



HAL
open science

Imagerie de fluorescence en cancérologie : spectroscopie, traitement du signal et gestion automatisée pour l'optimisation du diagnostic des tumeurs précoces

Kamila Khemis

► To cite this version:

Kamila Khemis. Imagerie de fluorescence en cancérologie : spectroscopie, traitement du signal et gestion automatisée pour l'optimisation du diagnostic des tumeurs précoces. Médecine humaine et pathologie. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1998. Français. NNT : 1998INPL068N . tel-01776070

HAL Id: tel-01776070

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776070v1>

Submitted on 24 Apr 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>

1360043564

Institut National Polytechnique de Lorraine
Ecole Doctorale IAE+M
DFD Automatique
N° attribué par la bibliothèque

98INPL068N



[M] 1998 KHEMIS, K.

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'INPL

Discipline : Automatique et Traitement Numérique du Signal

présentée par

Kamila KHEMIS

IMAGERIE DE FLUORESCENCE EN CANCEROLOGIE :
Spectroscopie, traitement du signal et gestion automatisée pour
l'optimisation du diagnostic des tumeurs précoces

soutenue publiquement le 28 / 09 / 1998

Président :

Pr. E. YVROUD

Rapporteurs :

Pr. S. JACQUEY

Pr. G. SCHULTZ

Pr. G. VILLERMAIN-LECOLIER

Examineurs :

M.D.C. G. BOURG-HECKLY

Pr. F. GUILLEMIN, Directeur de thèse

M.D.C. V. LOUIS-DORR

Pr. D. WOLF



AVANT PROPOS

Le Centre Régional de Lutte Contre le Cancer de Nancy existe depuis 1924 et doit son nom à son fondateur le Pr. Alexis VAUTRIN. Ce Centre fait partie de la Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer qui regroupe 20 centres Français.

Parmi leurs missions, les Centres doivent :

- effectuer des recherches scientifiques concernant le cancer,
- mettre en œuvre les moyens susceptibles de perfectionner les méthodes diagnostiques et le traitement,
- organiser la prophylaxie du cancer en s'adressant à la fois au public médical et au grand public.

Pour lutter contre le cancer, le législateur a prévu de grouper au sein d'une même structure, les diverses techniques de diagnostic et de traitement et de travailler en concertation multidisciplinaire.

Le projet de recherche que nous avons entrepris au centre Alexis VAUTRIN nous a permis d'apprécier et de bénéficier de cet esprit d'équipe pour mener à bien la recherche au profit du patient.

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé sous les Directions du Professeur F. GUILLEMIN et du Professeur E. YVROUD au sein du laboratoire Instrumentation Médicale Automatisée en Cancérologie (IMAC) du Centre Alexis VAUTRIN qui est un laboratoire rattaché au Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN).

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à :

Monsieur le Professeur F. GUILLEMIN Directeur de la Recherche du Centre Alexis VAUTRIN pour son accueil son encadrement et son soutien durant ces quatre années.

Monsieur le Directeur de Recherche CNRS Emérite E. YVROUD pour son aide, sa patience sa gentillesse et son écoute permanente.

Messieurs les Professeurs Serge JACKY, Guy SCHULTZ, Gérard VILLERMAIN-LECOLIER d'avoir bien voulu accepté de rapporter mon travail, et pour leurs accueils chaleureux dans leurs laboratoires et leur participation au Jury.

Madame V. LOUIS-DORR et Monsieur le Professeur D. WOLF pour leur aide leur soutien, leurs conseils et pour avoir accepté de faire partie de ce Jury.

Madame Geneviève BOURG-HECKLY pour sa participation à ce Jury et pour sa grande gentillesse.

Monsieur Jean Louis. MERLIN responsable dans le Laboratoire de Recherche en Oncologie pour son accueil au sein de son équipe.

Monsieur le Professeur M. ABIGNOLI à titre postum, pour ses conseils dans la partie électronique.

Monsieur D. LIGNON pour toute l'aide qu'il m'a fournie sur le plan scientifique et humain.

Monsieur le micromécanicien Michel HENRY pour sa patience, son écoute et sa disponibilité.

Madame BENOIT de la Faculté des Sciences pour son aide dans la partie optique de cette étude.

Madame le Professeur Lina BEZDETNAYA et Madame le Docteur Anne MEUNIER pour leur soutien et leurs conseils.

Le Docteur Dominique NOTTER de la Faculté de Pharmacie et ses chercheurs Edwige BOSSU, Jean François BISSON et Isabelle COSSERAT-GERARDIN.

Je remercie particulièrement mes collègues et amis de la recherche :

Hadjira. REZZOUG, Ousama. A'AMAR, Claudine. NIEDERST, Marie-Pierre GRAMAIN, Arturo. VERA et son épouse Monica, Juan José PADILLA et son épouse Griselda, Gisèle HILT, Sabine ELLES George MADELIS, Vlada MELNIKOVA, Irina BELICHENKO et Dominique MARIUS LE PRINCE- CHANEL : votre soutien continu et votre aide tant sur le plan scientifique que sur le plan humain m'ont énormément touchée.

Je remercie également le personnel du centre Alexis VAUTRIN et en particulier le Docteur en sciences et chargée de recherches Marie Luce DILLER, les secrétaires M. REYNNIER et M. FENDRICH, l'ingénieur Monsieur Pierre SCHEFFER, Messieurs les techniciens en électronique : Emmanuel LAIDELLI et Bruno MAURY, les responsables du laboratoire d'informatique : Monsieur Eric PICARDA et Madame Joceline THIEBAUT et le responsable de la reprographie : Monsieur MARTEL.

J'adresse mes remerciements aux étudiants et au personnel du laboratoire de Recherche en Oncologie du Centre Alexis VAUTRIN.

J'adresse toute ma reconnaissance au Ministère Algérien de l'éducation Nationale et au Ministère Français des Affaires Etrangères pour la bourse de coopération qu'il m'ont accordée.

Enfin je remercie la Ligue Départementale de Meurthe et Moselle pour avoir financé le matériel de recherche.

Je dédie cette thèse à :

*mes parents, ma soeur et mon frère,
toute ma famille de Tlemcen, mes
ami(e)s de France et d'Algérie et mon
Pays, puisse t-il retrouver la paix.*

the 1990s, the number of people in the world who are poor has increased.

There are two reasons for this. First, the world population has increased. Second, the number of people who are poor has increased in many of the world's poorest countries. This is because the rich countries have not helped them enough.

There are two reasons for this. First, the rich countries have not helped them enough. Second, the poor countries have not helped themselves enough.

There are two reasons for this. First, the poor countries have not helped themselves enough. Second, the rich countries have not helped them enough.

There are two reasons for this. First, the rich countries have not helped them enough. Second, the poor countries have not helped themselves enough.

There are two reasons for this. First, the poor countries have not helped themselves enough. Second, the rich countries have not helped them enough.

There are two reasons for this. First, the rich countries have not helped them enough. Second, the poor countries have not helped themselves enough.

There are two reasons for this. First, the poor countries have not helped themselves enough.

Second, the rich countries have not helped them enough.

There are two reasons for this. First, the rich countries have not helped them enough. Second, the poor countries have not helped themselves enough.

There are two reasons for this. First, the poor countries have not helped themselves enough. Second, the rich countries have not helped them enough.

There are two reasons for this. First, the rich countries have not helped them enough. Second, the poor countries have not helped themselves enough.

There are two reasons for this. First, the poor countries have not helped themselves enough. Second, the rich countries have not helped them enough.

There are two reasons for this. First, the rich countries have not helped them enough. Second, the poor countries have not helped themselves enough.

There are two reasons for this. First, the poor countries have not helped themselves enough.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	11
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
CHAPITRE 1 : LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT PHOTODYNAMIQUE	16
1. Principes du diagnostic et de la thérapie photodynamique	16
2. Historique de la thérapie et du diagnostic par fluorescence induite	16
3. Caractéristiques d'un photosensibilisant	17
4. Les photosensibilisants	18
4.1. Les photosensibilisants de la première génération : les porphyrines	18
4.1.1. Les protoporphyrines endogènes	19
4.1.2. L'hématoporphyrine dérivée (HpD)	19
4.2. Les photosensibilisants de la deuxième génération : les chlorines	20
4.2.1. Les purpurines	20
4.2.2. Les Bactérochlorines	20
4.2.3. Le benzoporphyrine monoacide dérivée A (BPD-MA)	20
4.2.4. La mTHPC ou méta-tetra(hydroxyphényle) chlorine	20
4.2.5. Les Rhodamines	22
5. Conclusions	22
CHAPITRE 2 : LES FLUOROPHORES ENDOGENES	24
1. Introduction.	24
2. Résultats expérimentaux	25
3. Conclusions	28
CHAPITRE 3 : PROPRIETES OPTIQUES DES TISSUS	30
1. Introduction	30
2. Caractéristiques générales de la propagation de la lumière dans les tissus	30
2.1. La réflexion	30
2.2. L'absorption	31
2.3. La diffusion	31
3. Simulation de la propagation de la lumière dans les tissus	32
3.1. Equation de transfert - approximation de la diffusion	32
3.2. La méthode de Monté-Carlo (MC)	33
4. Mesures expérimentales	34

5. Conclusions	38
CHAPITRE 4 : TRAVAUX ANTERIEURS	39
1. Spectroscopie de fluorescence	39
1.1. Source de lumière	40
1.2. Le capteur	41
1.3. Le spectrographe	41
1.4. Normalisation	42
1.5. Spectres résolues dans le temps	42
1.6. Objectif	42
1.7. Le système du CAV	43
2. Imagerie de fluorescence	44
2.1 Introduction	44
2.2. Système Canadien	47
2.2.1. <i>Description</i>	47
2.2.2. <i>Traitement d'image</i>	47
2.2.3. <i>Applications</i>	47
2.3. Système suédois	48
2.3.1. <i>Premier système (images 1D)</i>	48
2.3.2. <i>Deuxième système</i>	48
2.4. Système d'imagerie endoscopique des USA (Massachusetts)	50
2.5. Système d'imageries des USA (Texas)	51
2.5.1. <i>Description du système</i>	51
2.5.2. <i>Applications</i>	51
2.6. Système d'imagerie Russe	51
2.7. Système d'imagerie et de spectroscopie Japonais	52
2.7.1. <i>Description</i>	52
2.7.2. <i>Applications</i>	52
2.8. Système d'imagerie Suisse (Lausanne)	53
2.8.1. <i>Description</i>	53
2.8.2. <i>Traitement d'images</i>	54
2.8.3. <i>Applications</i>	54
2.8.4. <i>Imagerie fréquentielle</i>	54
2.9. Système Allemand (Ulm)	55
2.10. Système Italien (Milan)	56
2.10.1. <i>Description</i>	56

2.10.2. Applications et traitement d'images associé	56
2.11. Conclusion	58
CAHIER DES CHARGES ET METHODOLOGIE	60
PARTIE II : ETUDE ET REALISATION DE L'INSTRUMENTATION	63
1. Introduction	63
2. Caractéristiques de la caméra	64
2.1. Données du constructeur	64
2.2. Détermination des réponses de la CCD filtrée en fonction de la longueur d'onde de la lumière reçue	66
3. Les sources de lumière	68
4. Module optique	71
4.1. Optique d'adaptation du cystoscope à la caméra	71
4.2. Optique de transmission de la lumière blanche et du LASER	74
5. Module mécanique	77
5.1. Description	77
5.2. Commande du moteur pas à pas	78
6. Module électronique	80
6.1. Description du matériel et du logiciel de la carte d'acquisition d'image	80
6.2. Le micro-contrôleur	81
6.3. La diode photosensible	81
7. Commande	83
PARTIE III : TRAITEMENT D'IMAGES	87
1. Introduction	87
2. Traitement d'images conventionnel	89
2.1. Restauration d'images	89
2.1.1. Filtres linéaires	89
2.1.2. Filtres non linéaires	90
2.1.3. Filtres adaptatifs	92
2.1.4. Filtrage inverse	93
2.1.5. Choix et implémentation	94
2.2. Techniques digitales de rehaussement de contraste et de contours	98
2.2.1. Rehaussement de contraste global	99
2.2.1.1. Windowing (fenêtrage)	99
2.2.1.2. Egalisation d'histogramme (HE)	99
2.2.1.3. Hyperbolisation d'histogramme (HH)	99

2.2.1.4. Transformation sigmoïde de la densité optique d'une image	100
<i>2.2.2. Rehaussement de contraste local</i>	100
2.2.2.1. Local Range Modification (LRM)	100
2.2.2.2. Egalisation d'histogramme adaptative (AHE)	101
2.1.2.3. Egalisation d'histogramme adaptative tronquée (CLAHE)	101
2.2.2.4. Egalisation d'histogramme avec déplacement (MHE)	101
2.2.2.5. Unsharp masking	102
2.2.2.6. Décalage d'histogramme(HS)	102
<i>2.2.3. Rehaussement de contours</i>	104
<i>2.2.4. Choix et Implémentation</i>	106
2.3. La classification	110
<i>2.3.1. Méthodes globales</i>	110
2.3.1.1. Algorithme ISODATA de DIAS VELASCO (1980)	111
2.3.1.2. La méthode de FISHER	111
2.3.1.3. La méthode de BHATTACHARYA	111
2.3.1.4. Algorithme des centres locaux par WILSON	112
2.3.1.5. Algorithme basé sur l'analyse discriminante par OTSU	113
2.3.1.6. Autre méthode basée sur l'analyse d'histogramme	114
<i>2.3.2. Méthode hybride</i>	114
<i>2.3.3. Méthodes locales</i>	115
3.3.3.1. Méthode de KOHLER (1981)	115
3.3.3.2. Méthodes de seuillage basées sur l'entropie	116
<i>2.3.4. Méthodes dynamiques</i>	117
<i>2.3.5. Choix et implémentation</i>	119
2.4. Conclusions	122
3. Traitement d'images spécifique au système d'imagerie de fluorescence	122
3.1. Principe du traitement d'images relatif à la suppression de l'autofluorescence	122
3.2. Algorithme de traitement d'images appliqué dans le cas du diagnostic par fluorescence induite : GLOBI	125
3.3. Algorithme de traitement d'images appliqué dans le cas du diagnostic par autofluorescence : GLOBA	127
4. Conclusions	129
PARTIE IV : MESURES ET RESULTATS	130
INTRODUCTION	130
CHAPITRE 1 : REPONSES DU SYSTEME D'IMAGERIE A CERTAINS	131

PHENOMENES OPTIQUES

1. Etude de la sensibilité de la caméra à la base des mesures spectroscopiques	131
1.1. L'œil humain	131
1.2. La caméra	132
2. Etude statistique du bruit généré par le dispositif d'imagerie	133
2.1. Pas d'excitation	134
2.2. En présence du faisceau d'excitation	134
3. Mise au point d'un modèle fluorescent	135
4. Etude de la réponse du système d'imagerie en fonction de la variation des paramètres optiques du modèle fluorescent	141
4.1. Etude en fonction de la variation de la diffusion	141
4.2. Etude en fonction de la variation de l'absorption	143
4.3. Etude en fonction de la variation de la fluorescence	144
4.3.1. <i>Variation de la Fluorescéine (autofluorescence)</i>	144
4.3.2. <i>Etude en fonction de la fluorescence induite par la mTHPC</i>	147
4.3.3. <i>Etude en fonction de la fluorescence induite par la PpIX</i>	149
4.3.4. <i>Etude en fonction de la fluorescence induite par l'HpD</i>	150
4.3.5. <i>Récapitulatif</i>	153
5. Conclusion	153
CHAPITRE 2 : RESULTATS DU TRAITEMENT D'IMAGES	156
1. Introduction	156
2. Résultats sur les fantômes	158
2.1. Introduction	158
2.2. Résultats des algorithmes de restauration de rehaussement de contraste et de segmentation	158
2.2.1. <i>Résultats obtenus avec les algorithmes de restauration</i>	158
2.2.2. <i>Résultats obtenus avec les algorithmes de rehaussement de contour ou de contraste</i>	161
2.2.3. <i>Résultats obtenus avec les deux algorithmes de seuillage : ISODATA et la relaxation</i>	166
2.3. Résultats obtenus avec les algorithmes globaux de traitement d'images	170
3. Résultats sur les modèles animaux	181
3.1. Introduction	181
3.2. Application des algorithmes de restauration de rehaussement de contraste ou de contour et de segmentation sur les images de fluorescence des souris hairless	183
3.2.1 : <i>Application des algorithmes de restauration</i>	183
3.2.2 : <i>Application des algorithmes de rehaussement de contraste ou de contour</i>	185

3.2.3. Résultats obtenus avec les algorithmes de seuillage	189
3.3. Résultats obtenus avec les algorithmes globaux de traitement d'images	190
4. Application sur les lésions bénignes humaines	201
4.1. Introduction	201
4.2. Résultats obtenus avec les algorithmes de restauration de rehaussement de contraste ou de contour et de segmentation	201
4.2.1. Résultats obtenus avec les algorithmes de restauration	201
4.2.2. Résultats obtenus avec les algorithmes de rehaussement de contours et de contraste	202
4.2.3. Résultats obtenus avec les algorithmes de seuillage	204
4.3. Résultats obtenus avec l'algorithme global de traitement d'images en autofluorescence (Globa)	205
5. Conclusions	208
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	210
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	216
ANNEXE B : PHOTOBIOLOGIE	230
ANNEXE 3D : IMAGERIE DE FLUORESCENCE EN TROIS DIMENSIONS	235
LISTE DES TABLEAUX	241
LISTE DES FIGURES	242

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

INTRODUCTION GENERALE

Le diagnostic précoce des cancers est une condition essentielle de la moindre agressivité du traitement et de la meilleure qualité des résultats thérapeutiques. La démarche diagnostique est constituée de différentes étapes : l'examen clinique, les examens paracliniques, puis le prélèvement pour examen anatomopathologique. Cette dernière étape est indispensable et permet de donner la certitude du diagnostic de cancer.

Le choix des examens paracliniques dépend de la localisation et de la nature du site à examiner. Différentes méthodes peuvent être associées.

Leurs objectifs sont :

- de mettre en évidence un foyer pathologique avec une bonne sensibilité,
- de localiser ce foyer dans l'espace et par rapport aux tissus voisins,
- d'analyser sa structure, ce qui permet en général de différencier des états pathologiques différents,
- d'être peu sensibles aux artéfacts.

Nous ne parlerons pas des méthodes d'imagerie bien que leur apport soit essentiel au diagnostic et au bilan d'extension des cancers ; on ne fera que les citer : Radiographie, Tomodensitométrie ou scannographie X, Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire, Isotopes, Ultrasons. Ces outils sont totalement intégrés au plateau technique des établissements de soins. Les performances des appareils s'améliorent continuellement et donc la qualité des images et la précision des informations.

Schématiquement, les explorations radiographiques et tomographiques s'appliquent à une exploration des structures profondes, tandis que les méthodes endoscopiques s'appliquent à l'exploration des organes creux.

Examens endoscopiques

Les examens endoscopiques relaient l'examen clinique pour l'exploration des organes creux (ex. vessie, estomac, colon...), certaines cavités séreuses telles que le péritoine ou la plèvre, les articulations, certains espaces tels que le médiastin supérieur ou le pelvis. [151]

Les caméras CCD (Charge Coupled Device) représentent la dernière évolution des endoscopes. Les limites sont repoussées, permettant l'exploration des « nouveaux territoires » : pancréas, intestin grêle, petites articulations, ventricules cérébraux, uretères...). Le diamètre de ces outils peut atteindre 0.8 mm [148] [149] [150].

A ces examens endoscopiques on a associé des outils de prélèvement (biopsie, brossage ou aspiration) et de traitement (excérèse, LASER...). On citera l'outil hybride qu'est l'échoendoscope qui permet l'exploration de la structure de la paroi des organes creux et des organes de voisinage complétant les informations visuelles de l'endoscope et les informations de l'imagerie plus classique.

L'une des techniques associées à l'outil endoscopique et qui fait l'objet de notre recherche, est le diagnostic par fluorescence. Cette approche est récente. Elle est apparue avec la thérapie photodynamique vers les années 70. Le principe de base consiste à exciter par la lumière les fluorophores endogènes ou exogènes des tissus examinés et à recueillir leur fluorescence. Cette dernière étant différente selon qu'elle provient d'un tissu sain ou d'un tissu pathologique, son analyse devrait permettre de les différencier.

La comparaison des signaux de fluorescence émanant des tissus peut se faire de différentes manières :

- en fonction de la longueur d'onde ; dans ce cas il s'agit d'une analyse spectrale. Le dispositif associé est un spectrofluorimètre qui mesure le signal de fluorescence du violet au proche infra-rouge. C'est typiquement un outil de recherche. [113-118]
- en ne considérant qu'une ou plusieurs fenêtres spectrales bien définies, correspondant aux zones du spectre où le signal de fluorescence diffère entre les tissus, on peut faire de l'imagerie de fluorescence.
- en effectuant une analyse du signal de fluorescence au cours du temps (de l'ordre de quelques centaines de picosecondes) ; c'est la spectroscopie ou l'imagerie résolue dans le temps.

En spectroscopie la mesure est ponctuelle (moins d'un millimètre de tissu). En imagerie de fluorescence, la mesure se fait sur une surface beaucoup plus grande (quelques cm²) ; la mise au point de l'outil nécessite au préalable une connaissance précise des caractéristiques spectrales des tissus et des agents fluorescents. Ces deux approches sont successives et complémentaires.

Il existe des dispositifs dis "d'imagerie spectrale", qui permettent une analyse précise et globale. En particulier, le spectrofluorimètre basé sur le calcul de la transformée de Fourier de la différence entre deux chemins optiques suivis par le signal de fluorescence. Ce système présenté par MALIK (1996), permet d'enregistrer les spectres d'émission de chaque pixel de l'image. Cette approche s'applique pour l'instant, à la microscopie de fluorescence et permet de suivre des modifications du microenvironnement.

Notre étude est consacrée au développement d'un dispositif d'imagerie pour le diagnostic précoce des cancers et des états pré-cancéreux par fluorescence avec et sans apport de photosensibilisants.

I) La première partie rapportant l'état des connaissances est fondée sur les données de la littérature et sera divisée en quatre chapitres.

- Le premier chapitre introduit les notions sur le diagnostic et la thérapie photodynamique. Une étude des photosensibilisants sera également considérée pour situer ceux que nous utiliserons.

- Dans le deuxième chapitre, nous nous intéresserons aux fluorophores endogènes en examinant leur intérêt dans le diagnostic par autofluorescence.

- Le troisième chapitre est un rappel sur les propriétés optiques des tissus qui influencent le diagnostic. Nous citerons également les approches scientifiques adoptées pour obtenir les paramètres optiques des tissus.

