonction du temps après injection (h : heure ; j : jour). Chaque valeur d'intensité de fluorescence représente la moyenne de 9 mesures.	244
Figure 110	Répartition de la mTHPC (0,5 mg/kg) dans le tissu sain (muscle) en fonction du temps après injection (h : heure ; j : jour). Chaque valeur d'intensité de fluorescence représente la moyenne de 9 mesures.	245
Figure 111	Ratio d'intensité de fluorescence à 652 nm tumeur/peau saine après injection intrapéritonéale de 0,3 et de 0,5 mg/kg mTHPC.	247
Figure 112	Spectres d'émission de fluorescence sur tumeurs HT29 mesurés 24h après injection d'une dose d'HpD de 10 mg/kg. Spectres avant et après photoirradiation en lumière rouge (laser à colorant) dont la fluence est 150 J/cm ² .	250
Figure 113	Spectres d'émission de fluorescence sur tumeurs HT29 mesurés 24h après injection aux souris d'une dose d'HpD de 10 mg/kg. Spectres avant et après photoirradiation en lumière bleue (laser krypton) dont la fluence est 1 J/cm ² .	251
Figure 114	Spectres d'émission de fluorescence sur tumeurs HT29 mesurés 24h après injection aux souris d'une dose d'HpD de 10 mg/kg. Spectres avant et après photoirradiation séquentielle en lumière bleue (1 J/cm ²) et rouge (150 J/cm ²).	251
Figure 115	Spectres de fluorescence des fluorophores endogènes mesurés en solutions.	254
Figure 116	Schéma d'un spectre à plusieurs bandes d'émission. Spectre d'autofluorescence de la face supérieure de la langue.	256
Figure 117	Schéma d'un spectre de fluorescence à bande unique.	257
Figure 118A	Spectre de fluorescence du tryptophane modélisé par une gaussienne.	262
Figure 118B	Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre du tryptophane en fonction de la longueur d'onde.	262
Figure 119A	Spectre de fluorescence de l'HpD modélisé par deux gaussiennes.	263
Figure 119B	Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre de l'HpD en fonction de la longueur d'onde.	263

Figure 120A	Spectre de fluorescence de la mTHPC modélisé par deux gaussiennes.	264
Figure 120B	Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre de la mTHPC en fonction de la longueur d'onde.	264
Figure 121A	Spectre de fluorescence d'un fantôme simulant l'autofluorescence tissulaire, excité à 410 nm, et le spectre estimé par quatre gaussiennes.	266
Figure 121B	Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre du fantôme simulant l'autofluorescence tissulaire en fonction de la longueur d'onde.	266
Figure 122A	Spectre de fluorescence d'un fantôme simulant l'autofluorescence tissulaire, excité à 364 nm, et le spectre estimé par quatre gaussiennes.	267
Figure 122B	Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre du fantôme simulant l'autofluorescence tissulaire en fonction de la longueur d'onde.	267
Figure 123A	Spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine et le spectre estimé par quatre gaussiennes	270
Figure 123B	Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre en fonction de la longueur d'onde.	270
Figure 124A	Spectre d'autofluorescence d'un papillome induit sur souris, mesuré à une excitation de 364 nm et le spectre estimé par cinq gaussiennes.	273
Figure 124B	Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre du papillome en fonction de la longueur d'onde.	273
Figure 125A	Spectre d'autofluorescence d'un papillome induit sur souris, mesuré à une excitation de 364 nm et le spectre estimé par six gaussiennes.	274
Figure 125B	Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre du papillome en fonction de la longueur d'onde.	274
Figure 126A	Spectre d'autofluorescence d'un carcinome urothélial, mesuré à une excitation de 364 nm et le spectre estimé par trois gaussiennes.	276
Figure 126B	Répartition de l'erreur d'estimation ($I-\hat{I}$) du spectre du carcinome en fonction de la longueur d'onde.	276