- Le quatrième chapitre constitue une étude bibliographique sur les dispositifs d'imagerie de fluorescence développés par différentes équipes de recherche. Nous considérerons alors l'architecture, les méthodes de traitement d'image et les applications de chaque dispositif. Nous ferons également une brève étude sur les systèmes de spectroscopie de fluorescence, avant d'introduire celui que nous exploitons dans le cadre de ce projet de recherche.

- Nous finirons cette partie par une présentation du cahier des charges et de la méthodologie adoptée pour mettre au point ce système d'imagerie.

II) Dans la deuxième partie, nous nous pencherons sur l'architecture du système développé. Nous présenterons les caractéristiques des anciens et nouveaux modules, tout en évoquant les motivations de choix de ces derniers. Nous terminerons cette partie en présentant les algorithmes de commande à travers lesquels se traduit la synchronisation des tâches que l'on souhaite exécuter.

III) La troisième partie est consacrée au traitement d'images. Le but recherché est de corriger les images originales, d'améliorer leurs qualités visuelles et d'apporter des informations quantitatives ou qualitatives pour le diagnostic. Nous rappellerons quelques méthodes de traitement d'images, en particulier les méthodes de restauration, de rehaussement de contraste et de segmentation. Ceci sera suivi du choix de l'implémentation et du test des algorithmes qui s'adaptent le mieux à nos images. Ensuite nous présenterons

les algorithmes spécifiques à chaque approche diagnostique. Ces derniers font appel aux méthodes conventionnelles citées auparavant.

IV) Dans la quatrième partie nous exposerons les résultats obtenus avec ce dispositif. Nous commencerons par un modèle (ou fantômes) simulant les sites que l'on souhaite explorer ultérieurement *in vivo*. La validation se fera, sur des animaux portant des tumeurs (souris et rats). Le diagnostic se fera avec et sans photosensibilisant.

Nous évoquerons les limites de cet équipement, ce qui nous conduira aux perspectives envisagées pour l'améliorer.

the 1990s, the number of people in the UK who are aged 65 and over has increased from 10.5 million to 13.5 million (1990-2000) (ONS 2001).

There is a growing awareness of the need to address the health care needs of the elderly population. The Department of Health (2000) has set out a strategy for the NHS to meet the needs of the elderly population. This strategy is based on the following principles:

- To ensure that the NHS is able to meet the needs of the elderly population.
- To ensure that the NHS is able to provide a high quality of care for the elderly population.
- To ensure that the NHS is able to provide a range of services to meet the needs of the elderly population.

The NHS is committed to providing a high quality of care for the elderly population. This commitment is reflected in the following objectives:

- To ensure that the NHS is able to provide a high quality of care for the elderly population.
- To ensure that the NHS is able to provide a range of services to meet the needs of the elderly population.
- To ensure that the NHS is able to provide a high quality of care for the elderly population.

The NHS is committed to providing a high quality of care for the elderly population. This commitment is reflected in the following objectives:

- To ensure that the NHS is able to provide a high quality of care for the elderly population.
- To ensure that the NHS is able to provide a range of services to meet the needs of the elderly population.
- To ensure that the NHS is able to provide a high quality of care for the elderly population.

The NHS is committed to providing a high quality of care for the elderly population. This commitment is reflected in the following objectives:

- To ensure that the NHS is able to provide a high quality of care for the elderly population.
- To ensure that the NHS is able to provide a range of services to meet the needs of the elderly population.
- To ensure that the NHS is able to provide a high quality of care for the elderly population.

The NHS is committed to providing a high quality of care for the elderly population. This commitment is reflected in the following objectives:

- To ensure that the NHS is able to provide a high quality of care for the elderly population.
- To ensure that the NHS is able to provide a range of services to meet the needs of the elderly population.
- To ensure that the NHS is able to provide a high quality of care for the elderly population.

The NHS is committed to providing a high quality of care for the elderly population. This commitment is reflected in the following objectives:

- To ensure that the NHS is able to provide a high quality of care for the elderly population.
- To ensure that the NHS is able to provide a range of services to meet the needs of the elderly population.
- To ensure that the NHS is able to provide a high quality of care for the elderly population.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. This includes not only sales and purchases but also any other financial activities that may occur during the course of the business. It is essential to ensure that all records are kept up-to-date and are easily accessible for review.

In addition to maintaining accurate records, it is also important to regularly review the financial statements. This will help to identify any potential issues or trends that may arise over time. By staying on top of the financial situation, you can make informed decisions about the future of the business.

Finally, it is important to seek professional advice when needed. A qualified accountant or financial advisor can provide valuable insights and guidance on how to best manage the business's finances. This can help to ensure that the business is operating in a financially sound and sustainable manner.

Overall, the key to successful financial management is to stay organized, up-to-date, and informed. By following these guidelines, you can ensure that your business is always in a strong financial position.

The second part of the document provides a detailed overview of the various financial statements that a business should maintain. These include the balance sheet, income statement, and cash flow statement. Each of these statements provides a different perspective on the business's financial performance and is essential for a complete understanding of the company's financial health.

The balance sheet shows the company's assets, liabilities, and equity at a specific point in time. The income statement shows the company's revenues, expenses, and net income over a period of time. The cash flow statement shows the company's cash inflows and outflows over a period of time.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

L'objectif de notre étude est de mettre au point un système d'imagerie de fluorescence permettant de discerner les tissus sains des tissus cancéreux.

Le diagnostic peut se faire dans deux situations différentes. Dans le premier cas la fluorescence provient des fluorophores endogènes. Dans le second cas, la fluorescence sera due à la fois au fluorophores endogènes et à un fluorophore exogène.

Cette partie est constituée de quatre chapitres :

- la thérapie photodynamique et les photosensibilisants.
- l'état de l'art sur le diagnostic par autofluorescence.
- les propriétés optiques des tissus.
- les développements instrumentaux existants et la spectroscopie de fluorescence.

Nous donnons le cahier des charges et l'architecture finale de notre système.

CHAPITRE 1 : LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT PHOTODYNAMIQUE

1. Principes du diagnostic et de la thérapie photodynamique (PDT)

La Thérapie Photodynamique (PDT: Photodynamic Therapy) consiste dans un premier temps à administrer un photosensibilisant qui sera préférentiellement retenu par les tissus tumoraux. La zone tumorale est ensuite irradiée par une lumière de longueur d'onde judicieusement choisie (typiquement entre 650 et 800 nm). Le photosensibilisant (PS) absorbe la lumière, et passe de son état stable fondamental à un état singulet excité (PS_1^*). Deux situations peuvent se produire :

- le PS_1^* passe à l'état triplet PS_3 . Le PS_3 peut réagir, avec des substrats ou avec l'oxygène du milieu pour produire des oxydants cytotoxiques provoquant la nécrose tumorale. C'est la PDT proprement dit (réactions photochimiques de type I et de type II (annexe B)).
- le PS peut retourner de l'état singulet (PS_1^*) à l'état fondamental (PS_1) en émettant de la fluorescence. Ce signal est principalement émis à partir de la tumeur, car a priori c'est elle qui retient le PS ; elle devient ainsi visible, pour peu qu'on l'observe avec un système approprié.

Selon les lois de la mécanique quantique, les molécules de PS qui participent à la fluorescence, ne peuvent pas participer aux réactions photochimiques.

2. Historique de la thérapie photodynamique et du diagnostic par fluorescence induite

Le développement des fluorophores exogènes comme marqueurs de tumeurs pour le diagnostic par fluorescence est étroitement associé au développement de la PDT. Les premières expériences menées pour photosensibiliser les tissus ont été réalisées par RAAB en 1899. Les porphyrines faisaient partie des premiers composants naturels utilisés pour sensibiliser les organismes vivants à la lumière visible (Hausmann 1908, Meyer-Betz 1913).[12]

En 1942 FIGGE et al. ont décrit l'utilisation de la lumière ultra violette pour induire la fluorescence des tissus malins. En 1948 FIGGE et al. ont montré la fluorescence des porphyrines et de la métalloporphyrine dans des tissus embryonnaires de souris. En 1955 RASMUSSEN-TAXDAL a observé la fluorescence de l'hématoporphyrine chez dix patients atteints de tumeurs malignes. En 1960 LIPSON et al. ont montré la fluorescence induite par l'Hématoporphyrine dérivée (HpD) chez 29 patients sur des carcinomes

épidermoïdes et ont constaté qu'il n'y avait pas de fluorescence chez 9 patients dont les tissus étaient sains, bénins ou inflammatoires.

En 1979 GOMER et DOUGHERTY ont montré qu'il y avait une corrélation directe entre la fluorescence des tumeurs et leur destruction après sensibilisation avec l'HpD. Les équipes de BENSON (1982) et de TSUCHIYA (1983) examinant les vessies, ont pu vérifier grâce à des études histo-pathologiques que les sites ayant émis une fluorescence après administration de l'HpD, correspondaient à des lésions néoplasiques. En 1984 POTTER et MANG ont montré que la fluorescence des tissus était proportionnelle à la concentration du photosensibilisant (DHE : Dihématoporphyrine Ester) [7][6]. La même année, PROFIO et DOIRON, ont pu détecter des lésions occultes du poumon et des carcinomes *in situ* par la fluorescence de l'HpD.

En ce qui concerne la thérapie, celle-ci a fait l'objet de nombreuses expérimentations sur une grande variété de tumeurs depuis 1976. Au début, le traitement était palliatif mais la tendance actuelle s'oriente vers le traitement des tumeurs précoces avec un objectif curatif.

La PDT (Photo Dynamic Therapy) a trouvé de nombreuses applications pour les lésions cutanées puisqu'elles sont directement accessibles. Citons dans ce domaine : les carcinomes baso-cellulaires, les carcinomes épidermoïdes, le sarcome de Kaposi et les métastases dermiques du cancer du sein. Parmi d'autres indications de la PDT citons : les voies aérodigestives supérieures (langue, larynx, pharynx oesophage, bronches ...) la vessie et les sites gynécologiques. Ces sites sont accessibles par voie endoscopique.[136]

3. Caractéristiques d'un photosensibilisant (PS)

Le choix d'un photosensibilisant se fait à partir des critères suivants :

- pureté : il est préférable d'utiliser un PS pur pour mieux comprendre sa pharmacocinétique et son mécanisme d'action. L'HpD comme sa fraction oligomérique, est un mélange complexe dont l'étude est difficile.
- solubilité : pour être injectés, les PS sont dilués dans un solvant dont le choix dépend de la nature du PS. Dans le sang les vecteurs sont essentiellement l'albumine et les lipoprotéines de faible densité (LDL).
- activité photochimique : un bon photosensibilisant doit être un bon producteur d'oxygène singulet c'est à dire posséder un haut rendement en état triplet.
- absorption dans le rouge : la transmission des tissus est plus importante dans la partie rouge (600-800 nm) que dans le reste du spectre de la lumière visible. Par conséquent, le

photosensibilisant doit avoir une bonne absorption dans cette fenêtre spectrale si on veut induire une nécrose tumorale en profondeur et exciter efficacement le PS. [8]

- sélectivité tumorale : l'affinité *in vivo* dépend probablement de l'activité mitotique : tissus cicatriciels, psoriasiques, embryonnaires ou tumoraux. En effet, les cellules en activité mitotique comptent un grand nombre de récepteurs membranaires aux LDL (Low Density Lipoprotéine). Cette sélectivité pourrait dépendre aussi des anomalies du stroma tumoral, du drainage lymphatique aberrant, d'un PH acide[5]. Le PS est capté préférentiellement dans des tissus reticulo-endothéliaux comme le foie, la rate, les ganglions, la peau. Il n'existe ni PS spécifique, ni vecteur de PS ayant une spécificité pour les tissus cancéreux.

La sélectivité tumorale est mesurée par le ratio de concentration du PS (tumeur/tissu sain), à un certain délai après l'administration du PS. La rétention du PS par la peau induit un risque de photosensibilisation cutanée ; ainsi on recherche des PS dont la vitesse d'élimination par l'organisme est rapide.

4. Les photosensibilisants

La solubilité des PS permet de les classer en trois groupes

- Les photosensibilisants hydrophobes : leurs solubilités dans l'eau et l'alcool est négligeable. Parmi ces PS, on distingue les phtalocyanines (Pc) et les naphtalocyanines (Nc).[4][11]

- Les photosensibilisants hydrophiles : ils sont solubles dans l'eau et l'alcool. Les phtalocyanines sulfonées sont les plus étudiées. Des résultats intéressants ont été obtenus avec ces substances *in vivo* et *in vitro*. [4][11]

- Les photosensibilisants amphiphiles : ils sont solubles dans l'eau ou l'alcool à des PH physiologiques. Les photosensibilisants amphiphiles possèdent une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Ce caractère leur confère une bonne incorporation dans les tissus néoplasiques.

Nous trouvons dans cette classe les phtalocyanines sulfonées (les composés les moins sulfonés (PcS₁ et PcS₂) sont les plus hydrophobes et ont une meilleure activité PDT), les porphyrines et les chlorines.[11]

4.1. Les photosensibilisants de la première génération : les porphyrines

Nous distinguerons les porphyrines endogènes générées par l'organisme soit naturellement soit après administration d'un précurseur exogène comme l'acide δ aminolevulinique (ALA) ou directement de porphyrines exogènes.

4.1.1. les protoporphyrines endogènes

La synthèse de l'hème est contrôlée par un mécanisme en boucle fermée. L'ALA est capable de pénétrer dans les cellules car c'est une molécule de petite taille. Le δ -ALA induit la formation de la protoporphyrine IX (PpIX) qui est un produit intermédiaire qui précède la formation de l'hème dans la réaction intracellulaire appelée cycle de l'hème. L'excès d'hème bloque la production de PpIX : ces deux phénomènes se conjuguent. La PpIX est un photosensibilisant.

KÖNIG et al. [9] ont montré que l'ALA était plus efficace en administration topique.

MARTIN et al. [10] ont étudié l'ALA en application topique sur 16 carcinomes basocellulaires. Cette étude a révélé l'hétérogénéité de la production de la PpIX, laquelle était faible, voire inexistante dans les tumeurs profondes. Il n'y avait pas de sélectivité entre tissu tumoral et épiderme sain.

Notons enfin la recherche effectuée par KRIEGMAIR et al. [13][158] avec une administration intravésicale de l'ALA pour des tumeurs de la vessie. Toutes les tumeurs étaient marquées par une fluorescence dans le rouge, visible à l'oeil nu sous une excitation à 406.7 nm. Ceci a permis de diagnostiquer 26 lésions malignes non détectées en cystoscopie conventionnelle.

L'ALA et la PpIX sont des substances normalement présentes dans l'organisme ce qui diminue le risque de toxicité. L'ALA peut être administrée par voie orale, intraveineuse (i.v.) ou topique. La PpIX possède des propriétés photophysiques très voisines de celles de l'HpD.

4.1.2. L'hématoporphyrine dérivée (HpD)

Cette molécule est obtenue à partir d'un traitement chimique de l'hémoglobine. L'HpD ayant été le premier PS étudié et utilisé, est devenu le PS de référence, sa fraction oligomérique plus active est commercialisée sous le nom de Photofrin®. L'HpD est un composé complexe comprenant des monomères, des dimères et des oligomères. Le DHE (dihématoporphyrine éther) est sa fraction la plus active sur le plan photodynamique.[15]

Les porphyrines ont toutes le même spectre d'absorption, caractérisé par un pic maximum aux alentours de 400 nm et des pics moins importants à 500 nm, 537 nm et 557 nm et 630 nm. Le spectre d'émission présente deux pics : à 670 nm et à 690 nm.

L'HpD a d'abord été testée cliniquement comme marqueur pour le diagnostic en fluorescence sur des patients ayant des tumeurs de l'œsophage et des bronches, puis sur des tumeurs du vagin et de l'utérus (1964-1976). De bons résultats diagnostiques ont été obtenus : les lésions malignes présentaient une fluorescence rouge sous une excitation violette ; depuis d'autres applications se sont succédées. Vers la fin des années 70,

l'utilisation de l'HpD est devenue de plus en plus fréquente surtout à cause de son intérêt thérapeutique en PDT. Vers les années 80, les caractéristiques spectrales de fluorescence de l'HpD ont été précisées, par exemple l'étude de la durée de vie de fluorescence à 16 ns. La distribution intracellulaire de l'HpD a été étudiée par microscopie de fluorescence[14][15]. Cette substance a quelques inconvénients comme la complexité de sa composition et son instabilité chimique, elle émet une faible fluorescence et n'a qu'une faible sélectivité vis à vis des tumeurs malignes, elle provoque une photosensibilisation cutanée pendant plusieurs semaines. Le photofrin ® a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour plusieurs indications dans différents pays.

4.2. Les photosensibilisants de la deuxième génération : les chlorines

Elles ont une meilleure absorption dans le rouge [8], une clairance plus courte, parfois une meilleure affinité tumorale.

4.2.1. Les purpurines : Elles ont une absorption importante à 650 nm. Elles sont caractérisées par une photosensibilisation cutanée plus faible que celle de l'HpD. Le composé le plus actif est le tinocetaethylporphyrine (SnEt₂).

4.2.2. Les Bactériorchlorines : La bactériorchlorophylle a un pic d'absorption important à 780 nm, cependant elle perd facilement son magnésium et elle est sujette au photoblanchiment. En plus, elle n'est pas très sélective. La m-THPBC (bactériorchlorine dérivée de la mTHPC) semble être un bon PS *in vivo* mais a tendance à s'oxyder facilement.

4.2.3. La benzoporphyrine monoacide dérivée A (BPD-MA)

Cette substance est une dérivée des chlorines. Elle possède un pic maximal d'émission à 694 nm (pour une excitation à 450 nm) [162] et un pic maximal d'absorption à 690 nm[161], elle est caractérisée par une clairance rapide dans le sang et un faible délai entre son administration et sa rétention par la tumeur [8]. L'une des études pharmacocinétiques sur le BPD-MA est celle réalisée par RICHTER et al. [4] sur les souris et a conduit à un rapport de sélectivité tumeur/muscle de 2.8, 3 heures après son injection (i.v.). Des essais cliniques sur la peau ont également été menés par LEVY et al. [161] avec des résultats encourageants.

4.2.4. La mTHPC ou méta-tetra(hydroxyphényle) chlorine : C'est un composé synthétique analogue de la méso-tera-phenylporphyrine qui est une porphyrine. C'est une

substance pure, mais la rotation autour de la liaison porphyrine-phényl fait apparaître quatre isomères.

Les spectres d'absorption (figure 4.2.4.1) et de fluorescence (figure 4.2.4.2) comparés de la mTHPC et de l'HpD, mettent en évidence que le pic d'absorption de la mTHPC dans le rouge à 650 nm est supérieur à celui de l'HpD à 622 nm. En ce qui concerne la fluorescence, la mTHPC a un seul pic à 650 nm tandis que l'HpD possède deux pics à 620 et à 680 nm. Le pic à 620 nm de l'HpD est le plus proche de la zone maximale d'auto fluorescence des tissus, par conséquent, il est important de bien supprimer le signal d'auto fluorescence quand on utilise l'HpD comme marqueur fluorescent.

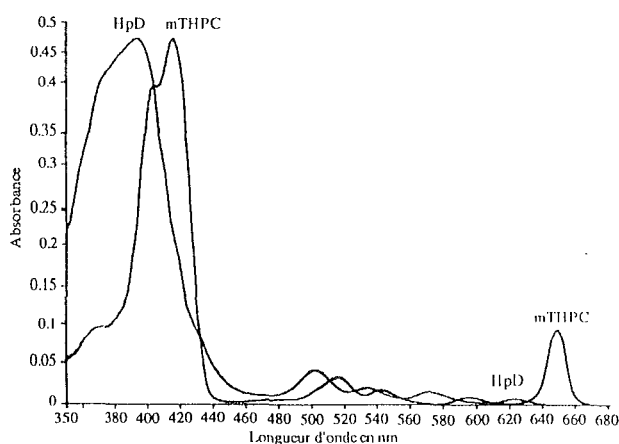


Figure 4.2.4.1 : Spectres d'absorption comparés de l'HpD et de la mTHPC dans du méthanol à 1 µg/ml

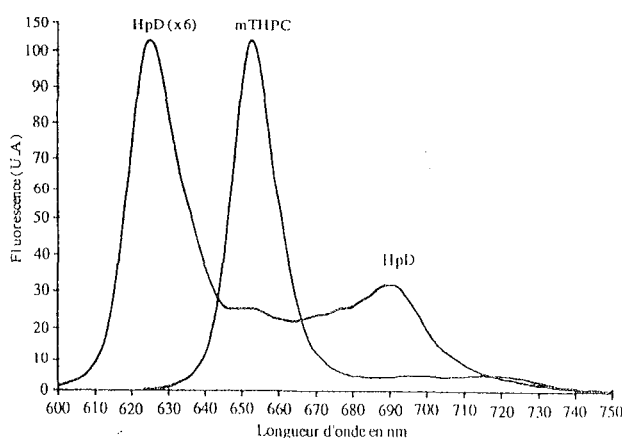


Figure 4.2.4.2: Spectres de fluorescence comparés de l'HpD et de la mTHPC avec 10 % de sérum et à une longueur d'onde d'excitation de 396 nm

Des études de l'activité photodynamique ont été réalisées par BONNETT et al. [3] et par BRAICHOTTE et al. [1] [2] sur des patients. Une sélectivité tumorale de 16, 3 heures après injection (iv) du PS a été observée pour des carcinomes de la cavité buccale. La sélectivité dépendrait du stade carcinologique.

Une autre étude a été effectuée par REZZOUG et al. sur la pharmacocinétique [107. 108. 121] et sur l'efficacité photodynamique de la mTHPC *in vivo* et *in vitro* [109. 110. 121], sur des souris nudes avec des tumeurs greffées et sur des patients. Une autre étude sur des tumeurs induites chimiquement chez l'animal, a été réalisée par BOSSU et al. [111].

Cette drogue fait l'objet d'essais cliniques sur les cancers précoces de l'oesophage[125].

4.2.5. Les Rhodamines

En plus des PS cités plus haut, des rhodamines ont été proposées. Cependant, elles émettent une fluorescence dans une région où l'autofluorescence est importante[12].

Des travaux plus récents ont été menés pour développer des substances non photosensibilisantes pour le diagnostic en fluorescence, les carothenoporphyrins et les chlorines dérivées font partie de ces substances avec lesquelles de bons résultats ont été obtenus[12]. Cette énumération est loin d'être exhaustive et de nouveaux produits sont régulièrement proposés.

5. Conclusion

Nous venons de voir que les molécules de PS qui participent à la fluorescence, ne peuvent pas participer aux réactions photochimiques, ce qui signifie qu'un PS ne peut pas être à la fois optimal pour le diagnostic et la PDT.

La première génération des PS était représentée par l'HpD. Les chlorines (principalement la m-THPC et la BPD-MA), sont caractérisées par :

- un pic de fluorescence décalé vers les grandes longueurs d'onde donc éloigné du signal d'autofluorescence (ce qui facilite la dissociation des deux signaux)
- une meilleure intensité de fluorescence devant laquelle le signal d'autofluorescence pourrait être négligé (aucun besoin de supprimer l'autofluorescence)
- une meilleure sélectivité tumorale qui augmente le contraste entre tumeur et tissu sain en imagerie.

L'ALA est une substance non photosensible induisant la PpIX qui est la molécule photosensible. Son application clinique a donné de bons résultats et notamment lorsqu'elle est appliquée de façon topique. Sa fluorescence est alors si intense qu'elle est visible à l'oeil nu et l'autofluorescence devient négligeable.

Au cours de notre étude, nous nous limiterons à l'usage de l'HpD, de la m-THPC et de la PpIX.

CHAPITRE 2 : LES FLUOROPHORES ENDOGENES

1. Introduction

La fluorescence a été observée en premier par STOKES (1852). En 1911, STÜBEL a reconnu que la fluorescence des tissus (dans l'UV et le visible) pourrait être utilisée à des fins diagnostiques. Cette approche donne parfois un bon contraste tumeur/tissu sain [157]. Beaucoup d'études ont été menées dans le but de connaître l'origine de l'autofluorescence. Plusieurs fluorophores ont été identifiés en utilisant des techniques spectroscopiques, comme les matrices d'excitation et d'émission, la spectroscopie résolue dans le temps, et en comparant les résultats obtenus avec des fluorophores en solution.[12]

Bien que les caractéristiques du signal de fluorescence des molécules présentes dans les tissus soient connues en solution, l'interprétation de leur signal de fluorescence *in-vivo* est encore difficile, à cause de la largeur de leur spectre qui dépend également du micro-environnement et de la superposition des spectres des divers fluorophores.

La spectroscopie résolue dans le temps est l'un des moyens utilisés pour identifier la contribution de chaque fluorophore au spectre global d'autofluorescence en les comparant à leurs spectres isolés obtenus en solution. La microspectrofluorimétrie est également utilisée dans ce but et permet en plus de connaître la localisation exacte du fluorophore dans la cellule ou à l'extérieur de celle-ci.

Tableau 1.1 : Les fluorophores endogènes

fluorophores	Pic d'absorption (nm)	Pic d'émission (nm)	Durée de vie de la fluorescence (ns)
Tryptophane	275	350	2.8 1.5
Collagène	340	395	9.9 5.0 0.8
	270	395	
	285	310	
Elastine	460	520	6.7, 1.4, 7.8, 2.6, 0.5
	360	410	
	425	490	
	260	410	
NADH	350	460	0.6, 0.2
FMN	440	520	4.7
Béta-carotène		520	9.6, 2.0, 0.3
Porphyrines endogènes	400	610	
		675	

FMN : flavine mononucléotide (riboflavine-5-phosphate)

Les principaux fluorophores endogènes sont : le tryptophane, le collagène, l'élastine, le nicotinamide adénine dinucleotide réduit (NADH) et sa forme phosphatée (NADPH), les flavines et les flavoprotéines, le bêta-carotène et les porphyrines endogènes. Le tableau 1.1 représente les principaux fluorophores endogènes, leur pic maximum d'excitation, leur pic maximum d'émission et la durée de vie de leur signal de fluorescence en solution [16].

2. Résultats expérimentaux

Au cours de ces dernières années, plusieurs recherches ont été effectuées dans le but de quantifier et d'identifier les fluorophores endogènes permettant de différencier les tissus sains des tissus tumoraux, soit par leur présence exclusive sur l'un des deux sites à différencier, soit par leurs différences de concentration. Différentes méthodes de mesure ont été considérées. Les types de tumeurs à identifier diffèrent aussi d'une équipe à l'autre.

L'analyse des matrices EEM (Excitation Emission Matrix : Matrices de correspondance entre les longueurs d'onde d'excitation et les pics d'émission de fluorescence) pour les tissus sains et les tissus cancéreux sur des localisations gastro-intestinales et vésicales réalisée par RAVA et al. [22] a permis de considérer l'acide aminé aromatique Tryptophane comme étant à l'origine des pics principaux d'émission du signal d'autofluorescence. D'autres recherches ont montré que le cancer de la vessie affecte le métabolisme du tryptophane. Un autre pic d'E-E (Excitation-Emission) au voisinage de 345 nm, 465 nm détecté dans les voies gastro-intestinales et urinaires est attribué à NADH et NAD(P)H. Enfin, des pics à 430 nm, 600 nm et 430 nm, 630 nm ont été relevés pour les tumeurs de vessie[22].

SCHOMACKER et al. [18] ont analysé le signal d'autofluorescence *in vivo* et *in vitro* pour des lésions du colon et ceci dans le but de comprendre l'influence des fluorophores endogènes incriminés dans la différenciation entre le tissu normal, le tissu néoplasique et le tissu hyperplasique. Une méthode de décomposition spectrale était utilisée pour identifier les réponses séparées du collagène, du NADH et des FAD (flavine adénine dinucléotide). Ces produits sont excités à 337 nm et ont des longueurs d'onde d'émission principale respectives à 394 nm, 445 nm et 533 nm. Les auteurs ont alors constaté que l'intensité de fluorescence du collagène décroît des tissus sains aux carcinomes en passant par les tissus hyperplasiques, puis dysplasiques. Cette décroissance est accompagnée d'une augmentation de l'absorption par l'hémoglobine ainsi qu'une augmentation de la fluorescence du NADH. Ils ont également noté un pic à 680 nm correspondant aux porphyrines endogènes.

KÖNIG et al. ont étudié les porphyrines endogènes de la peau et leur intérêt dans un but diagnostique et thérapeutique [17]. Ils ont montré que les bactérium propinibacterium de l'acné produisent des porphyrines endogènes avec une émission importante dans le rouge à 604 nm, 622 nm et 639 nm, pour une excitation à 407 nm. Ces trois pics correspondent respectivement à ceux du Zn-protoporphyrine (pic d'émission (PE) à 592 nm en solution), de la coproporphyrine (PE à 622 nm) et de la protoporphyrine IX (PE à 632 nm).

Dans une étude en spectrofluorimétrie de la peau, STERENBORG et al.[34] ont incriminé le collagène (du derme) et la kératine (stratum cornéum) comme sources principales de fluorescence (excitation à 375 nm), mais les différences obtenues entre lésions et tissus sains sont statistiquement non significatives.

D'autres investigations ont été menées par BEUTHAN et al. dans le but de quantifier la concentration du NADH [19]. Cette recherche était motivée par l'intérêt de ce co-enzyme qui est un indicateur de l'état métabolique des cellules. Il est donc attendu que sa concentration soit plus importante dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains.

RAMANUJAM et al. [20] ont mis au point un algorithme dans le but de quantifier les fluorophores et les matériaux absorbants qui sont responsables de la différence des spectres entre tissus sains et tissus pathologiques.

Les spectres réels étaient comparés au spectre simulé qui répond à l'équation :

$$S(\lambda_{em}) = \frac{C_1 C(\lambda_{em}) + C_2 E(\lambda_{em}) + C_3 N(\lambda_{em}) + C_4 F(\lambda_{em})}{C_5 [A(\lambda_{exc}) + A(\lambda_{em})] + C_6}$$

où $C(\lambda_{em})$, $E(\lambda_{em})$, $N(\lambda_{em})$, $F(\lambda_{em})$, représentent respectivement l'intensité de fluorescence du collagène, de l'élastine, du NAD(P)H et des FAD à la longueur d'onde λ_{em} , tandis que le dénominateur représente l'atténuation due à l'hémoglobine et l'oxyhémoglobine. Les constantes C_1 à C_5 donnent un poids à chaque composant, alors que la constante C_6 permet d'élargir la bande d'atténuation.

Sachant que le signal de fluorescence change d'un patient à l'autre, une mesure relative de la contribution de chaque fluorophore au spectre de fluorescence d'une lésion par rapport à la valeur moyenne de la contribution de ce même fluorophore dans le tissu sain, était réalisée pour chaque patient.

La différence de fluorescence entre les tissus normaux et anormaux (CIN : Cervical Intraepithelial Neoplasia) du col de l'utérus est rapportée à leurs différences

morphologiques et biochimiques. En effet, l'épaississement de l'épithélium qui accompagne ces tumeurs, masque l'émission de fluorescence des fibres de collagène situées en dessous de ces couches. Cette émission n'est pas atténuée dans les tissus sains dont le signal est par conséquent plus important. Par ailleurs, les CIN sont caractérisés par une importante vascularisation d'où une plus grande atténuation du spectre dans la zone d'absorption de l'oxyhémoglobine en comparaison avec les tissus sains.

GLASGOLD et al. [24] ont réalisé une étude *ex-vivo* en autofluorescence sur des tumeurs oesophagiennes de rats. Cette étude montre une diminution de l'émission de fluorescence à 430 nm pour une excitation à 380 nm. L'explication serait l'épaississement de l'épithélium qui masquerait ainsi l'émission de fluorescence due au collagène des couches inférieures (lamina propria).

RAMANUJAM et al.[21] ont réalisé une étude spectroscopique en autofluorescence *in-vivo* sur 66 cols de l'utérus classés normaux et 49 cols classés pathologiques. Ils ont constaté que l'intensité de fluorescence des tissus sains était plus importante que celle des tissus pathologiques. Plus précisément, la fluorescence des dysplasies de haut grade est plus faible que les zones infectées par l'HPV (Human Papilloma Virus) et enfin l'intensité des HPV est plus faible que celle des inflammations chroniques.

En plus de la différence d'intensité de fluorescence, ils ont constaté qu'il y avait une différence de forme dans les spectres de fluorescence et en particulier des pentes entre 420 nm et 440 nm. Un algorithme a été réalisé à partir de ces données pour proposer une méthode diagnostique.

Une étude *in-vivo* réalisée par DHINGRA et al. [23] pour le diagnostic des cancers précoces des voies aéro-digestives par autofluorescence a révélé une nette différence des spectres de fluorescence des muqueuses normales, bénignes et néoplasiques.

La première différence est une augmentation du signal de fluorescence rouge (640 nm) dans les tissus néoplasiques par rapport aux tissus sains. Elle correspond aux porphyrines endogènes. Les cellules cancéreuses ont une faible concentration en fer et en ferrocyclase (enzyme). Ces substances jouent un rôle important dans le cycle de l'hème. Leur diminution provoque l'augmentation de la concentration de la PpIX dans les tumeurs.

La deuxième différence est la diminution du signal de fluorescence dans le vert dans les tissus néoplasiques en comparaison avec les tissus sains. Elle était ramenée au collagène (excitation à 370 nm) dont l'émission serait partiellement masquée par la prolifération

cellulaire et l'épaississement de la muqueuse dans les zones néoplasiques. Il est aussi probable qu'à $\lambda=370$ nm, la profondeur de pénétration de la lumière soit moindre quand la muqueuse est épaisse et qu'ainsi le signal de fluorescence soit atténué.

Une étude en microspectrofluorimétrie a été réalisée par ANIDJAR et al. sur des cellules humaines urothéliales normales et cancéreuses excitées à 488 nm. Le spectre de fluorescence des cellules saines était plus large que celui des cellules cancéreuses mais présentait le même maximum entre 550 et 560 nm. Cette émission est attribuée aux flavoprotéines qui présentent un décalage de 10 à 30 nm vers les plus grandes longueurs d'onde par rapport aux flavines pures. L'intensité du signal de fluorescence des cellules cancéreuses est plus faible que celle des cellules saines et ceci peut être dû à une plus faible concentration de flavines ou à une plus faible quantité de liaisons flavines-protéines [25].

3. Conclusions

La détection des fluorophores endogènes *in vivo* est influencée par plusieurs facteurs dont la longueur d'onde d'excitation. En effet, les fluorophores dont la longueur d'onde d'absorption maximale est inférieure à la longueur d'onde d'excitation choisie ne seront pas (ou presque pas) détectés. En plus, si la longueur d'onde d'excitation est proche de celle d'un fluorophore dominant, la réponse des autres fluorophores pourrait être masquée.

D'autres méthodes peuvent compléter ces informations.

La méthode des EEMs permet une étude détaillée du site mais demande une longue durée d'exposition ce qui est difficile *in-vivo*. Elle reste cependant une bonne approche expérimentale de sélection d'une ou deux longueurs d'onde d'excitation pour une application rapide.

Notons également que les approches numériques comme la méthode de Monte-Carlo [chapitre 3] souvent utilisée, semble bien indiquée pour dissocier convenablement le signal d'autofluorescence global et attribuer chaque composante à un fluorophore.

La microspectrofluorimétrie a l'avantage de donner des informations quantitatives et spatiales. Cependant les résultats obtenus en *ex-vivo* ou *in-vitro* ne sont pas directement applicables *in-vivo*.

L'analyse des spectres résolus dans le temps bien que difficile à mettre en œuvre pour plusieurs longueurs d'onde d'excitation, devrait apporter des données quantitatives précises

sur les fluorophores endogènes. Ces données ne seront pas influencées par les propriétés optiques des tissus, contrairement à celles obtenues avec les méthodes basées sur la mesure de l'intensité du signal de fluorescence.

A la base de toutes ces études, nous pouvons dire que dans la plupart des cas, l'intensité du signal d'autofluorescence dans le vert des tissus cancéreux est plus faible que celle des tissus sains. Ceci est dû, soit à une diminution de la concentration du fluorophore à la longueur d'onde d'émission considérée, soit à la diminution de l'émission du signal de fluorescence à partir des lésions (à cause d'un épaissement plus prononcé de l'épithélium ou d'une moindre pénétration de la lumière d'excitation).

Nous notons également que le pic dans le rouge dû aux porphyrines endogènes est souvent rencontré dans les lésions cancéreuses.

Le signal d'autofluorescence est également caractérisé par des vallées aux zones d'absorption de l'hémoglobine et de l'oxyhémoglobine. Ces vallées modifiant le signal, pourraient faire croire à des pics d'autofluorescence qui en fait n'existent pas.

Le signal d'autofluorescence est influencé par les propriétés optiques des tissus.

Notons également que la présence de fluorophores dépend du type du tissu, et les études réalisées sur différents sites incriminent différents fluorophores, certains étant présents partout.

CHAPITRE 3 : PROPRIETES OPTIQUES DES TISSUS

1. Introduction

La spectroscopie et l'imagerie des tissus en autofluorescence ont pour objectif d'améliorer le diagnostic des tumeurs. Les tissus biologiques sont des milieux hétérogènes et comprennent des substances diffusantes, absorbantes et fluorescentes. Les photons à l'intérieur de ces milieux seront alors sujet à ces phénomènes qu'ils proviennent de la source d'excitation ou des sources d'émission. Les processus d'absorption et de diffusion entraînent une distribution non uniforme de la lumière d'excitation et une émission de fluorescence dont la provenance et l'efficacité de la transmission jusqu'au détecteur est différente d'un point à l'autre. L'allure du signal d'autofluorescence macroscopique peut être différente du spectre intrinsèque des fluorophores du tissu. Il en sera de même pour l'image de fluorescence macroscopique. La modélisation de la propagation de la lumière dans les tissus peut améliorer la maîtrise de ces processus et l'interprétation du diagnostic *in vivo* en spectroscopie et en imagerie.

Pour cela, nous rappelons dans ce chapitre, les propriétés optiques des tissus en considérant les caractéristiques de la propagation de la lumière dans ces milieux.

2. Caractéristiques générales de la propagation de la lumière dans les tissus

La distribution de la lumière dans les tissus peut être estimée à partir d'un modèle mathématique en utilisant les propriétés optiques mesurées, ou calculées à partir de mesures directes invasives ou non invasives.

2.1. La réflexion

Le saut d'indice important entre l'air ($n_1=1$) et le tissu ($n_2=1,3$ à $1,5$) provoque une réflexion spéculaire à l'interface air-tissu. Le pourcentage de l'énergie incidente qui sera réfléchi peut atteindre 25 % pour une lumière bleu-vert. Les couches tissulaires sous-jacentes à l'interface présentent elles aussi des sauts d'indice et contribuent à la rétro-réflexion.

La réflexion décroît avec la longueur d'onde, ainsi le stratum corneum ne réfléchit que 5 à 7% du rayonnement dans le rouge et l'infrarouge. Cependant, les muqueuses examinées sont souvent recouvertes d'un enduit naturel hautement réfléchissant comme la salive, de telle sorte que la réflexion spéculaire peut atteindre 50% du rayonnement incident.

La fraction restante de la lumière qui va pénétrer dans le tissu sera atténuée par absorption et par diffusion selon la loi de Beer-Lambert :

$$E(z) = E_0(1 - R) \exp - (\mu_a + \mu_s)z = E_0(1 - R) \exp - \mu_t z$$

μ_a et μ_s sont respectivement les coefficients d'absorption et de diffusion et μ_t est le coefficient linéique d'atténuation totale. L'inverse de μ_t est la profondeur de pénétration définie comme étant la distance par rapport au point zéro où on observe une réduction de 63% de l'irradiance de la lumière initiale.[52]

2.2. L'absorption

L'absorption est très structurée spectralement (elle varie fortement avec la longueur d'onde). La connaissance des spectres d'absorption des chromophores biologiques des tissus est importante pour définir l'absorption globale dans le tissu en fonction de la longueur d'onde.

Les protéines qui constituent 15 à 20 % des cellules présentent un pic d'absorption dans l'UV (280 nm), de ce fait les profondeurs de pénétration dans l'UV sont très faibles (quelques microns).

Les grosses molécules organiques ont une forte absorption dans un domaine qui s'étend de l'UV au vert. L'hémoglobine et la mélanine sont absorbants dans le visible. Notons que l'hémoglobine semble avoir un rôle important dans la propagation de la lumière *in vivo* pour des longueurs d'ondes qui sont utilisées pour la PDT [55, 52]. L'oxyhémoglobine (HbO₂) possède un pic d'absorption à 400 nm et peut absorber jusqu'à 800 nm. La mélanine (responsable de la pigmentation de la peau) absorbe de l'UV jusqu'au proche IR (Infrarouge).[52]

Enfin, l'eau est le chromophore le plus important dans le domaine IR.[52]

2.3. La diffusion

La diffusion dans les tissus est une diffusion de Mie puisque la taille moyenne des diffuseurs est du même ordre de grandeur que la longueur d'onde de la lumière. Le coefficient de diffusion décroît de façon monotone avec la longueur d'onde. Il est compris entre 10 et 100 mm⁻¹ pour les tissus mous. La diffusion dans les tissus est fortement anisotrope avec une valeur moyenne de l'angle de diffusion comprise entre 0,7 et 0,99. La distance moyenne entre deux diffusions est comprise entre 0,05 et 0,2 mm.[52]

3. Simulation de la propagation de la lumière dans les tissus

La connaissance de la distribution spatiale et des caractéristiques optiques de toutes les structures qui constituent les tissus examinés sont nécessaires pour connaître la distribution spatiale de la lumière (excitation ou émission) dans le tissu. Ceci étant irréalisable, des modèles approchés des tissus humains ont été mis au point pour avoir une estimation convenable de la dose de lumière répartie dans le tissu irradié.

Dans le modèle considéré, le tissu est supposé être un matériau absorbant composé de particules diffusantes réparties de façon aléatoire. Quant à la lumière, elle est représentée soit par un flux d'énergie continu dont la propagation est décrite par la théorie de transport (modèle analytique), soit comme un flux de particules discrètes (les photons) et sa propagation est décrite par une méthode de simulation dite de Monte-Carlo (modèle numérique).

3.1. Equation de transfert - approximation de la diffusion

Cette théorie permet de donner une description relativement précise de la propagation de la lumière dans les tissus et ceci en assimilant la propagation de la lumière à un processus de diffusion. Elle s'applique à un milieu hautement diffusant pour lequel $\mu_a \ll \mu_s(1-g)$, (g étant le facteur d'anisotropie qui est égal à la valeur moyenne du cosinus de l'angle de diffusion) ce qui est le cas des tissus biologiques dans le visible et le proche infrarouge.

Dans le cas particulier où l'émission laser est supposée plane (le faisceau laser large et collimaté, tombe en incidence normale sur le tissu), le taux de fluence le long de l'axe z passant par le centre du faisceau est donnée par :

$$\Phi(z) = A \cdot \exp(-\mu_{eff} \cdot z)$$

où μ_{eff} est appelé coefficient d'atténuation effectif qui est défini par :

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

et la profondeur de pénétration δ_{eff} est égale à $1/\mu_{eff}$.

PROFIO et al. [59] ont publié leurs travaux sur la quantification d'un photosensibilisant au cours d'un traitement photodynamique en appliquant la théorie de la diffusion simplifiée en considérant le cas où la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission ont des valeurs rapprochées.

3.2. La méthode de Monte-Carlo (MC)

Le modèle MC a été très efficace dans la prédiction de la distribution de la fluence de la lumière dans les tissus et a amélioré la dosimétrie utilisée à des fins thérapeutiques. C'est une méthode de nature statistique qui fait appel à un grand nombre de valeurs aléatoires.

Elle consiste à simuler le parcours d'un grand nombre de photons définis par une position spatiale et une direction de propagation. Un photon peut subir une diffusion provoquant un changement de direction, une absorption ou une réflexion sur les frontières du milieu. Cette méthode est flexible mais nécessite du temps de calcul.

Plusieurs travaux ont été réalisés en se basant sur cette méthode : citons à titre d'exemple l'approche de ZENG et al.[54] pour laquelle le tissu est supposé avoir une géométrie cylindrique et un flux de fluorescence F sortant de la surface de la peau décrit par la formule suivante :

$$F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, r) = \int_0^D \int_0^{2\pi} \int_0^\infty \Phi(\lambda_{ex}, r', z', \theta') \beta(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, z') E(\lambda_{em}, \sqrt{r^2 + r'^2 - 2rr' \cos \theta'}, z') r' dr' d\theta' dz'$$

où λ_{ex} et λ_{em} sont respectivement les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ; Φ est la distribution de la fluence de la lumière d'excitation dans le tissu ; β est le coefficient intrinsèque de fluorescence ; E est la fonction de la distribution de la fluorescence arrivée à la surface en provenance d'une profondeur z .