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Données spectrales des fluorophores exogènes employés en diagnostic.	37
Tableau 2	Données spectrales des fluorophores endogènes mesurés en solution.	40
Tableau 3	Récapitulation des travaux réalisés par spectroscopie de l'autofluorescence.	67
Tableau 4	Caractéristiques des lampes employées en spectroscopie.	94
Tableau 5	Exemples de lasers médicaux.	99
Tableau 6	Bandes d'émission des lasers à semi-conducteur.	104
Tableau 7	Détermination de l'influence de la distance interfibre sur le signal de fluorescence. Données expérimentales comparatives de l'intensité spectrale mesurée avec les différents capteurs.	173
Tableau 8	Transmittance des filtres passe haut aux longueurs d'onde d'excitation.	190
Tableau 9	Composition des fantômes utilisés pour simuler l'autofluorescence, l'absorption et la diffusion de la lumière dans les tissus.	226
Tableau 10	Ratios d'intensité de fluorescence à 630 nm [tumeur/peau saine] à différents temps après injection intrapéritonéale (i.p.) de 5 mg/kg d'HpD chez des souris "hairless" porteuses de papillomes chimioinduits.	234
Tableau 11	Ratios d'intensité de fluorescence à 652 nm [tumeur/peau saine] à différents temps après injection intrapéritonéale (i.p.) de 0,3 mg/kg de mTHPC chez des souris "hairless" porteuses de papillomes chimioinduits.	234
Tableau 12	Ratios d'intensité de fluorescence à 652 nm [tumeur/peau saine] à différents temps après injection intrapéritonéale (i.p.) de 0,3 mg/kg de mTHPC.	246
Tableau 13	Ratios d'intensité de fluorescence à 652 nm [tumeur/peau saine] à différents temps après injection intrapéritonéale (i.p.) de 0,5 mg/kg de mTHPC.	246
Tableau 14	Concentration intratumorale de mTHPC chez des souris nues porteuses de tumeurs d'adénocarcinome colique humain, injectée de 0,3 mg/kg.	247

Tableau 15	Pourcentage de photoblanchiment déduit de la diminution du pic d'émission à 630 nm sur les spectres d'émission de fluorescence obtenus après photoirradiation des tumeurs en lumière bleue ($1\text{j}/\text{cm}^2$), en lumière rouge ($150\text{J}/\text{cm}^2$) et en associant les deux lumières. Les résultats représentent la moyenne sur un nombre minimale de quatre souris ($\% \pm \text{écart-type}$).	252
Tableau 16	Paramètres des spectres de fluorescence estimés à partir du modèle gaussien.	261
Tableau 17	Paramètres du spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine estimés à partir du modèle gaussien.	269
Tableau 18	Paramètres du spectre de fluorescence d'un papillome induit sur souris "hairless" estimés à partir du modèle composé de 5 gaussiennes.	271
Tableau 19	Paramètres du spectre de fluorescence d'un papillome induit sur souris "hairless" estimés à partir du modèle composé de 6 gaussiennes.	272
Tableau 20	Paramètres du spectre de fluorescence d'un carcinome urothélial humain estimés à partir du modèle composé de 3 gaussiennes et du spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine.	275

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame BOURG-HECKLY Geneviève, HDR, Université Pierre & Marie Curie
Paris VI,

Monsieur SCHULTZ Guy, Professeur, IUT Mulhouse.

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur A'AMAR Ousama

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Spectroscopie tissulaire *in vivo* de l'autofluorescence et de la
fluorescence induite : instrumentation, analyse et modélisation.
Applications au diagnostic des cancers précoces et à l'optimisation de
la thérapie photodynamique".**


en vue de l'obtention du titre de :


**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

Spécialité : **"AUTOMATIQUE & TRAITEMENT NUMÉRIQUE DU SIGNAL"**

Fait à Vandoeuvre le, **12 Septembre 1997**

Le Président de l'I.N.P.L.,


J. HARDY



RESUME

Cette recherche se fonde sur des données physico-chimiques et sur une expérimentation avec un matériel adapté à la clinique humaine. Il a pour objectif notamment le diagnostic des cancers infracliniques et des états précancéreux non détectables par les moyens conventionnels.