Dans la simulation MC, la trajectoire pas à pas des photons dans le tissu est calculée par ordinateur suivant les coefficients μ_s , μ_a et g . A chaque point d'interaction la fraction $\mu_a/(\mu_a+\mu_s)$ du poids du photon est déposée dans le tissu. Le poids du photon peut être perçu comme sa probabilité de déplacement dans le milieu de telle sorte qu'à chaque interaction sa future probabilité de mouvement est diminuée.

Dans cette simulation, un photon est suivi jusqu'à ce qu'il sorte du tissu ou jusqu'à ce que son poids soit inférieur à un seuil fixé. Le programme réalisé par cette équipe a permis de constater que seuls le stratum corneum et le derme supérieur ($z < 500 \mu m$) reçoivent des doses de lumière suffisantes pour contribuer au signal de fluorescence mesuré *in vivo* pour une excitation à 442 nm.

La fluorescence mesurée à la surface du tissu et provenant d'une profondeur z notée : $E(\lambda_{em}, r, z)$ est également obtenue par simulation MC pour $\lambda_{em} = 520$ nm. Il en résulte que la fluorescence provenant du stratum corneum est 30 fois plus importante que celle provenant de la partie supérieure du derme papillaire.

Par ailleurs, il est possible de connaître la contribution du signal de fluorescence de chaque couche cellulaire, comprise entre les profondeurs z_1 et z_2 . Ceci est donné par :

$$F_{\text{conceh}(z_1 \dots z_2)} = \int_{z_1}^{z_2} \Phi(z) \beta(z) E(z) dz$$

Ainsi, 86 % du signal d'autofluorescence *in vivo*, proviennent du derme supérieur et 14% du stratum corneum. Ces résultats sont compatibles avec ceux cités plus haut, dans le cas d'un modèle de tissu de la peau à sept couches.

4. Mesures expérimentales

Deux approches peuvent être considérées pour l'évaluation des paramètres optiques des tissus. La première consiste à faire des mesures interstitielles *in-situ* à l'aide de capteurs plus ou moins invasifs et la seconde consiste à calculer ces paramètres optiques à partir d'approximations des modèles analytiques ou numériques de la propagation de la lumière dans les tissus. La plupart des travaux publiés porteront sur les deux approches en même temps.

Nous allons présenter quelques études qui ont abouti à la détermination des paramètres optiques des tissus avec ces deux approches.

ZENG et al. [54] ont construit un modèle de la peau humaine de deux millimètres d'épaisseur, avec sept couches tissulaires en se basant sur les résultats de la bibliographie et sur leurs propres mesures en MicroSpectrophotométrie (MSP).

Tableau 4.1 : Modèle de la peau

Couche	d (μm)	n	g		μ_a (cm^{-1})		μ_s (cm^{-1})	
			442 nm	520 nm	442 nm	520 nm	442 nm	520 nm
Air		1.0						
Stratum Corneum	10	1.45	0.9		190		2300	
Epiderme	80	1.4	0.75	0.77	56	40	570	570
Derme Papillaire	100	1.4	0.75	0.77	6.7	5	700	500
Plexus Sanguin supérieur	80	1.39	0.77	0.79	67	24.5	680	500
Derme réticulaire	1500	1.4	0.75	0.77	6.7	5	700	500
Plexus sanguin profond	70	1.34	0.96	0.96	541	181	520	500
Derme	160	1.4	0.75	0.77	6.7	5	700	500
Gras soucutané		1.46						

Le tableau 4.1 fournit pour chaque couche, son épaisseur d , son indice n et ses paramètres de transport g (facteur d'anisotropie), μ_a (coefficient d'absorption) et μ_s (coefficient de

diffusion) lesquels sont donnés pour deux longueurs d'onde 442 nm (correspondant à la longueur d'onde d'excitation) et 520 nm (correspondant à la longueur d'onde principale de l'émission du signal d'autofluorescence).

La fonction $\beta(z)$ qui représente le coefficient intrinsèque de fluorescence β en fonction de la profondeur z , est estimée à partir des images de fluorescence et des spectres de fluorescence des couches tissulaires. Sa valeur moyenne dans le derme supérieur est 7.5 fois plus importante que dans le stratum corneum, tandis qu'elle est négligeable dans l'épiderme.

Une autre étude basée sur des mesures spectroscopiques *in-vitro* et sur la modélisation Monte Carlo des tissus bronchiques a été reportée par QU et al. [56]. Dans cette étude, les tissus des bronches étaient modélisés sur trois couches : l'épithélium (50 μm d'épaisseur en moyenne pour l'épithélium sain et 70 μm pour les dysplasies), la sous muqueuse ($\cong 700 \mu\text{m}$) et le cartilage ($\cong 1.2 \text{ mm}$). Les mesures spectroscopiques réalisées *in-vitro* sur des couches de 10 à 15 μm d'épaisseur (de façon à éviter la diffusion et la réabsorption) ont conduit aux conclusions suivantes : les intensités de fluorescence pour l'épithélium, la sous-muqueuse profonde, et le cartilage sont respectivement de 0.04 ± 0.01 , 1 , 0.26 ± 0.02 , 1.25 ± 0.17 . Ces valeurs sont normalisées par rapport à la fluorescence de la sous-muqueuse supérieure. Par ailleurs, la fluorescence (provenant surtout de la sous-muqueuse supérieure) détectée à la surface n'est pas nettement différente entre tissu sain et CIS (Carcinome In Situ). Ces mesures ont été faites après élimination du sang.

La simulation MC a permis de constater que la majorité des sources de fluorescence *in-vitro* se situent dans la sous-muqueuse supérieure. En effet, la sous-muqueuse inférieure ne fluoresce pas beaucoup et le cartilage, riche en fluorophores, ne reçoit qu'une faible dose de la lumière d'excitation (à 442 nm). De même, *in-vivo*, la fluorescence provenant de la sous-muqueuse profonde et du cartilage est négligeable dès que la proportion de sang présent dépasse 3%. Les propriétés optiques des trois couches ont été mesurées à 442 nm (excitation), 500 nm (autofluorescence), 577 nm (absorption de l'hémoglobine), et 633 nm (pic des porphyrines endogènes). Dans ces trois régions spectrales, les propriétés optiques des tissus sont différentes. Cependant, le rapport de la fluorescence à 577 nm et à 630 nm par rapport à la fluorescence à 500 nm est pratiquement constant, dans un rayon de détection inférieur ou égale à 0.5 mm. La mesure du signal de fluorescence ainsi faite est presque indépendante des propriétés optiques des tissus. Ceci a conduit au développement d'un outil spectroscopique répondant à ce critère.

Par ailleurs, PRAHL et al. [53] ont utilisé un spectrophotomètre pour mesurer la transmission et la réflexion à partir d'échantillons d'aorte (épaisseur de 25 à 300 μm). Trois mesures sont effectuées : la transmission collimatée, la transmission diffuse et la réflexion diffuse, et ceci pour une longueur d'onde d'excitation comprise entre 200 nm et 2200 nm. La mise en oeuvre de cette technique est difficile à cause de la faible épaisseur des échantillons, nécessaire pour éviter de multiples diffusions.

Une autre étude sur l'aorte a également été réalisée par KEIJER et al. [60], par spectrophotométrie de fines couches (10 μm), de chacune des trois couches de l'aorte l'intima (endothélium), la média (couche composée d'élastine de collagène et de muscle) et l'adventice (composée de fibres de collagène). Les spectres des coefficients d'absorption et de diffusion ainsi que le cosinus moyen de diffusion étaient représentés (de 300 nm à 800 nm). Le coefficient intrinsèque de fluorescence était calculé ; il était important pour la média (élastine) comparé à celui de l'adventice et de l'intima qui avaient des spectres similaires.

Une étude en microscopie de tranches minces (5 μm) de colon, suivie d'une modélisation de la fonction de fluorescence détectée à la surface a également été reportée par ZONIOS et al. [58]. Le but recherché est de mieux comprendre les raisons de la différence de fluorescence entre tissu sain et tissu adénomateux du colon. La fonction de fluorescence (spectre simulé) est composée de trois termes : la forme intrinsèque de chaque fluorophore dans le tissu obtenue par microspectrofluorimétrie, la densité de fluorescence obtenue par microscopie de fluorescence et la fonction de transfert qui gouverne la propagation de la lumière dans les tissus et qui dépend de l'absorption et de la diffusion déterminée par la méthode Monte Carlo. Le modèle permet de prédire le spectre de fluorescence du site. Il en résulte que 40% de la différence de l'intensité de fluorescence entre tissu sain et tissu adénomateux est due à la différence de fluorescence de la sous-muqueuse tandis que 60% de cette différence est due à une faible fluorescence de la lamina propria des tissus adénomateux et une plus grande absorption due à l'hémoglobine.

D'autres techniques ont été développées pour des applications *in vivo* [120]. Un des moyens d'y parvenir est d'employer un capteur à base de fibres optiques dont l'une est excitatrice et est au contact du tissu et les autres fibres placées à différentes distances du tissu, permettent de collecter la lumière rétrodiffusée. Dans une autre étude, un capteur destiné à la dosimétrie de la lumière dans les tissus a été décrit par LILGE et al. [57]. Ce dernier est construit pour être le moins invasif possible, son diamètre extérieur est seulement de 170

μm ; il comprend une fibre optique liée par polymérisation à une cavité vide puis à une cavité comprenant un fluorophore, lequel, une fois excité, émet une fluorescence dont la quantité est liée à la dose de lumière reçue. Il permet donc de mesurer la distribution de la lumière dans les tissus de façon isotropique, ce qui aboutit au calcul des coefficients d'absorption et de diffusion des tissus.

Une autre méthode décrite par STRAIGHT et al. [61] est basée sur l'utilisation d'une caméra CCD refroidie. Cette dernière permet de mesurer la distribution de la lumière d'excitation et de la fluorescence dans les tumeurs. La méthode de détection n'est pas invasive mais l'illumination du site se fait de façon interstitielle.

L'un des principaux problèmes rencontrés avec les mesures non invasives est l'impossibilité de les comparer avec les mesures invasives dans le cas où les couches tissulaires sont fines [55].

5. Conclusions

Nous venons de décrire les propriétés générales de la propagation de la lumière dans les tissus biologiques. Les principaux résultats obtenus par différentes équipes sur différents types de tissus et selon différentes méthodes ont alors été reportés.

En conclusion, les principaux phénomènes observés dans les tissus à la suite de différentes expérimentations et qui déterminent la distribution de la lumière *in vivo* sont :

- Pour la plupart des tissus et des organes, l'absorption dans le spectre visible et en particulier dans le rouge est faible comparée à la diffusion.
- La diffusion de la lumière est principalement anisotropique.
- La lumière est fortement absorbée par le sang *in vivo*.
- Les effets de l'indice de réfraction sont importants aux frontières. [55]

Par ailleurs :

- Les tissus biologiques ne sont pas homogènes et sont plutôt anisotropes. Cependant on suppose souvent que les tissus sont homogènes et isotropes, même si l'anisotropie de la diffusion est prise en compte.
- Les propriétés optiques mesurées en *ex-vivo* (souvent effectuées sur des fines tranches de tissus), sont difficilement transposables *in-vivo*. A titre d'exemple, les coefficients d'absorption et de diffusion du derme humain mesurés *in-vivo* étaient considérablement plus faibles que ceux mesurés en *ex-vivo*.
- Les mesures non invasives *in-vivo* ne peuvent pas être réalisées sur tous les tissus et sont limitées aux couches superficielles des organes creux (par spectroscopie ou par imagerie), à l'exception de quelques applications en infra-rouge [55].

CHAPITRE 4 : TRAVAUX ANTERIEURS

1. Spectroscopie de fluorescence

Durant ces dernières années, la spectroscopie est devenue un thème de recherche clinique ayant pour objectif le développement d'une technologie non invasive pour l'étude des tissus, qu'il est convenu d'appeler « biopsie optique ». Le résultat attendu est une *signature spectrale in-situ* non invasive et en temps réel du site examiné : le spectre optique du tissu contient des informations sur la composition biochimique et la structure du tissu. Les informations biochimiques peuvent être obtenues en mesurant le signal d'absorption, la fluorescence ou la diffusion Raman. Les informations structurales ou morphologiques peuvent être obtenues par des techniques basées sur les propriétés de diffusion des tissus. Ces différentes techniques pourraient être utiles pour le diagnostic des cancers[78]. C'est la spectroscopie de fluorescence induite par la lumière LIFS (Light Induced Fluorescence Spectroscopy) que nous allons considérer.

Les systèmes LIFS ont une architecture (figure 1.1) qui comprend :

- une ou plusieurs sources d'excitation (lasers ou source de lumière blanche filtrée),
- un ou plusieurs véhicules de la lumière (fibres optiques ou autres) de la source d'excitation au site et du site vers le détecteur,
- un analyseur optique qui reçoit en entrée le signal de fluorescence lumineux et qui délivre en sortie un signal électrique analogique ; les étapes intermédiaires sont la dispersion de la fluorescence sur l'échelle des longueurs d'onde souhaitables (au moyen d'un prisme ou d'un réseau) et l'exposition des éléments sensibles photoélectriques à ce spectre lumineux. Ces derniers fourniront alors un courant électrique proportionnel à la lumière reçue pour chaque longueur d'onde (spectre électrique),
- un convertisseur analogique/numérique (PC + interfaces).

L'étape qui suit la digitalisation des spectres est leur affichage après calibration de l'appareil par rapport à une source dont le spectre est connu (cette opération se fait une seule fois).

Le traitement du signal consiste à débruiter le signal, et à normaliser les intensités arbitraires en unités relatives ou absolues.

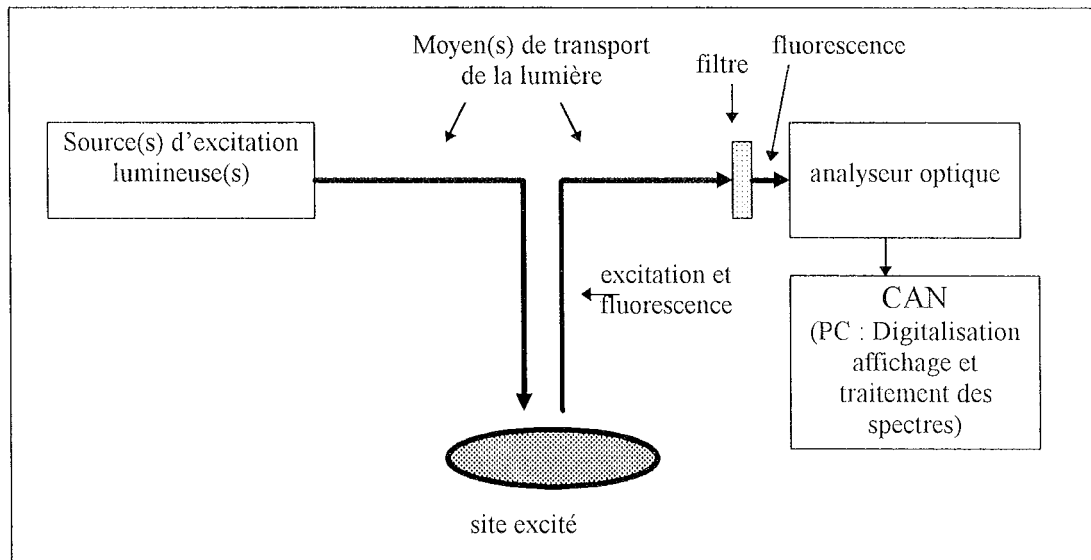


Figure 1.1: Schéma simplifié d'un système de spectroscopie de fluorescence

1.1. Source de lumière

Le choix de la source de lumière est influencé par la (ou les) longueur(s) d'onde d'excitation désirée(s). Pour les premiers systèmes, on utilisait un laser avec une seule longueur d'onde d'émission dans l'UV ou dans le violet. En effet, les détecteurs étaient moins sensibles et le signal de fluorescence, pour être détecté, devait être important. Par la suite, l'usage des sources de lumière blanches filtrées est devenu courant [24, 70, 71, 72, 73, 130]. Par ailleurs, l'excitation laser est soit pulsée [9, 66, 47, 23, 22, 64, 129, 68, 42, 69, 35, 20, 75, 44, 20, 21] soit continue [62,63,56]. Dans le premier cas, l'échantillon ou le site à examiner n'est pas longtemps illuminé, ce qui réduit le photoblanchiment. Les sources de lumière pulsées, sont préconisées pour l'analyse temporelle de la fluorescence, de façon à obtenir des spectres résolus dans le temps. Ces derniers donnent des informations qualitatives et quantitatives sur les fluorophores responsables du signal de fluorescence ou sur l'activité photodynamique d'une drogue [66, 47, 67, 74, 76]. Une excitation pulsée permet également de minimiser la durée d'exécution surtout s'il s'agit de générer les matrices EEM (Excitation Emission Matrix). Cette approche qui consiste à mesurer l'émission de fluorescence pour toute une série de longueurs d'onde d'excitation, est une étape d'analyse et d'identification des sources fluorescentes, à la suite de laquelle un outil de spectrofluorimétrie simple peut être développé en considérant une longueur d'onde d'excitation [23, 22, 34, 71, 70, 72], parfois deux longueurs d'onde [80].

1.2. Le capteur

La deuxième composante des spectrographes est la « sonde » qui véhicule la lumière d'excitation et la fluorescence. Dans les premiers systèmes le transport de la lumière se faisait au moyen de miroirs à réflexion totale et/ou partielle et de filtres [64, 129, 68]. Par la suite des sondes utilisant des fibres optiques se sont développées. Leur nombre est influencé par l'encombrement maximal toléré, par la géométrie d'illumination désirée et les couches tissulaires à analyser. Ainsi, pour des capteurs couplés à des outils endoscopiques, le nombre de fibres est réduit par rapport aux capteurs utilisés pour des applications externes (peau...). Certains capteurs n'ont qu'une seule fibre qui permet à la fois de transmettre la lumière d'excitation et l'émission de fluorescence, en sens inverse, moyennant l'utilisation d'un filtre dichroïque [63, 130, 34, 133, 65, 134, 71, 73]. Une autre configuration consiste à avoir deux fibres optiques, l'une pour l'excitation et l'autre pour l'émission [62, 81, 42]. Dans le cas où l'encombrement n'est pas gênant (mesures effectuées sur des sites accessibles comme la peau, les pièces opératoires,...) le capteur est composé d'une fibre excitatrice centrale et d'un ensemble de fibres périphériques (moyenne 6) placées symétriquement et destinées à la collection de la fluorescence [21, 20, 34, 75, 9, 69, 35, 23]. La dimension du capteur est parfois le résultat de la modélisation de la transmission de la lumière (excitation ou émission) par les tissus, de façon à minimiser l'erreur introduite par les propriétés optiques du tissu [56].

1.3. Le spectrographe

Le module de dispersion et de conversion du signal de fluorescence comprend une barrette de diodes intensifiées ou une CCD refroidie (conversion lumière-électricité) et un OMA (Optical Multichannel Analyser) (séparation et digitalisation). Les spectres ainsi obtenus sont stockés sur un PC.

La calibration de l'appareillage vis à vis de l'axe des abscisses (longueur d'onde de la lumière en corrélation avec les longueurs d'onde affichées) se fait en considérant le spectre d'une source de lumière connue comme une lampe à mercure ou une lampe à tungstène [62, 63, 64, 130, 34, 71, 65, 46].

Le débruitage se fait en supprimant le signal de fond et en moyennant plusieurs spectres pour chaque mesure [23, 34, 123, 62].

Puisque le résultat dépend de la position du capteur, la mesure se fait, dans la plupart des cas, au contact du site ou à une distance fixe [62, 63, 23, 46]. Des corrections sont apportées aux spectres mesurés de façon à minimiser l'erreur due à la variation de l'excitation [81].

1.4. Normalisation

Les intensités des spectres sont données en unités arbitraires. Pour assurer une étude comparative correcte, les chercheurs ont recours à différents moyens de normalisation. Dans la plupart des cas les intensités spectrales sont comparées à celles d'une source fluorescente connue (comme la Rhodamine) [130, 23, 22, 64]. Un autre moyen consiste à normaliser les spectres par rapport au pic maximal [23, 70, 24], cette solution est utile lorsque le diagnostic est basé sur la comparaison de l'intensité de fluorescence des tissus sains et des tissus pathologiques [63] (analyse en autofluorescence), ou sur la comparaison de l'intensité de fluorescence d'une drogue (retenue principalement par le tissu pathologique) par rapport à la fluorescence native [23]. La normalisation se fait parfois par rapport à l'excitation [75] ou à la réflectance [133], ou par un rapport de fluorescence à deux longueurs d'onde si le résultat est corrélé à l'état pathologique [80, 68, 77]. Les techniques basées sur le rapport de fluorescence (dans le cas du diagnostic par autofluorescence) ont été critiquées lorsqu'il a été vérifié que l'autofluorescence dépendait de l'état pathologique des tissus [62].

1.5. Spectres résolus dans le temps

Une autre approche basée sur la mesure de la durée de vie de la fluorescence au lieu de son intensité, permet d'avoir des résultats indépendants des paramètres de mesure et des propriétés optiques des tissus. Les deux principales techniques sont l'acquisition déclenchée avec un certain retard (time gated fluorescence) [66, 47, 67] ou le décalage de phase [76].

1.6. Objectif

L'objectif de toutes ces mesures est la discrimination des zones tumorales. Deux cas de figure se présentent alors :

- le diagnostic par l'intermédiaire d'un fluorophore exogène comme la mTHPC [125] ou l'HpD [65, 44, 133, 64, 42], ou autres [75, 76, 130, 46]. L'objectif visé est la quantification du photosensibilisant dans les tissus de façon à fournir un rapport de sélectivité tumeur/tissus sains, ce qui permet d'identifier les tissus pathologiques et de déterminer la fenêtre thérapeutique.

- le diagnostic par autofluorescence [62, 63, 23, 22, 34, 71, 70, 20, 24, 123, 129, 80].

Le signal d'autofluorescence est, à lui seul, intéressant pour différencier les tissus sains des tissus malades. Les différences spectrales et les différences de l'intensité de fluorescence sont étudiées. Mais la différence spectrale peut dépendre de la géométrie d'illumination et de la géométrie du site [56].

1.7. Le système du CAV

Considérons à présent le système de spectroscopie de fluorescence développé à Nancy au Centre Alexis VAUTRIN et que nous avons utilisé au cours de cette étude.

La figure 1.2 représente le schéma synoptique de ce système.

Il comprend :

- une source de lumière blanche xénon 300 W associée à un ensemble de filtres passe bande de façon à fournir des excitations à 400 nm, 410 nm et 480 nm.
- un spectrographe CP 200 (Jobin Yvon) qui permet de séparer la lumière captée selon ses composantes monochromatiques et de la transformer en grandeurs numériques (conversion de la lumière en charges électriques par une CCD, puis conversion analogique-numérique). Les données ainsi obtenues sont stockées en mémoire vive ou dans un support non volatile d'un PC et affichées sous forme de courbes (logiciel Spectra Max).
- une sonde à base de 3 fibres optiques. La première fibre placée au centre a un diamètre de 500 μm et permet la transmission de la lumière d'excitation vers le site et les deux autres fibres sont identiques avec un diamètre de 200 μm . L'une transmet le signal de fluorescence en étant couplée à l'entrée du spectrographe via un filtre passe-haut qui permet de supprimer une partie de la lumière d'excitation. L'autre est connectée à un puissance-mètre dont la valeur affichée est utilisée pour la normalisation des spectres de fluorescence.[107][113][122]

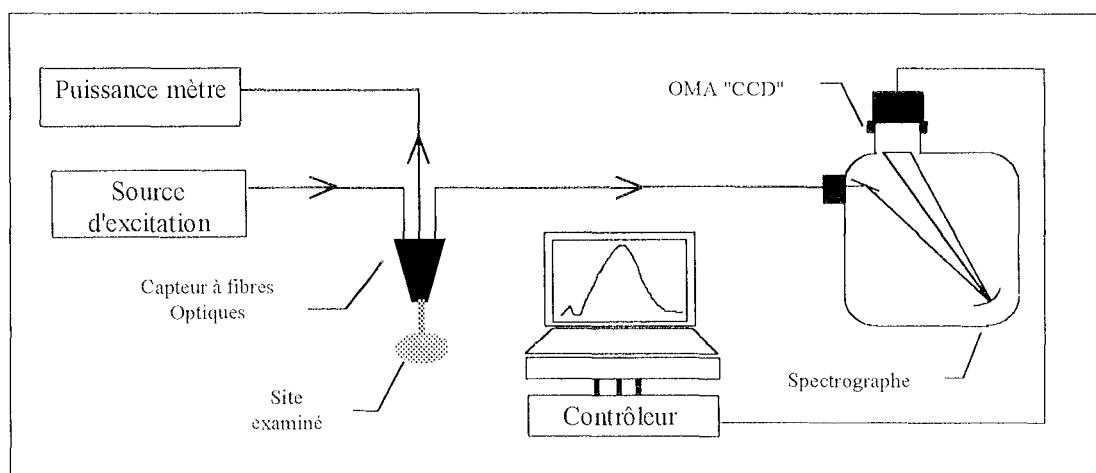


Figure 1.2 : Schéma du spectrofluorimètre du CAV

Le système a une grande sensibilité grâce à un refroidissement des CCD par l'azote liquide. Cependant une plus grande sensibilité peut être obtenue en augmentant le temps d'intégration des photons sur le capteur.

La calibration des spectres se fait par rapport au spectre connu d'une lampe à mercure.

Le principe de la normalisation (changement d'échelle) est le suivant : une partie de la lumière d'excitation est captée par les CCD, son intensité représentée dans le spectre d'émission de fluorescence en unités arbitraires est connue en nW (mesurée par le puissance-mètre couplé à l'une des fibres de la sonde). Cette valeur correspond à un facteur près (transmittance du filtre à la longueur d'onde d'excitation), à la puissance d'excitation rétrodiffusée du site fluorescent. L'intensité de fluorescence à chaque longueur d'onde est alors obtenue en μ W, en multipliant chaque intensité arbitraire par un facteur égal au rapport du pic d'excitation rétrodiffusée (en unités arbitraires) sur le produit de sa puissance mesurée et de la transmittance du filtre passe-haut. L'inconvénient de cette opération est que la lumière d'excitation à 410 nm n'est pas absorbée de façon équivalente par les tissus sains et pathologiques, mais ce phénomène est informatif par lui même.

Ce système a été testé *in-vivo* pour le diagnostic des tumeurs des voies aéro-digestives, des bronches et de la vessie, avec et sans photosensibilisant (mTHPC). Il a également permis l'étude de la pharmacocinétique et de l'efficacité photodynamique de la mTHPC et de l'HPD sur différents types de tumeurs [111],[114].[119].

2. Imagerie de fluorescence

2.1. Introduction

Les dispositifs de diagnostic par imagerie LIF (Light Induced Fluorescence) que nous avons considérés sont associés (ou ont pour objectif de s'associer) à des applications oncologiques cliniques. Le site à visualiser est accessible directement (peau, cavité buccale...) ou par voie endoscopique (oesophage, vessie, bronches...).

L'architecture de base d'un tel dispositif est représentée par la figure 2.1.1

Cette architecture simplifiée représente :

- une source de lumière monochromatique excitatrice (un laser),
- une source de lumière blanche pour l'illumination standard,
- un moyen optique (fibres optiques) couplé à un outil endoscopique pour véhiculer la lumière vers le site et un autre pour transporter le signal réfléchi et émis vers les détecteurs (caméras),
- un filtre qui supprime la lumière d'excitation,

- un capteur pour l'image en lumière blanche,
- un ou plusieurs capteurs pour l'image de fluorescence,
- un module de traitement d'image et de visualisation.

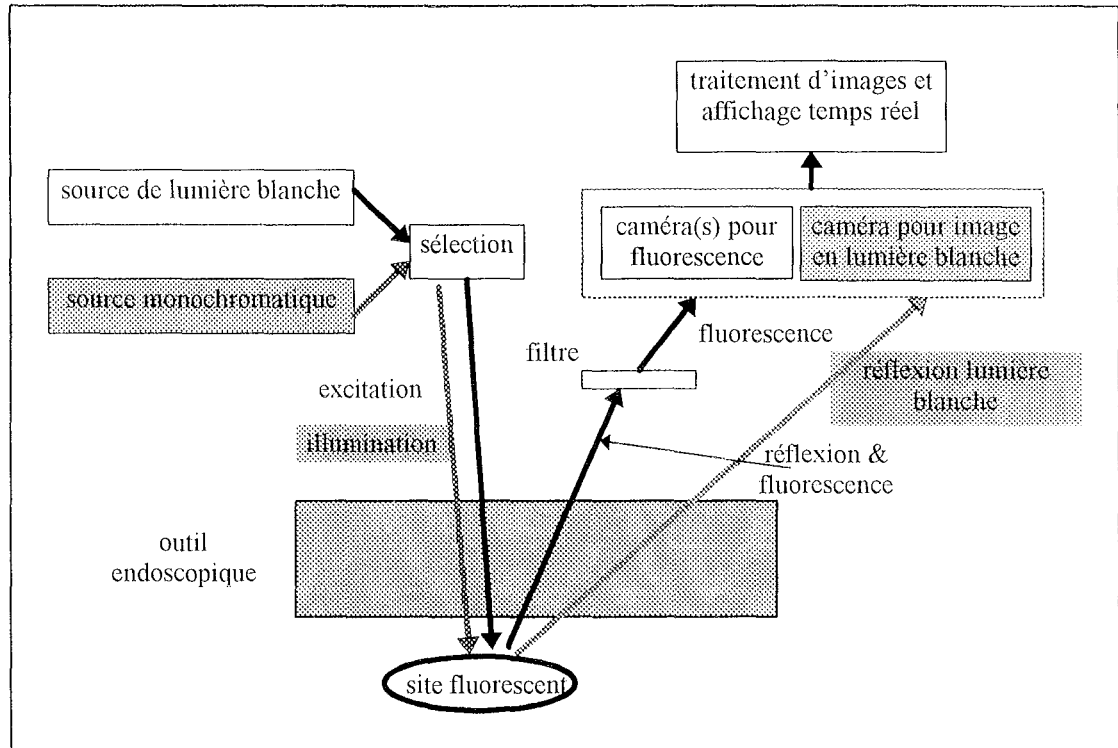


Figure 2.1.1 : Modèle simplifié d'un dispositif d'imagerie de fluorescence (les traits et les légendes en gris correspondent à des événements alternés avec ceux matérialisés en noir)

Beaucoup de systèmes combinent la spectroscopie dans une approche diagnostique complémentaire.

Le tableau 2.1.1. récapitule les caractéristiques des systèmes ci-après présentés. Nous retenons les sources d'excitation et leurs paramètres (longueur d'onde, puissance ou énergie), l'application (endoscopique ou superficielle/ autofluorescence ou fluorescence induite/ modèle d'application), la vitesse de traitement et la technique adoptée (rapport de fluorescence ou autre traitement d'image/ imagerie résolue dans le temps ou en continu)

Source d'excitation	caractéristiques	Capteurs	applications	vitesse/ technique, résolution temporelle	Pays
Laser He-Cd	$\lambda = 442 \text{ nm}$ $P = 100 \text{ mW}$	2 caméras CCD intensifiées, 1 caméra CCD couleur	- endoscopique (poumon et bronches) - Autofluo et fluo. Induite	bonne/ Rapport de fluorescence, continu	Canada
Laser Azote pulsé (4 ns, 20 Hz)	$\lambda = 337 \text{ nm}$ $W = 180 \text{ mJ}$ $f = 20 \text{ Hz}$	télescope caméra CCD 2 x intensifiée	- superficielle, endoscopique - Fluo. Induite, Autofluo.	moyenne/ Rapport de fluorescence, continu	Suède
Laser Argon	UV	1 caméra CCD couleur 1 caméra CID	endoscopique (Pièce opératoires) Autofluo.	/détection de contour, continu	USA Massachusetts
Lampe Xénon	$\lambda = 375 \pm 7 \text{ nm}$	caméra CCD intensifiée	superficielle (peau) Autofluo.	lente/ , continu	USA Texas
Laser Krypton	$\lambda = 406.6 \text{ nm}$	caméra CCD intensifiée + caméra couleur	endoscopique (vessie) - Fluo. Induite	/ , continu	Allemagne
Laser à colorant pulsé (1 ns, 50 Hz)	$\lambda = 395 \text{ nm}$	caméra CCD intensifiée	superficielle (Souris) Fluo. Induite	moyenne/ , résolu dans le temps	Italie
Laser CW Krypton et source Xénon	$\lambda_1 = 407 \text{ et } \lambda_2 = 413 \text{ nm}$	2 cam. Intensifiées et une cam. CCD Couleur	endoscopique(bronches,oesophage pharynx) et sup.(souris)	/ rapport de fluorescence; continu et résolue dans le temps	Suisse
Laser XeCl lampe Xénon	$\lambda_1 = 405 \text{ nm et } \lambda_2 = 630 \text{ nm,}$ pulsé (0.2 mJ, 30 Hz)	1 caméra couleur +2 cam. Intensifiées	sur patients (bronches)	/affichage fausses couleurs, continu	Japon
Hé-Ne ou laser à colorant pulsé	630 nm	Caméra CCD refroidie	souris	/ , continu	Russie

Tableau 2.1.1 : Récapitulatif sur les systèmes d'imagerie de fluorescence

2.2. Système Canadien [27, 28, 29, 62, 63, 32, 127, 21, 33]

2.2.1. Description

PALPIC, LAM et al. ont développé un outil d'imagerie médicale pour la détection des tumeurs précoces du poumon nommé : « LIFE » (Lung Imaging Fluorescence Endoscope)[27, 28, 29]. La source d'excitation préconisée pour induire la fluorescence est un Laser Helium-Cadium (442 nm, 100 mW). Le signal émis est séparé par un filtre dichroïque en deux fenêtres spectrales (zone verte : $\lambda = 520 \pm 25$ nm, et zone rouge : $\lambda > 630$ nm), chaque partie est captée par une caméra CCD intensifiée. Les images résultantes sont combinées en une pseudo image qui différencie les tissus sains des tissus tumoraux. L'image en lumière blanche est captée par une caméra CCD couleur. Le contrôle de l'obturation de la lumière blanche ou du laser se fait par l'intermédiaire d'une horloge qui commande également la lecture des caméras intensifiées. Ainsi, quatre images d'un même site seront affichées sur le moniteur de visualisation. Ce dispositif est associé à un outil spectroscopique[62][63].

2.2.2. Traitement d'image

C'est une technique de rapport de fluorescence entre une image rouge (R), et une image verte (V). Ce rapport (R/V) semble varier en fonction de l'état des tissus. Si ce rapport dépasse un certain seuil, le site est suspecté malin[127]. Les raisons de cette différence ont été proposées à la suite d'essais réalisés *in vitro* et *in vivo* par QU [32]. Il a été ainsi montré que le signal de fluorescence rouge était plus important que celui de la fluorescence verte car les coefficients d'absorption et de diffusion des longueurs d'onde courtes sont plus importants que ceux des plus grandes longueurs d'onde. Par conséquent, le signal rouge a une probabilité plus importante d'atteindre la surface du tissu et d'être détecté que le signal vert (autofluorescence). Le signal rouge provenant de la tumeur est plus important que celui du tissu sain, ceci est dû à une division cellulaire importante accompagnée d'une augmentation de la vascularisation et des porphyrines endogènes.

2.2.3. Applications

LAM et al. ont reporté les résultats expérimentaux du LIFE et son efficacité dans le diagnostic par autofluorescence des tumeurs du poumon à différents stades [31].

Ce groupe de recherche a également testé LIFE en association avec le photofrin [30, 128]. D'autres applications concernent l'ALA administrée par voie orale avec une dose de 60

mg/kg. En conséquence, un meilleur contraste entre la tumeur et le tissu sain est obtenu. Cependant, le PS est également retenu par des régions non malignes (entre autres cicatrices des biopsies récentes).

LIFE a été expérimenté pour la détection des néoplasies dans la cavité orale avec et sans apport d'un dérivé du photofrin (porfimer sodium) sur des Hamsters. [33]

Ce système qui est déjà commercialisé sous le nom de XILLIX, a fourni de bons résultats diagnostiques en clinique avec et sans apport de photosensibilisants.

2.3. Système suédois [45, 40, 41, 64, 65, 129, 160]

2.3.1. Premier système (images 1D)

Un laser à Azote pulsé émettant à 337 nm avec une durée de impulsions de 10 nsec, une fréquence de répétition de 10 Hz et une énergie de 1 mJ, est focalisé de façon à produire un faisceau longitudinal de 20 mm x 1mm sur l'objet. Un jeu de trois miroirs et une lentille achromatique permettent d'obtenir trois images identiques (mais 4 fois plus petites). Les trois images sont ensuite lues par une barette de détecteurs intensifiés, devant laquelle trois filtres sont successivement placés. Ces derniers ont des fréquences centrales respectives de 630 nm, 600 nm et 488 nm ± 5 à 10 nm. Les données sont accumulées sur 50 impulsions laser. Les mesures sont réalisées en éclairage ambiant normal. Des spectres de fluorescence sont également relevés séquentiellement sur huit points de mesures le long de la ligne d'acquisition avec un faisceau d'illumination de 2 mm. Ce dispositif est adapté au diagnostic par fluorescence induite avec l'HPD (injecté à des rats)[45].

Le traitement consiste à soustraire l'image à 600 nm multipliée par un facteur k , de l'image à 630 nm. Le facteur k peut être choisi de façon à ce que le résultat du traitement soit nul pour des régions saines (pas d'HpD). L'image résultant de ce traitement est ensuite divisée par l'image à 488 nm (autofluorescence). Le résultat est alors indépendant de la fluctuation de l'illumination et de la distance à l'objet.

2.3.2. Deuxième système [40, 41]

La même source laser à Azote est employée mais avec des paramètres différents (durée de pulse de 4 ns, énergie de 180 μ J, fréquence de répétition 20 Hz). Le faisceau est rendu plus large (10 mm x 10 mm) au moyen de lentilles cylindriques en quartz. Dans cette nouvelle version, les images sont en deux dimensions (figure 2.3.1). Un miroir dichroïque est placé

sur le chemin du faisceau laser et sur le chemin de la fluorescence de façon à réfléchir le faisceau sur l'échantillon et de transmettre la fluorescence à partir de 370 nm ; la fluorescence est ensuite détectée par un télescope Cassegrain. Ce dernier comprend sur sa face d'entrée une cassette qui peut loger quatre filtres passe-bande ; seulement trois filtres sont utilisés avec des longueurs d'onde centrales respectives de 470 nm, 600 nm et 630 nm \pm 20 nm. Le détecteur, une caméra CCD refroidie à 5°C avec effet Peltier, couplée à deux intensificateurs placés en face du miroir de sortie, capte quatre images d'un même site mais correspondant à différentes régions du spectre.

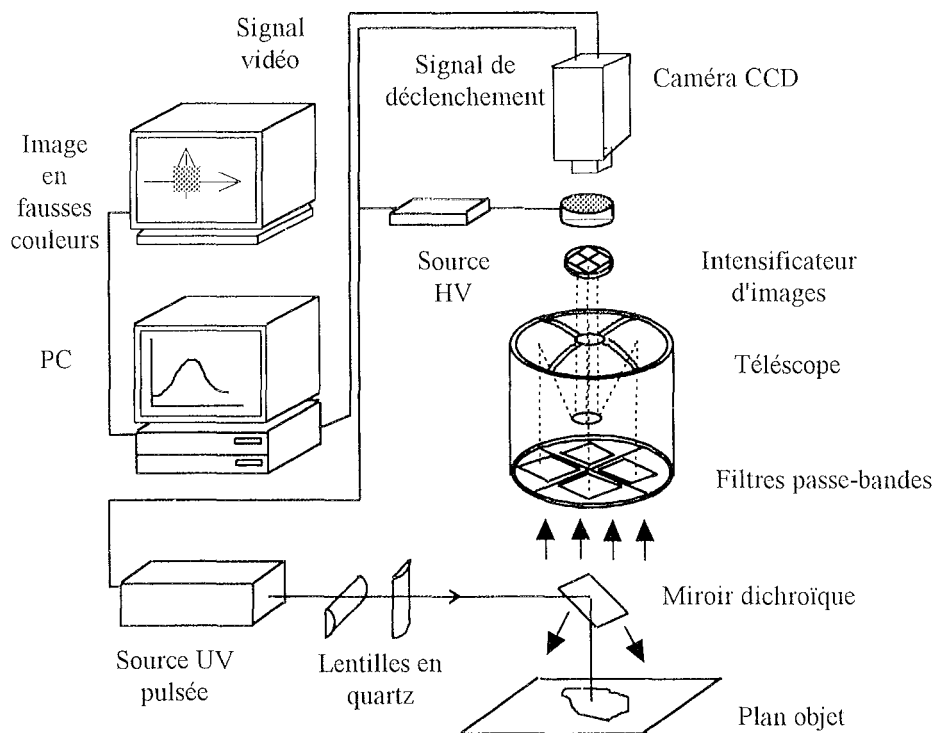


Figure 2.3.1 : Système d'imagerie de fluorescence Suédois

L'image est intégrée sur 2 ms pour réduire l'influence du bruit de fond. Un micro ordinateur permet de contrôler les impulsions du laser et l'enclenchement des intensificateurs. Un programme permet de faire la moyenne sur 10 à 50 images pour améliorer la qualité des images de sorte que la fréquence de visualisation des images traitées atteint 8 Hz.

Les trois images centrées respectivement à 470 nm (autofluorescence), 600 nm et 630 nm sont visualisées. En plus une image artificielle est créée par un traitement pixel par pixel répondant à la formule $F = \{I(630) - k \times I(600)\} / I(470)$. L'image traitée est d'une meilleure qualité que les trois images originales, la tumeur y est bien délimitée.

Le diagnostic se fait sur des cobayes murins injectés de Photofrin (1mg/ml ou 5 mg/ml en i.v., diagnostic 2 jours après injection)

Par la suite, le système a été légèrement modifié[46]. La source d'excitation est un laser à colorant, pompé par un laser à Azote pulsé, émettant à 405 nm avec une fréquence de 20 Hz et une durée de pulse de 3 ns. Les filtres sont centrés respectivement à 470 (autofluorescence), 600 (autofluorescence au voisinage du pic des porphyrines endogènes), 635 (porphyrines endogènes) et 670 nm (signal de photoblanchiment). L'intensificateur d'images permet une détection sur une durée de 100 ns. Par la suite les images sont intégrées sur une durée de 5 à 30 secondes.

Un système de spectroscopie est associé à ce dispositif [64, 65, 129].

Le traitement d'images est basé sur l'application de la relation suivante :

$$F = \{I(635nm) - k \times I(600nm)\} / I(470nm) \quad (1)$$

Le facteur k est choisi de façon à ce que le numérateur de l'équation (1) représente la contribution seule des porphyrines endogènes au signal d'autofluorescence, en d'autres termes, le numérateur devrait s'annuler pour un tissu sain qui n'a pas retenu le photosensibilisant.

En plus du diagnostic des tumeurs, ce système permet de quantifier la dose de lumière absorbée par le tissu et ceci en calculant la fonction :

$$F = I(670nm) / I(635nm) \quad (2)$$

En effet, il a été prouvé par MOAN et al.[154] et KÖNIG et al.[155] que l'épaulement qui apparaissait autour de 670 nm dans le spectre de fluorescence après un traitement PDT, était dû à la photo-dégradation des photosensibilisants utilisés (porphyrines) et qu'il dépendait de la dose de lumière absorbée. Par conséquent la relation (2) permet de quantifier la dose de lumière absorbée et peut être exploitée pendant un traitement PDT.

Récemment[159], le système a été adapté à un endoscope et permet un diagnostic temps réel de la peau, du sein, de la tête, du cou et de la vessie avec photosensibilisants (HpD ou ALA) ou en autofluorescence. Les images de fluorescence sont superposées aux images couleur en lumière blanche du site examiné à une fréquence de 3 images par seconde. Les mesures sont également effectuées en temps réel avec un spectrofluorimètre[160].

2.4. Système endoscopique des USA (Massachusetts) [38]

Un laser à Argon via une fibre en quartz dotée d'une lentille permet d'exciter les tissus par un rayonnement UV. La fibre est insérée dans le canal de biopsie d'un endoscope. La caméra CCD de l'endoscope connectée à un moniteur de visualisation couleur, permet l'acquisition de l'image en lumière blanche tandis qu'une caméra CID intensifiée saisit l'image de fluorescence. Un algorithme de filtrage permet de détecter le contour de la

tumeur et ce dernier est affiché sur l'image de référence couleur. Connaissant la puissance d'excitation incidente, une modélisation permet de calculer la quantité de photons détectés en fonction de la distance entre le centre et la périphérie de l'image.

Des images de fluorescence ont été réalisées sur des pièces opératoires de polypes du colon. Ces images révèlent une intensité de fluorescence plus faible dans les polypes que dans les tissus sains (rapports d'intensité de 2 à 3 entre tissu sain et polypes).