Un système de mesure *in vivo* de la fluorescence tissulaire des fluorophores endogènes ou des fluorophores exogènes localisés dans les tissus pathologiques a été conçu. La source de lumière excitatrice est un laser ou une lampe filtrée de longueur d'onde dépendant du fluorophore étudié (350-420 nm). Le capteur multifibre, utilisable en endoscopie souple, permet de guider la lumière d'excitation, le signal de fluorescence et la lumière d'excitation rétrodiffusée. La fluorescence recueillie est spectralement dispersée et mesurée au moyen d'un analyseur optique multicanal "OMA". La mesure de la puissance de la lumière d'excitation rétrodiffusée est utilisée pour s'affranchir de la variabilité des paramètres instrumentaux et pour normaliser les spectres obtenus sur des tissus différents. Pour minimiser le phénomène de photoblanchiment des fluorophores, le déclenchement de la lumière d'excitation synchronise l'acquisition du signal de fluorescence.

Des mesures expérimentales de l'autofluorescence sur différents tissus sains et pathologiques des voies aérodigestives supérieures et de la vessie ont été effectuées. Pour un même organe, le ratio du pic maximal de l'autofluorescence entre tissu sain et tumeur est variable : des résultats sont rapportés. La pharmacocinétique des photosensibilisants "HpD" et "mTHPC" sur modèles animaux a été étudiée afin de déterminer l'intervalle de temps optimal entre l'administration du produit et le traitement photodynamique (PDT). Une mesure du photoblanchiment au cours de la PDT sert à mesurer l'efficacité de l'irradiation lumineuse.

L'autre partie de l'étude est consacrée à la modélisation de l'autofluorescence afin d'identifier et de quantifier les fluorophores responsables. A partir de données expérimentales sur des fantômes avec différents fluorophores naturels, un modèle permettant de reconstruire le spectre global de fluorescence a été développé. Chaque pic du spectre a été modélisé par une loi de Gauss. Le modèle global constitue la somme des gaussiennes identifiées séparément. Ce modèle devrait mettre en évidence l'influence de la réabsorption due aux formes oxydées ou réduites de l'hémoglobine et enrichir les informations exploitables pour le diagnostic *in vivo* des états physiologiques et pathologiques.

Mots Clés : Autofluorescence, Capteur, Fluorescence, Laser, Modélisation, Pharmacocinétique, Photodétection, Spectroscopie.

ABSTRACT

Fluorescence of endogenous and exogenous fluorophores induced by ultraviolet or visible monochromatic light can be used in several applications, including tumor detection and pharmacokinetics study of photosensitizers. A spectroscopic system was developed in order to analyze tissue fluorescence for a clinical use *in vivo*. The excitation light was a laser or filtered Xenon lamp, with suitable wavelength, depending on the absorption characteristics of the target fluorophore (350-420 nm). An optical multifiber probe was used for excitation, fluorescence collection and backscattered light power measuring. The fluorescence signal was spectrally dispersed and measured by means of an optical multichannel analyzer "OMA". Backscattered light power was measured as a standard reference permitting to reduce dependence of fluorescence signal on the instrumental parameters and to normalize autofluorescence spectra. Excitation light was synchronized with acquisition in order to reduce fluorescence photobleaching. Owing to the flexibility and the small size of the optical probe, seeking cancers via the endoscopic canal was easily performed.

Clinical diagnosis results were obtained with this system. Significant differences in tissue autofluorescence, in both fluorescence intensity and spectral shape, were found in tumors compared to normal surrounding tissues.

Pharmacokinetics of photosensitizers mTHPC and HpD, used in photodynamic therapy (PDT), were studied in nude and hairless mice bearing tumors. The optimal time, corresponding to the highest fluorescence ratio tumor / normal tissue, for laser irradiation after photosensitizer administration was evaluated. This could improve the PDT efficiency.

In order to study the contribution of endogenous and exogenous fluorophores that participate in the global fluorescence signal, a gaussian analyzing model was developed. Each fluorescence peak in the measured spectrum was supposed to be situated in the center of a gaussian distribution. So, the fitted fluorescence model was composed of the sum of gaussians corresponding to principal and secondary peaks in the measured spectrum. The built model was then used to reconstruct the spectral shape of the fluorescence emission of a given sample or tissue and to separate effects due to hemoglobin reabsorption. This approach could permit the extraction of important clinical information about tissue metabolic-structural characterization.

Keywords: Autofluorescence, Fluorescence, Laser, Modeling, Optical Probe, Pharmacokinetics, Photodetection, Spectroscopy.