2.5. Système d'imagerie des USA (Texas) [34]

2.5.1. Description du système

C'est un dispositif adapté à l'étude de la peau. La source d'excitation est une lampe Xénon (250 W) filtrée avec un passe-bande ($375 \text{ nm} \pm 7 \text{ nm}$) et transmise par un miroir dichroïque avant d'être focalisée sur le site à explorer. Le signal de fluorescence émis par la peau est réfléchi par le miroir dichroïque puis filtré par un passe-haut (418 nm), avant d'atteindre une caméra CCD intensifiée.

Les images en lumière blanche sont captées sous l'éclairage ambiant, avec la même caméra à un instant différent et en diminuant le gain de l'intensificateur. Les images sont stockées sur des cassettes vidéo. La durée globale du diagnostic est de 5 à 10 min. Aucun traitement d'images n'est effectué. Ce système est également associé à un spectrofluorimètre qui permet l'analyse fine des sites considérés.

2.5.2) Applications

Ce système est testé en clinique dermatologique. Les lésions considérées sont pigmentées.

2.6. Système Russe [35]

Une caméra CCD à balayage lent, refroidie avec de l'Azote, constitue le capteur du signal de fluorescence induite par l'excitation avec un laser He-Ne ou un laser à colorant pulsé.

L'étude est effectuée sur des souris porteuses de lésions chimiquement induites. L'analyse du signal d'autofluorescence se fait entre 670 nm et 690 nm et concerne les porphyrines endogènes dans le but de suivre l'état de dégradation de la peau (pas d'intérêt oncologique).

2.7. Système d'imagerie et de spectroscopie Japonais [42]

2.7.1. Description

Un laser XeCl excimer est utilisé pour le diagnostic (émission à 405 nm ; colorant : diphényl sulphén) et pour le traitement (émission à 630 nm ; colorant : rhodamine B). Le diagnostic se fait avec une énergie de 0.2 mJ par pulse et une fréquence de répétition de 30 Hz. Un bronchoscope a été développé pour ce système, il comporte 4 voies respectivement pour la sortie du laser, la sortie de la lampe Xénon, l'entrée de l'image de fluorescence et l'entrée de l'image standard (figure 2.7.1).

Trois caméras sont connectées au bronchoscope, l'une standard utilisée pour visualiser l'image en lumière blanche et les deux autres intensifiées sont destinées à l'image de fluorescence et au spectre de fluorescence respectivement. Un affichage en fausses couleurs (rouge, bleu, jaune) est réalisé en fonction de l'intensité du signal de fluorescence.

2.7.2. Applications

Ce dispositif est exploité pour le diagnostic des cancers des bronches (carcinome *in situ* adénocarcinome) sur des patients après administration de Photofrin II (3 mg/kg ; 72 h, 96 h, et 120 h après injection).

Les diagnostics étaient tous corrects, avec une importante intensité de fluorescence sur les lésions et faible, voire inexistante, sur les tissus sains.

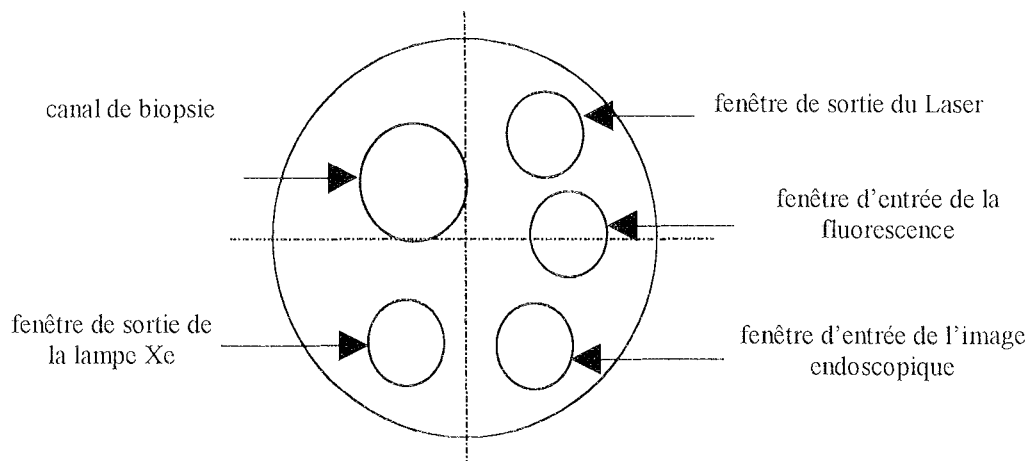


Figure 2.7.1 : Schéma de l'extrémité de l'endoscope réalisé pour le diagnostic et le traitement par fluorescence

2.8. Système Suisse (Lausanne) [43, 49, 123, 124, 126]

2.8.1. Description

Un laser à krypton est utilisé pour l'excitation dans le violet à 407 ou 413 nm à travers une fibre optique de 200 μm insérée dans le canal de biopsie d'un endoscope. L'extrémité de la fibre est taillée de façon à avoir une distribution de la lumière laser identique à celle de la lumière blanche. L'optique du fibroscope capte le signal de fluorescence tout en filtrant la lumière d'excitation. L'image de sortie est amplifiée 10^4 fois grâce à un intensificateur d'images (multichannel plate) placé devant un capteur CCD. L'image digitalisée est affichée sur un moniteur TV. Le fluoro-endoscope, permet également de visualiser l'image en lumière blanche. Une source Xe (300W) est employée. Un obturateur mécanique permet de couper la source Xénon pendant l'acquisition de l'image de fluorescence ; de même, le laser est obturé pendant l'acquisition de l'image en lumière blanche. L'image en lumière blanche est captée par une caméra CCD couleur après avoir été réfléchiée par un miroir basculant. L'image de fluorescence est filtrée du bruit et superposée à l'image en lumière blanche. L'image de fluorescence est divisée en deux zones spectrales différentes correspondant respectivement, aux bandes 520-580 nm (image B) et 600-700 nm (image A). L'image (B) correspond au signal d'autofluorescence, tandis que l'image (A) correspond à la réponse du photosensibilisant (dans ce cas précis : l'HpD) et d'une partie restante de l'autofluorescence. La période d'alternance des deux modes de visualisation est de 40 ms. [43, 49]

Quelques modifications ont été apportées [123, 124] au le dispositif décrit ci-dessus : un laser Argon (488 nm ; irradiance de 5 à 15 mW/cm^2) représente une source d'excitation supplémentaire préconisée pour le diagnostic avec la fluorescéine ; la lumière blanche est filtrée pour des longueurs d'onde susceptibles de provoquer un photoblanchiment ; les fenêtres spectrales choisies sont : 470-600 nm et au delà de 600 nm.

- 1) la première fenêtre correspond à l'autofluorescence et la deuxième à celle du photosensibilisant, dans ce cas le photofrin.
- 2) le diagnostic peut également se faire selon un autre principe qui consiste à détecter la fluorescéine fixée sur des anticorps. La première fenêtre correspond à l'émission de la fluorescéine (excitation à 488).

Pour minimiser l'influence du bruit sans affecter considérablement l'affichage temps réel, une image est intégrée pendant 100 ms (la limite admissible étant de 200 ms).

2.8.2. Traitement d'images

Le contraste entre tissu sain et tissu tumoral est assuré en appliquant la relation suivante :

$F = (A - \alpha B) / \alpha B$ où A représente l'image de fluorescence dans la partie rouge du spectre, tandis que B représente l'image d'autofluorescence. Ainsi, le signal d'autofluorescence est supprimé, et en plus, le résultat est indépendant de la position de l'objet et de la fluctuation de l'illumination. [43, 49]

Par la suite, le traitement temps réel a été développé [123][124] et consiste en la succession de trois opérations :

- La première permet d'éliminer la saturation en attribuant un niveau de gris de 80 aux pixels A_{ij} et B_{ij} dont les intensités dépassent un seuil β égal à 254 (i et j étant des indices correspondant aux lignes et colonnes de l'images).
- Dans la deuxième étape, si $A_{ij}/B_{ij} > \eta$ ou $B_{ij} < \varepsilon$, le pixel dans l'image traitée, sera mis à zéro. Ceci permet d'éliminer les faux positifs causés par une grande réduction du signal de fond (B). Ce cas de figure est attribué à une vascularisation importante et donc à une absorption importante ou à une faible excitation locale.

Dans la dernière étape, un seuillage est effectué selon l'une des deux méthodes suivantes :

La première consiste à attribuer la valeur zéro au pixel final si $A_{ij} - B_{ij} > T_1$ ou la valeur 255 dans le cas contraire ; La deuxième méthode consiste à tester l'inégalité : $\{(A_{ij}/B_{ij}) - 1\} > T_2$, si elle est vraie, la valeur 255 est attribuée au pixel final, dans le cas contraire il sera mis à zéro. Ce dernier test est particulièrement intéressant lorsque la distance entre la surface examinée et l'extrémité de l'endoscope n'est pas constante car il permet une mesure relative.

2.8.3. Applications

Des diagnostics ont été réalisés en clinique sur le pharynx, l'oesophage, et les voies trachéobronchiques. Les patients ont reçu 2 mg/kg de Photofrin 72 heures avant l'irradiation avec un laser à colorant pompé par un laser Argon et avec des doses de lumière comprises entre 60 J à 150 J/cm². Les résultats ont été satisfaisants dans l'oesophage et les bronches pour des cancers *in situ* ou micro-invasifs. Pour les cancers plus avancés, les résultats étaient moins satisfaisants. [43, 49]

2.8.4. Imagerie fréquentielle [126]

Le diagnostic s'est orienté vers une analyse fréquentielle des images. Pour cela, la source d'excitation adoptée est un laser à colorant modulé en intensité, à une fréquence pouvant varier de 1 à 350 MHz. Deux séries de trois images sont captées simultanément par deux

caméras CCD intensifiées (les intensificateurs sont modulés à la même fréquence que la source d'excitation). La première série correspond aux images de fluorescence et la deuxième aux images de l'excitation rétro-diffusée. Dans chaque série les images sont retardées en phase par rapport à l'excitation et sont séparées entre elles d'un angle de 120°. La mesure, en quasi-temps réel de la phase et du module de chaque point des images de chaque série, ainsi que de la différence de phase et du rapport des modules des deux séries, permet d'obtenir l'image de la durée de vie du site fluorescent. Selon le choix de la fréquence de modulation, certains fluorophores seront privilégiés. Ces images sont intégrées pendant une durée pouvant varier de 10 ms à 1s. Le résultat du traitement est superposé à l'image en lumière blanche captée par une caméra couleur de façon simultanée avec les deux séries d'images précédemment citées.

Applications

- *in vitro* sur deux chromophores connus (Rhodamylne, durée de vie de 6 ns, émission 560 nm ; acridine orange, durée de vie 2 ns, émission à 530 nm) avec une excitation à 514 nm et une fréquence de modulation de 64 MHz (période de 15 ns)
- sur une pièce opératoire de vessie avec une excitation à 514 nm et une fréquence de modulation de 40 MHz, le résultat discrimine l'urothélium altéré (durée de vie de 0.5 ns) de l'urothélium normal (durée de vie de 2.5 ns). Des artefacts ont été relevés et sont dus à la non uniformité de l'image de référence. L'une des solutions envisagées est de considérer une mesure ponctuelle non intensifiée sur l'image de référence. [126]

2.9. Système Allemand (Ulm) [9, 13]

Un laser à Krypton émettant à 406.7 nm est couplé à une fibre optique de 500µm pouvant s'insérer dans le canal du cystoscope. La puissance du faisceau d'irradiation Laser varie entre 50 et 150 mW. L'illumination de la vessie se fait également en lumière blanche et le passage d'un mode à l'autre se fait en basculant un miroir commandé par un moteur. L'opération mécanique est réalisée en moins d'une seconde. Le module d'acquisition d'images comprend une caméra couleur pour l'image en lumière blanche et une caméra CCD intensifiée pour l'image de fluorescence dans la région spectrale de longueurs d'onde supérieures à 600 nm. De même que pour la lumière d'excitation, l'image en lumière blanche est basculée vers la caméra couleur grâce à un miroir. Les images de fluorescence sont stockées sur une cassette vidéo.

La fluorescence de l'ALA est visible à l'oeil nu et ne demande aucun traitement d'image supplémentaire.

La quantification du contraste de fluorescence entre tissu sain et tissu malade se fait par l'acquisition des spectres de fluorescence au moyen d'un spectrofluorimètre. [9]

Applications : le système est appliqué en clinique pour le diagnostic des tumeurs de la vessie après administration de l'ALA (voie intravesicale, dose de 1.5 g, diagnostic de 60 à 570 minutes après administration de la drogue). Il a permis de diagnostiquer 26 lésions malignes ou précancéreuses qui ne pouvaient pas être détectées sous un éclairage classique. [13]

2.10. Système Italien (Milan) [36, 47, 37, 48]

2.10.1. Description [36], [47]

Un laser à colorant (α -NPO) pompé à partir d'un laser à Azote (Nitrogène) émettant à la longueur d'onde de 395 nm et ayant une durée de pulse inférieure à 1 ns et une fréquence de répétition de 50 Hz, est utilisé pour l'excitation des tissus. Le faisceau lumineux est couplé par une fibre optique en quartz de 40 m (cette longueur permet d'introduire un délai temporel correcteur). La fenêtre d'acquisition temporelle est ajustée grâce à un générateur programmable d'impulsions qui commande la caméra CCD intensifiée préconisée pour détecter la fluorescence. Cette dernière est munie d'un filtre permettant de réduire la détection de la lumière d'excitation rétrodiffusée. Le système comprend également un moniteur de visualisation, un magnétoscope et une imprimante.

2.10.2. Applications et traitement d'images associé

Le dispositif est employé pour le diagnostic des tumeurs murines. Les souris sont injectées (en iv) de différentes doses d'HpD (25 mg/kg, 10 mg/kg et 5 mg/kg), puis irradiées à $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Deux images déclenchées à deux instants différents t_1 et t_2 , après l'impulsion laser, sont captées ; t_1 est nul, alors que t_2 est égal à 15 ns (ce qui correspond au temps moyen de l'émission de l'HpD). L'acquisition est intégrée en 50 ns. Le bruit dû à l'intensificateur d'images, est réduit en effectuant une moyenne de 10 images. La période globale de visualisation ou d'enregistrement de l'image traitée est de 1 seconde.

Les images synchrones au tir laser t_0 représentent un faible signal de fluorescence diffus, et ne délimitent pas la tumeur car le signal d'autofluorescence est encore présent. Par contre, les images prises avec un retard t_1 ne comprennent que le signal de fluorescence induit par l'HpD.

Plus récemment [37][48], la même équipe a rapporté une nouvelle technique associée au même équipement avec quelques modifications (longueur d'excitation de 405 nm avec une irradiance de 75 μW). Cette technique permet de visualiser l'image de la durée de vie τ_2 de l'HpD, pour chaque pixel. τ_2 dépend de l'état pathologique (la durée de vie de la fluorescence de l'HpD dans les lésions est supérieure à sa durée de vie dans les tissus sains), par conséquent l'image affichée permet de délimiter convenablement les lésions. Cette durée de vie est obtenue à partir des images de fluorescence retardées de 10 et 30 ns (pas d'autofluorescence) par rapport à l'impulsion Laser. Elle est donnée par :

$$\tau_{2;i,j} = \frac{d_2 - d_1}{\ln\left[F_{i,j}(d_1) / F_{i,j}(d_2)\right]} \quad (2.10.2.1)$$

sachant que d_1 et d_2 (10 et 15 ns) sont grands devant τ_1 (durée de vie des fluorophores endogènes). En effet, l'intensité de fluorescence est donnée en fonction du temps par l'équation suivante :

$$I(t) = I_1(0) \exp(-t/\tau_1) + I_2(0) \exp(-t/\tau_2) \quad (2.10.2.2)$$

La matrice de fluorescence sur l'image est donnée en fonction du retard d par:

$$F_{i,j}(d) = k \int_d^{\infty} I_{i,j}(t) dt = k \left[\tau_{1;i,j} I_{1;i,j}(0) \exp(-d / \tau_{1;i,j}) + \tau_{2;i,j} I_{2;i,j}(0) \exp(-d / \tau_{2;i,j}) \right] \quad (2.10.2.3)$$

k étant lié au gain et à la sensibilité du détecteur, i et j sont les indices des pixels dans le plan. Pour des retards d_1 et d_2 grands devant τ_1 , nous obtenons la relation (2.10.2.1).

Cette méthode de détection des tumeurs présente l'avantage d'être insensible à l'hétérogénéité de la répartition de la drogue dans les tissus ainsi qu'à l'hétérogénéité de la puissance de la lumière d'excitation.

Le traitement d'images se fait en temps différé avec le logiciel Matlab. En plus la période qui sépare l'acquisition de deux mesures est de quelques secondes ce qui n'est pas convenable pour une application clinique.

Le dispositif est associé à un spectrofluorimètre.

2.11. Conclusion

Pour résumer l'étude bibliographique sur les dispositifs d'imagerie LIF, nous considérons ci-dessous les points les plus importants qui caractérisent ces outils.

Diagnostic par méthode endoscopique : nous avons remarqué qu'il est souvent délicat d'avoir un équipement qui possède toutes les qualités requises pour être greffé sur un endoscope, compte tenu des contraintes d'espace et de mouvement. Ainsi, beaucoup de systèmes d'imagerie sont appliqués au diagnostic des régions superficielles telles que la peau, ou sont encore au stade expérimental (application animale, ou application en *ex-vivo*).

Excitation : les sources d'excitation sont souvent des Lasers avec des irradiances comprises entre 10 et 100 mW/cm² en continu. Peu de dispositifs exploitent une source de lumière blanche pour induire la fluorescence. L'excitation se fait soit en mode continu soit en mode pulsé. Dans ce dernier cas, le photoblanchiment est évité, et l'observation peut se faire de façon simultanée en lumière blanche. En général, une seule longueur d'onde d'excitation est utilisée dans une gamme qui va de l'UV au vert.

Capteur : Nous avons constaté que les images de fluorescence sont toujours acquises par des caméra CCD. Ces capteurs sont largement utilisés à cause de leur excellente sensibilité et leur linéarité.

Sensibilité : Les CCD sont presque toujours intensifiées, car ceci augmente la sensibilité (en temps réel) mais introduit un bruit supplémentaire. Une autre technique pour augmenter la sensibilité, consiste à exposer la CCD à la source fluorescente pendant une période assez longue pour avoir suffisamment de photoélectrons dans chaque pixel. Cette intégration est limitée par le courant noir du circuit généré par la température ambiante, aussi elle est souvent accompagnée d'un refroidissement des CCD. L'intégration a pour inconvénient de diminuer la dynamique de visualisation.

Dans tous les cas, une meilleure sensibilité permet de diminuer la puissance d'excitation de façon à éviter la saturation ou le photoblanchiment.

Débruitage : le moyennage sur plusieurs images est l'une des techniques les plus couramment employées pour améliorer la qualité des images. Elle a été prouvée aussi efficace que le refroidissement des CCD [50]. Cette approche est presque toujours adoptée,

bien qu'elle ait pour conséquence la diminution de la période de rafraîchissement des images traitées (images saccadées) ; la durée d'acquisition varie entre 100 ms et 1s.

Visualisation : la visualisation de l'image en lumière blanche et de l'image de fluorescence, est effectuée souvent de façon simultanée. Parfois, l'image de fluorescence (ou le résultat d'un traitement d'image basé sur différentes images de fluorescence) est superposée à l'image en lumière blanche.

Fenêtres de diagnostic : l'émission de fluorescence est mesurée sur une ou plusieurs fenêtres spectrales correspondant à des sources précises (porphyrines endogènes, HpD, mTHPC, autofluorescence...). La comparaison entre tissus sains et pathologiques se fait alors en comparant la différence des niveaux de gris dans ces fenêtres.

La mesure est souvent affinée par une mesure spectrale ponctuelle (généralement non simultanée) sur les zones intéressantes.

Traitement d'images : l'un des moyens qui permet d'augmenter le contraste de la tumeur par rapport au tissu sain, consiste à supprimer le signal d'autofluorescence. Cette opération est souvent normalisée par rapport à une autre mesure de façon à obtenir un résultat indépendant de l'hétérogénéité de l'illumination. En effet, le mouvement de l'objectif (diagnostic dynamique) implique une illumination et une distance (entre l'objet et l'optique de détection) variables.

La suppression de l'autofluorescence n'est pas utile si le signal de fluorescence est important devant le signal d'autofluorescence.

Diagnostic résolu dans le temps : c'est une approche différente pour le diagnostic en imagerie de fluorescence. Elle est basée sur la durée de vie de la fluorescence plutôt que son intensité. Cette grandeur indépendante des paramètres optiques souvent difficiles à uniformiser dans les conditions réelles, permet d'avoir une quantification efficace et absolue de la fluorescence dans les tissus. Elle permet d'isoler dans le temps le signal d'autofluorescence (durée de vie plus faible que celle des photosensibilisants) du signal de fluorescence induit.

the 1990s, the number of people in the UK who are aged 65 and over has increased from 10.5 million to 13.5 million (13.5 million in 2000, 14.5 million in 2005, 15.5 million in 2010, 16.5 million in 2015, 17.5 million in 2020).

There are a number of reasons why the number of people aged 65 and over is increasing. One of the main reasons is that people are living longer. The life expectancy at birth in the UK is 78 years for men and 82 years for women. This is an increase from 72 years for men and 76 years for women in 1950. The increase in life expectancy is due to a number of factors, including improvements in medicine, nutrition, and living conditions.

Another reason why the number of people aged 65 and over is increasing is that people are having children later in life. This means that there are more people who are aged 65 and over who were born in the 1950s and 1960s. These people are now in their 60s and 70s, and are contributing to the increase in the number of people aged 65 and over.

The increase in the number of people aged 65 and over has a number of implications for society. One of the main implications is that there is a need for more social care services. As people age, they are more likely to need help with everyday tasks, such as shopping, cooking, and cleaning. This help is often provided by family members or friends, but as the number of people aged 65 and over increases, there is a need for more professional social care services.

Another implication of the increase in the number of people aged 65 and over is that there is a need for more housing. As people age, they are more likely to need a home that is adapted to their needs. This could include features such as ramps, handrails, and a shower chair. There is a need for more of this type of housing, as the number of people aged 65 and over increases.

The increase in the number of people aged 65 and over is a challenge for society, but it is also an opportunity. As people age, they bring with them a wealth of experience and wisdom. It is important that we value and support our older people, and that we create a society where everyone can live well into old age.

References

- 1. Department of Health (2001) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 2. Department of Health (2002) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 3. Department of Health (2003) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 4. Department of Health (2004) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 5. Department of Health (2005) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 6. Department of Health (2006) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 7. Department of Health (2007) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 8. Department of Health (2008) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 9. Department of Health (2009) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 10. Department of Health (2010) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.

Correspondence

S. J. Gray, School of Health and Life Sciences, Aston University, Aston Triangle, Birmingham B4 7ET, UK. Email: s.j.gray@aston.ac.uk

Declaration of interest

The authors declare that they have no conflict of interest with respect to the publication of this article.

References

- 1. Department of Health (2001) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 2. Department of Health (2002) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 3. Department of Health (2003) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 4. Department of Health (2004) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 5. Department of Health (2005) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 6. Department of Health (2006) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 7. Department of Health (2007) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 8. Department of Health (2008) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 9. Department of Health (2009) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.
- 10. Department of Health (2010) *Ageing and Health: A Report for the Secretary of State for Health*. London: HMSO.

CAHIER DES CHARGES

Le but de notre recherche est de mettre au point un dispositif d'imagerie de fluorescence pouvant se greffer sur un outil endoscopique, et permettant la détection des tumeurs précoces.

Nous avons déjà vu dans l'étude bibliographique, que le diagnostic peut se faire par autofluorescence ou par fluorescence induite d'un photosensibilisant : le dispositif devrait convenir aux deux situations.

La première étape de cette recherche porte sur la mise au point d'une instrumentation adaptée, répondant aux exigences suivantes :

- le matériel développé doit avoir une sensibilité suffisante pour détecter le signal d'autofluorescence des tissus humain de façon à permettre une bonne détection des zones tumorales,
- il doit être fiable avec une maintenance et une utilisation facile,
- il doit pouvoir s'adapter à un endoscope en tenant compte des caractéristiques de chaque appareillage (rigide ou souple),
- ce matériel doit permettre la visualisation en temps réel, pendant l'examen endoscopique, des deux images associées au site exploré : l'image en lumière blanche ou image endoscopique classique et l'image de fluorescence.

L'image de fluorescence, par sa nature même, doit révéler des lésions invisibles en lumière blanche. Cependant, un traitement du signal peut être nécessaire.

Nous considérons trois situations et donc trois approches de traitement d'images :

- dans le cas du diagnostic par autofluorescence, nous devons distinguer des zones ayant des intensités de fluorescence différentes. Par exemple, la tumeur se distingue du tissu sain par sa faible fluorescence mais d'autres phénomènes comme les ombres peuvent produire un effet similaire dans l'image de fluorescence. La combinaison avec l'image en lumière blanche permet de reconnaître les ombres vraies.
- dans le cas du diagnostic par fluorescence induite, nous devons d'abord supprimer le signal d'autofluorescence. Ce traitement se fait en considérant la composante verte de l'image de fluorescence et l'allure spectrale du site examiné en mode autofluorescence. Ensuite un traitement identique à celui appliqué dans le cas du diagnostic par autofluorescence sera pratiqué en considérant la composante rouge de l'image de fluorescence et en lumière blanche ;

- un traitement d'images devrait être effectué pour les deux approches pour améliorer les diagnostic des tumeurs. Ce qui peu se faire par des algorithmes de rehaussement de contraste ou de segmentation.

METHODOLOGIE

C'est à partir de l'ancienne version du dispositif d'imagerie de fluorescence réalisée au centre Alexis VAUTRIN [135] que nous souhaitions vérifier la possibilité du diagnostic par autofluorescence. Cependant, nous avons dû développer un autre système en partant des composants disponibles.

Nous disposons d'une caméra couleur Cohu ® (cf p 63), d'une source de lumière blanche à halogènes et de deux lasers : un laser Krypton et un laser Argon.

La première étape de notre recherche consiste à faire un choix de la source d'excitation en fonction de la puissance lumineuse requise pour générer un signal d'autofluorescence détectable par la caméra. La puissance délivrée par la source en lumière blanche n'est pas suffisante, aussi nous avons choisi une source LASER.

La deuxième étape est de faire un choix entre exciter le tissu simultanément ou alternativement par le laser et la source de lumière blanche. Si les deux excitations sont simultanées, il faut alors que l'acquisition des images correspondantes le soit aussi et il faut deux capteurs. Cette solution est souvent adoptée dans les dispositifs d'imagerie existants au stade expérimental, ce sont des outils encombrants et lourds. Nous avons donc décidé d'employer une seule caméra. Pour que les deux images acquises successivement correspondent exactement au même site, il faut que leurs fréquence d'acquisition soit plus grande que la plus grande fréquence du mouvement de l'outil endoscopique ou de l'organe examiné.

Pour comparer les images, les deux illuminations doivent être similaires du point de vue de la distribution de la lumière sur le site. Aussi, nous avons choisi d'utiliser la même fibre optique pour guider les deux lumières et nous avons développé un module motorisé pouvant alterner les deux sources de lumière rapidement et focaliser leurs sorties sur la même fibre optique. L'utilisation d'un faisceau de fibres au lieu d'une seule fibre a été rejetée à cause de la non homogénéité spatiale du faisceau résultant.

Ces illuminations doivent être synchronisées avec l'acquisition des images correspondantes. Nous avons vu à travers la bibliographie que les images de fluorescence sont acquises par des caméras noir et blanc et la caméra couleur capte les images endoscopiques classiques. Les caméras noir et blanc sont dotées de filtres dont la bande passante correspond au signal à détecter, connaissant son pic spectral d'émission maximale. L'autofluorescence a une émission maximale dans le vert (autour de 520 nm) et l'émission de fluorescence de la mTHPC est dans le rouge (autour de 650 nm). Avec deux caméras correctement filtrées on capte séparément un signal "vert" et un autre "rouge". Dans notre cas, avec une seule caméra, nous pouvons placer un disque motorisé muni des deux filtres et nous synchronisons la rotation du disque avec l'acquisition de l'image due à l'autofluorescence et de celle due à la mTHPC. Nous avons préféré exploiter les filtres internes de la caméra pour séparer l'information d'autofluorescence de celle due au photosensibilisant, bien que les caractéristiques de ces filtres ne coïncident pas parfaitement avec les signaux à détecter (cf p. 67).

Il résulte de cette étude, le schéma synoptique que nous présentons et détaillons dans la deuxième partie (partie II, fig 1.1).

PARTIE II : ETUDE ET REALISATION DE L'INSTRUMENTATION

1. Introduction

Dans cette partie nous présentons les différents modules constituant le système d'imagerie de fluorescence dont le schéma synoptique est représenté en figure 1.1.

Nous étudierons :

- la caméra couleur Cohu qui est à la base de la chaîne d'acquisition d'images,
- les sources de lumière,
- le module optique,
- le module mécanique,
- le module électronique,
- le module de commande.

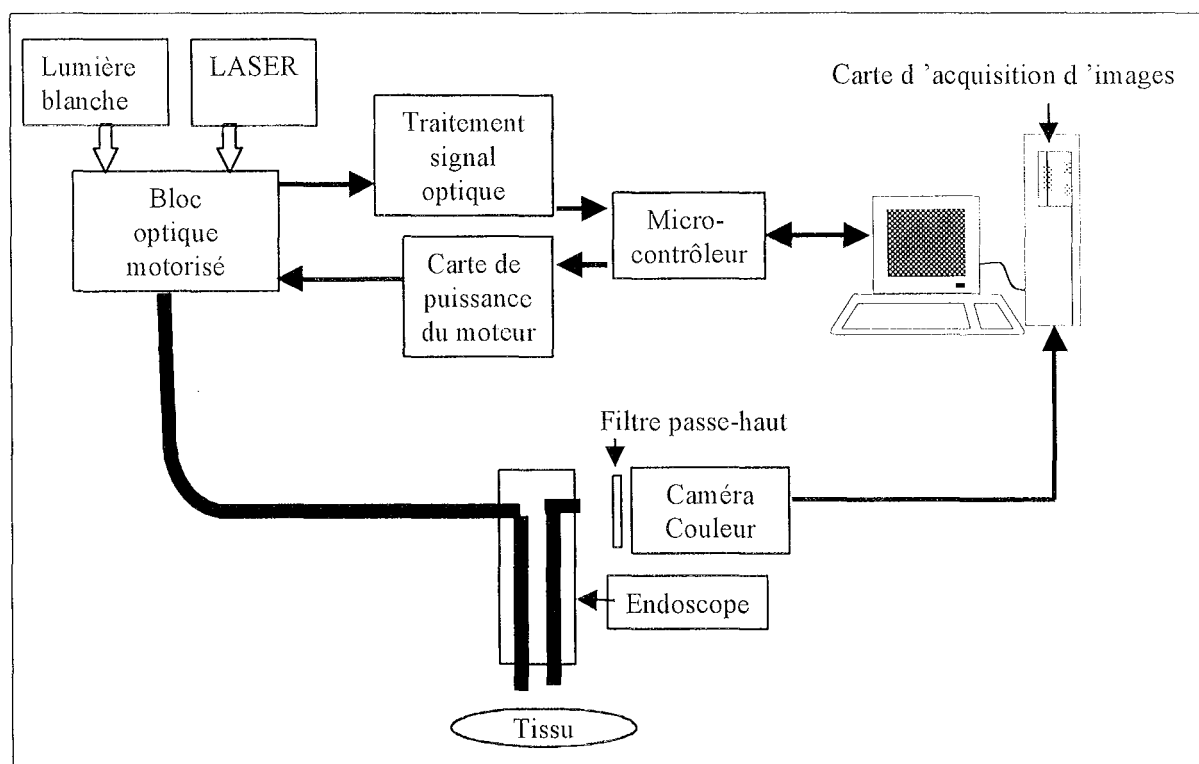


Figure 1.1 : Schéma synoptique du système d'imagerie de fluorescence

Le système global comprend une source de lumière blanche et une source LASER de SPECTRA PHYSIC (Argon émettant à 475 nm ou Krypton émettant à 407 nm). Ces deux sources sont couplées à la même fibre optique via un système optique motorisé. La fibre optique traverse le canal de biopsie de l'endoscope pour exciter le tissu. Le signal émis est capté par la caméra munie d'un filtre passe-haut permanent qui filtre la lumière d'excitation

réfléchi ($\lambda_{\text{transmission}} \geq 500 \text{ nm}$). Le signal analogique issu de la caméra couleur COHU, est digitalisé par la carte d'acquisition d'images MATROX COLOR, puis visualisé sur l'écran du PC (Personal Computer) Pentium 75. Cette opération se fait en synchronisation entre les deux types d'illumination via un échange de signaux électroniques entre différents modules (un capteur optique, le PC et le micro-contrôleur) [138][139][140].

2. Caractéristiques de la caméra

La plupart des dispositifs d'imagerie de fluorescence comportent deux caméras : une caméra noir et blanc très sensible destinée à l'acquisition du signal de fluorescence, et une autre caméra couleur destinée à l'acquisition de l'image en lumière blanche. L'utilisation de deux caméras rend le système encombrant et lourd. Pour éviter cela, nous avons décidé d'employer une seule caméra couleur. Ce choix est également justifié par le fait que le signal de fluorescence induit est plus important avec les nouvelles drogues (comme la mTHPC et la PpIX). L'utilisation d'une caméra intensificatrice n'est par conséquent pas nécessaire. Nous avons donc exploité la caméra couleur dont nous disposions : Cohu (8310 PAL/Y-C Solid-State CCD Color Camera).

2.1. Données du constructeur

C'est une caméra couleur mono CCD (Charge Coupled Device) principalement caractérisée par :

- deux sorties analogiques (PAL/Y-C),
- une sensibilité de 13 lux en mode normal et de 1.1 lux en mode AGC (Automatic Gain Control),
- une matrice de filtres cyan, jaune, magenta et vert disposée en mosaïque, placée devant la CCD et dont les réponses spectrales sont représentées sur la figure 2.1.1,
- l'absence d'une entrée de déclenchement ; en d'autres termes, l'acquisition d'images se fait en continu et ne pourra pas être déclenchée par un signal électronique externe.

Compte tenu de la différence de luminosité qui existe entre l'image de fluorescence et l'image en lumière blanche, il serait préférable d'acquérir l'image de fluorescence en mode intégration de façon à cumuler un nombre suffisant de photons et l'image en lumière blanche en mode normal ou en mode obturation de façon à compenser le temps nécessaire à l'acquisition de l'image de fluorescence. Cette caméra, bien que possédant ces deux modes, n'a pas de commande électronique. Par conséquent, nous avons adopté le mode normal

d'acquisition dans les deux cas pour pouvoir comparer les signaux mesurés. Une image est obtenue en 40 ms.

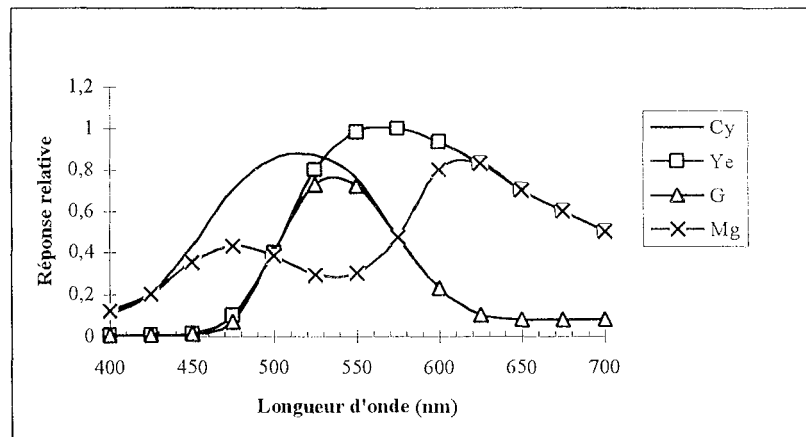


Figure 2.1.1 : Réponses des filtres Cyan, jaune vert et Magenta de la caméra Cohu

La CCD possède une matrice de filtres cyans, jaunes, magentas et verts permettant d'obtenir l'image couleur.

Les quatre composantes couleurs obtenues en sortie de la mosaïque de filtres de la caméra, sont combinées de façon à fournir deux signaux différents S1 et S2 sur deux lignes consécutives (avec Mg : magenta ; Ye jaune ; G : vert ; Cy cyan) :

$$S1 = Mg+Ye; S2 = G+Cy \text{ sur les lignes } N$$

$$S1 = G+Ye; S2 = Mg+Cy \text{ sur les lignes } N+1$$

La combinaison des signaux lumineux en sortie des filtres qui permet d'obtenir le signal électronique final (signal PAL), est donnée dans la figure 2.1.2.

Vue la disposition coplanaire de ces filtres où chaque élément est placé devant un pixel, une information couleur de la scène ne peut être obtenue qu'avec la combinaison de quatre pixels voisins. Ceci a pour conséquence, d'une part de diminuer la résolution et d'autre part, de créer une distorsion des images lors de leur conversion en mode RVB par la carte d'acquisition.

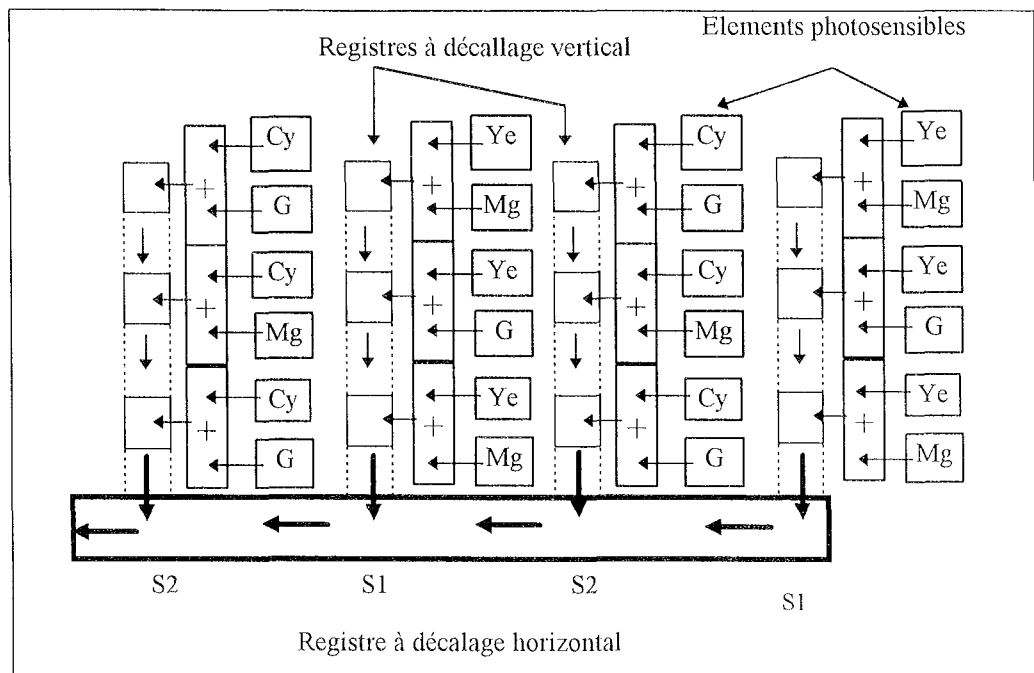


Figure 2.1.2 : Diagramme fonctionnel de l'association des pixels dans une image couleur

2.2. Détermination des réponses de la CCD filtrée en fonction de la longueur d'onde de la lumière reçue

La mosaïque de filtres représente un élément important dans notre étude. En effet, mis à part son intérêt pour obtenir une image couleur, elle permet de séparer le signal d'autofluorescence et de fluorescence induite. Pour connaître le filtrage effectué sur le signal d'entrée, nous avons déterminé expérimentalement la réponse de ces filtres à partir de la carte d'acquisition d'images. En d'autres termes, nous mesurons les trois fonctions de transfert ayant pour signal d'entrée une lumière polychromatique (signal de fluorescence) et pour signaux de sortie respectifs, l'intensité de rouge, l'intensité du vert et celle du bleu de l'image couleur digitalisée. Le faisceau n'est pas ponctuel mais éclaire une certaine surface. Par conséquent, au niveau de l'image, les trois intensités qui sont associées au faisceau, correspondent à la moyenne obtenue sur une région d'intérêt de l'image.

Les fonctions de transfert sont données en intensités du rouge, du vert ou du bleu en fonction de la longueur d'onde.

Nous avons donc exposé la caméra à une série de faisceaux monochromatiques dont la longueur d'onde varie de 400 nm à 710 nm. Pour cela, nous avons utilisé une source de lumière blanche et un monochromateur. Le spectre d'émission de la lampe n'est pas constant, par conséquent la puissance des faisceaux de sortie est variable en fonction de la longueur d'onde. Il faut donc normaliser les intensités mesurées par rapport à la puissance

de chaque faisceau. Cette normalisation est conditionnée par la linéarité en puissance du système. Ceci est bien vérifié comme nous pouvons le constater sur la figure 2.2.1 qui représente la variation des l'intensités du vert, du rouge et bleu en fonction de la puissance du faisceau en μW .

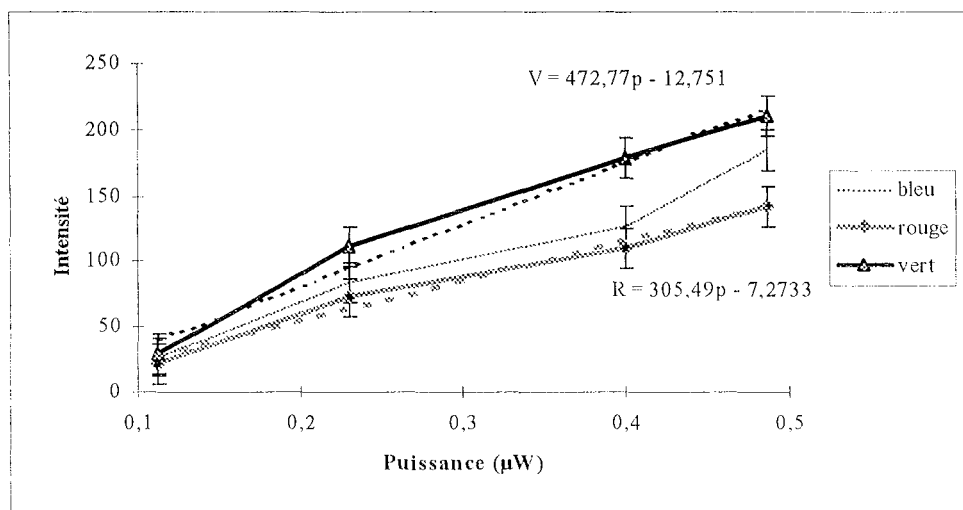


Figure 2.2.1 : Réponse en puissance de la CCD de la caméra Cohu

La normalisation est effectuée en faisant le rapport de la puissance maximale en sortie du monochromateur sur la puissance du faisceau à cette longueur d'onde.

Les graphes correspondant à la variation des intensités des voies rouge, verte et bleue en fonction de la longueur d'onde, sont normalisés par rapport à l'intensité maximale.

Les réponses RVB du système d'acquisition sont données dans la figure 2.2.2, avec en abscisses, la longueur d'onde et en ordonnées le « transfert » dont le maximum est 1.

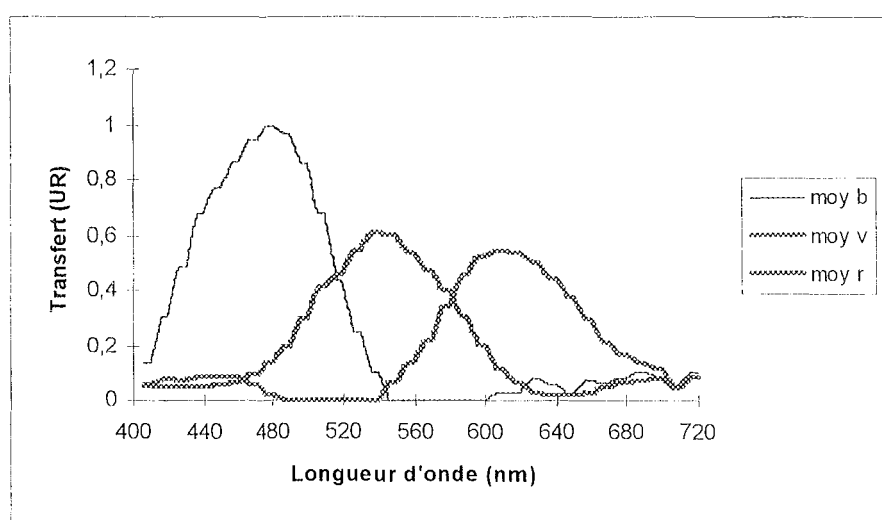


Figure 2.2.2 : Réponses RVB des filtres de la caméra Cohu

Ces courbes sont notées moy r, moy v et moy b par rapprochement avec les composantes rouge verte et bleue de l'image RVB. De plus, le terme « moy » fait référence au fait que chaque point correspond à la moyenne des intensités d'une région d'intérêt de l'image. D'autre part, comme le transfert est caractéristique des filtres, nous parlerons de réponses RVB des filtres.

Comme nous travaillons avec un filtre passe-haut permanent placé devant la CCD, nous avons également déterminé de la même manière, la réponse RVB des filtres en série avec le filtre passe-haut le plus fréquemment utilisé (fréquence de coupure : 520 nm)(figure 2.2.3).

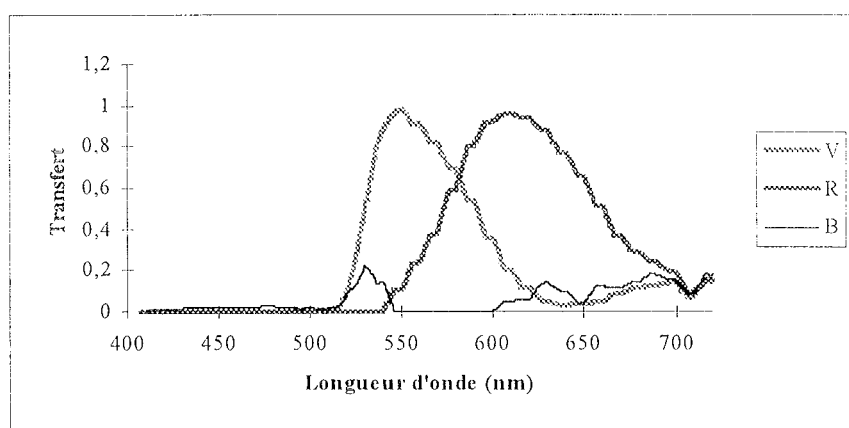


Figure 2.2.3 : Réponse des filtres RVB en cascade avec le filtre passe-haut à 520 nm

Grâce à ces données , nous savons comment le signal de fluorescence sera séparé au niveau de l'image couleur digitalisée.

Nous ne nous intéressons pas à la séparation spectrale de l'image en lumière blanche.

3. Les sources de lumière

L'illumination des tissus est assurée par une source en lumière blanche refroidie OLYMPUS Modèle CLK-3E (1A, 220 V; 50-60 Hz). Elle est munie d'une lampe : ESRAM HLX XENOPHOT 150 W.

Cette lampe à base d'halogène et de Xénon appartient à une série d'une construction spéciale dont les informations techniques comme le spectre d'émission, ne sont plus disponibles chez le constructeur : nous l'avons donc mesuré par spectrofluorimétrie. Il est représenté par la figure 3.1, dans laquelle l'intensité lumineuse présentée en unités arbitraires, est donnée en fonction de la longueur d'onde.

Le spectre d'émission est maximal dans le rouge et le proche infra-rouge et beaucoup plus faible dans l'UV, le violet et le bleu. Donc, la lampe émet de la chaleur et peu de lumière

bleue ou violette.

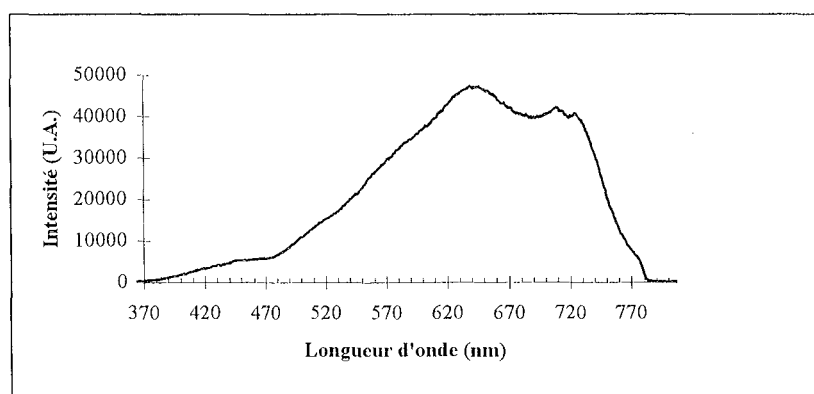


Figure 3.1 : Spectre d'émission de la source de lumière blanche

Une mesure de la puissance de la source dans la zone spectrale limitée à 450 nm (de l'UV au bleu) donne 40 μW en sortie de fibre. Il n'est donc pas possible d'utiliser cette lampe en excitation de fluorescence. Par conséquent, elle sera seulement utilisée pour l'obtention des images en lumière blanche. Dans ce cas, la faible puissance dans le bleu est un avantage car cela diminue le photoblanchiment.

La lampe est solidaire d'un miroir sphérique et son filament est placé au foyer de la sphère de façon à fournir un faisceau de sortie parallèle (en théorie). Cette sortie sera d'abord focalisée et déviée avant d'atteindre le site à illuminer : le module qui permet cette opération sera exposé dans la partie optique.

La lumière d'excitation sera produite par l'un des LASERs Argon ou Krypton dont nous avons donné les références en début de cette partie.

Le LASER Argon émet plusieurs raies : 514 nm, 475 nm et 488 nm, lorsqu'il est muni d'un prisme de séparation. Pour notre étude, nous utilisons la raie 475 nm. La puissance à cette longueur d'onde peut atteindre quelques watts (3W - 5W), ce qui permet d'avoir une bonne marge pour les pertes de puissance à travers les fibres de transmission et le système optique. Le laser Krypton dont le spectre d'émission est donné à la figure 3.2 possède deux pics à 407 et 413 nm.

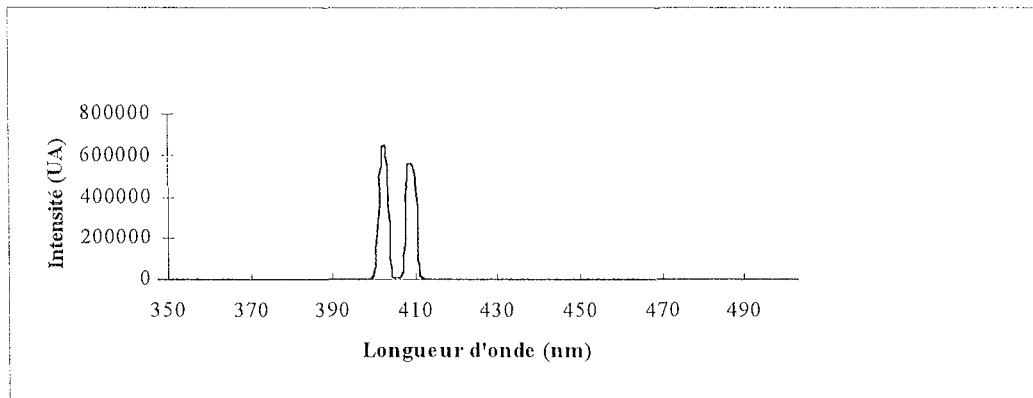


Figure 3.2 : Spectre d'émission du laser Krypton

Compte tenu des spectres d'absorption des fluorophores endogènes et en particulier du NADH, le diagnostic par autofluorescence serait intéressant avec un laser qui émet dans l'UV. C'est le cas du laser Azote (338 nm). Vers 410-420 nm, ce sont les flavines et les porphyrines endogènes qui sont essentiellement excitées. Par conséquent et compte tenu des raies des lasers Krypton et Argon, le diagnostic par autofluorescence se fera avec le laser Krypton. Ce choix se justifie également par le fait que la pénétration de la lumière à 388 nm est plus faible qu'à 407 nm et 413 nm, on a donc une meilleure exploration des tissus avec les plus grandes longueurs d'onde.

Dans le cas du diagnostic par fluorescence induite, tout dépend du photosensibilisant adopté. Nous considérons en particulier la mTHPC qui a un pic d'absorption autour de 400 nm et qui n'absorbe presque rien autour de 475 nm (figure 3.3) ; le signal de fluorescence induite est indétectable si l'excitation est faite à 475 nm.

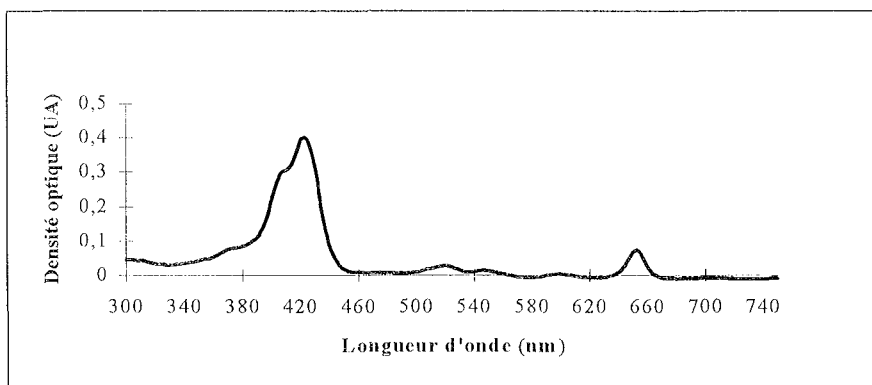


Figure 3.3 : Spectre d'absorption de la mTHPC diluée dans du PBS avec 2% de sérum de veau fœtal

Ce signal sera meilleur pour une excitation autour de 420 nm. Cette longueur d'onde correspond, à quelques nanomètres près, aux bandes bleues du LASER Krypton (figure 3.2) qui sera choisi pour faire du diagnostic par fluorescence induite. La puissance de sortie du faisceau est limitée à 600 mW dans le cas optimal de focalisation.

En conclusion le LASER Krypton est préférable tant pour l'autofluorescence que pour la fluorescence induite.

4. Module optique

4.1. Optique d'adaptation du cystoscope à la caméra

La saisie des images de fluorescence et de celles en lumière blanche se fait par la caméra CCD couleur via un outil endoscopique dont le choix se fait en fonction du site à explorer : pour la vessie, on utilise un cystoscope.

Le schéma d'un cystoscope est donné par la figure 4.1.1. Il s'agit d'un outil rigide, qui permet de transmettre l'image de la vessie vers l'oculaire et la caméra. La transmission de l'image se fait par l'intermédiaire de lentilles.

L'illumination du site exploré est effectuée par un faisceau de fibres optiques. Dans le cas du modèle de la figure 4.1.1, le faisceau de fibres forme un anneau autour de l'objectif.

Le cystoscope est inséré dans une gaine métallique (représentée en pointillés dans la figure 4.1.1.)

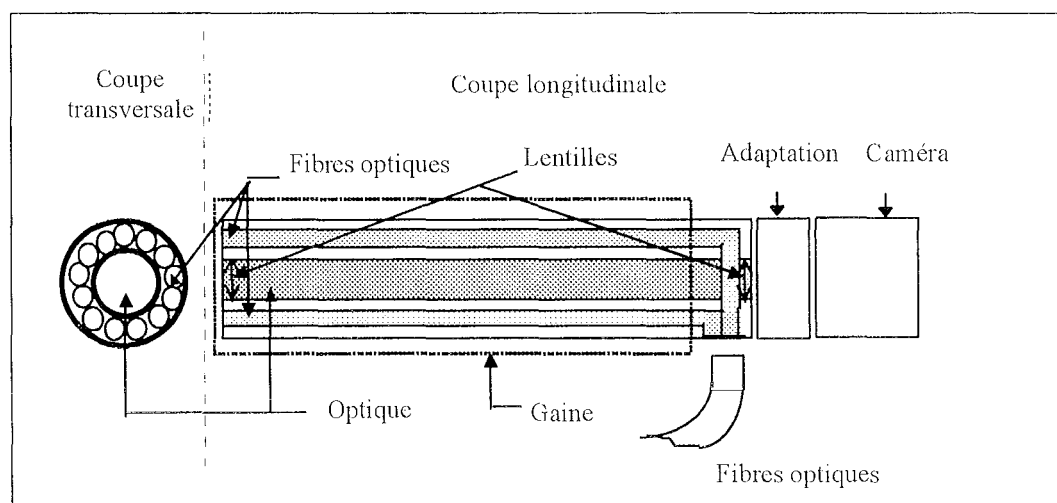


Figure 4.1.1 : Schéma d'un cystoscope rigide optique à 0°, vision axiale

La coupe transversale de l'ensemble est donnée par la figure 4.1.2.

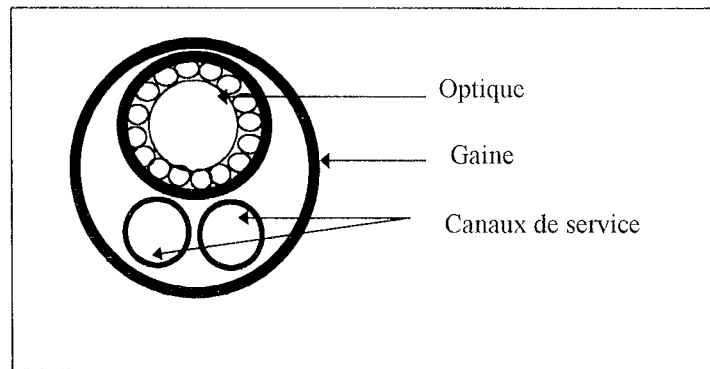


Figure 4.1.2 : Coupe transversale de la gaine

La caméra a été adaptée au cystoscope. Pour réaliser cette adaptation optique, nous avons étudié les propriétés de l'oculaire. L'image de l'objet est nette à une distance D en sortie du cystoscope et présente un grossissement G défini par le rapport H/h (figure 4.1.3).

Il faut faire en sorte que l'image se projette sur les récepteurs CCD de la caméra. Comme D est grande, l'utilisation d'une simple pièce rigide de longueur D entre le cystoscope et la caméra augmenterait l'encombrement de l'outil que le praticien manipule en permanence durant un examen.

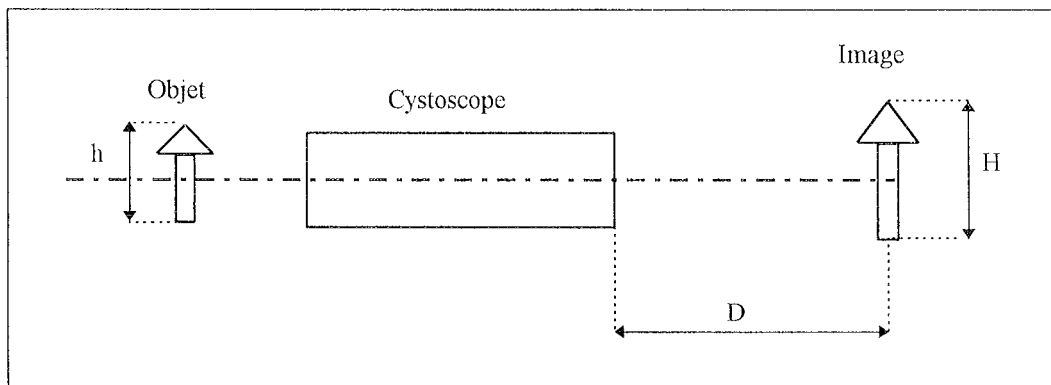


Figure 4.1.3 : Caractéristiques de transfert de l'objet

Pour réduire cette distance, il faut avancer le plan image, ce qui est réalisé en plaçant une lentille convergente. Cette dernière se situe dans une pièce métallique composée de deux parties : l'une pouvant coulisser à l'intérieur de l'autre de façon à faire un réglage fin pour ajuster correctement la position de la caméra par rapport au plan image (figure 4.1.4).

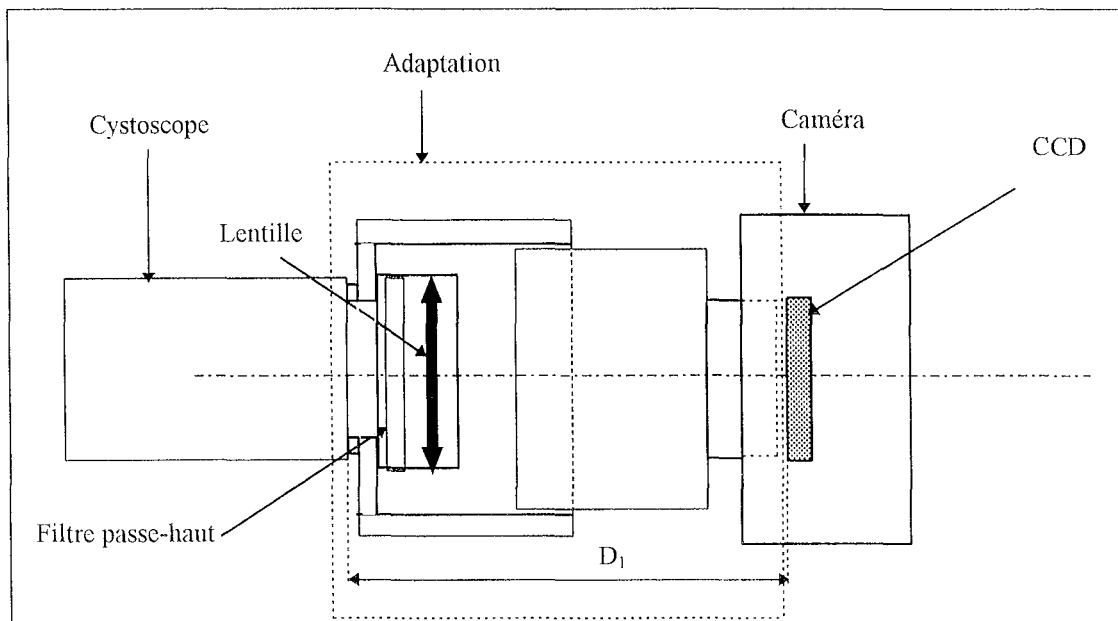


Figure 4.1.4 : Adaptation optique entre le cystoscope et la caméra

Le filtre passe-haut qui filtre la lumière d'excitation, est situé dans l'adaptateur.

Pour notre étude, nous disposons de deux cystoscopes qui ne présentent pas la même divergence.

Pour le cystoscope N°1 caractérisé par son diamètre $d=4$ mm (faible ouverture numérique), la lentille utilisée a une distance focale de 15 mm et un diamètre de 12 mm, tandis que pour le cystoscope N°2 caractérisé par son diamètre $d=8$ mm, la lentille utilisée a une distance focale de 20 mm et un diamètre de 20 mm.

Le choix des lentilles s'est fait dans un lot déjà disponible. C'est pour cette raison que leur diamètre est beaucoup plus grand que celui des cystoscopes. Ceci n'a pas d'influence sur la qualité du signal optique du moment qu'ils permettent une ouverture numérique supérieure à celle du cystoscope.

Etude de l'influence de l'objectif sur le signal mesuré

L'image est focalisée sur les récepteurs de la CCD :

- soit par un objectif standard (cosmicar TV zoom lens 12.5.. 75 mm 1:1.8 N°. 27518), pour une application externe,
- soit par la bague d'adaptation du cystoscope.

Nous avons mesuré le rendement entre des deux montages en considérant comme référence le signal émis par un fantôme qui fluoresce dans le vert et dans le rouge. Le rapport de la réponse de l'objectif sur celle du cystoscope qui a le plus grand diamètre (cystoscope N°.2) donne une valeur de 10 pour la composante rouge et de 7 pour la composante verte. Avec

l'objectif standard, on pourrait mesurer un signal 7 à 10 fois plus faible que celui mesuré qu'avec le cystoscope N°.2.

En raison de cette énorme perte de signal et compte tenu du fait que le cystoscope N°.1 transmet beaucoup moins de lumière que le N°.2 (à cause de son diamètre deux fois plus petit), c'est le deuxième cystoscope qui a été choisi.

4.2. Optique de transmission de la lumière blanche et du LASER

Comme nous utilisons une seule caméra pour l'acquisition de l'image de fluorescence et l'image en lumière blanche, il faut alterner l'illumination par le laser et par la lumière blanche. Les images résultantes devant être comparées, les deux illuminations doivent être similaires pour la distribution de la lumière sur le site. Aussi, nous avons décidé de n'utiliser qu'une seule fibre optique pour les deux sources de lumière. Un module optique a été développé pour cela, il est représenté par la figure 4.2.1.

La lumière blanche et le LASER sont d'abord déviés de façon à devenir colinéaires et à atteindre la même fibre de sortie F2.

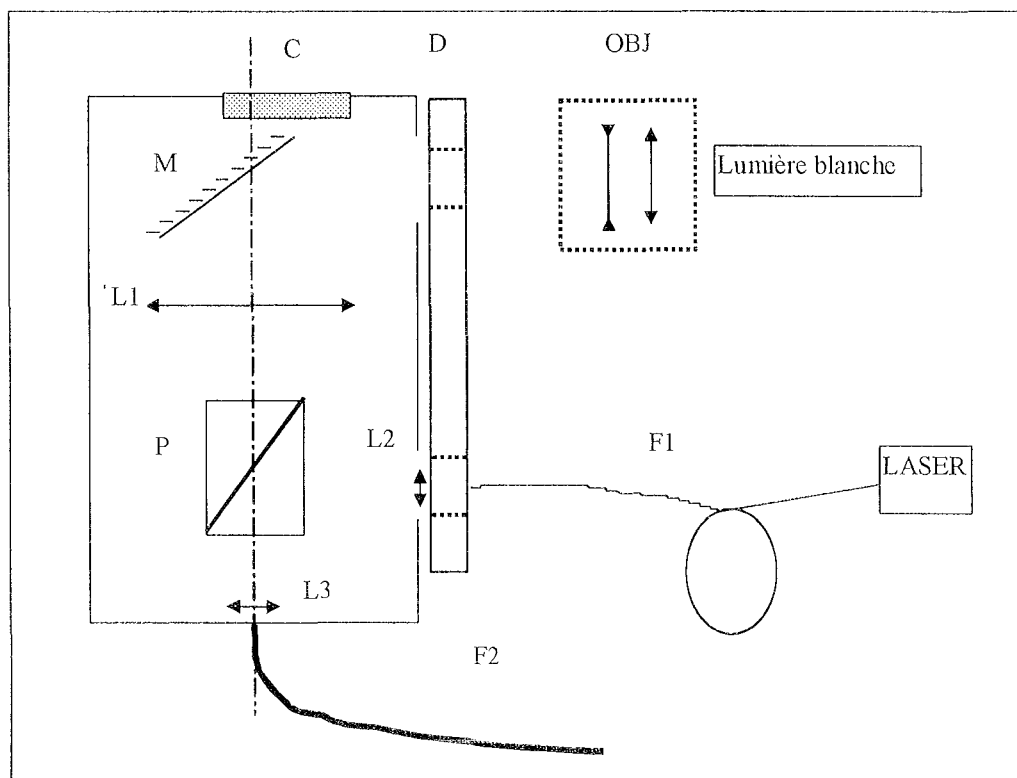


Figure 4.2.1 : Boîtier optique d'obturation et de déviation des deux sources de lumière
(L1, L2, L3 : lentilles ; M : miroir ; P : double prisme ; F1, F2 : fibres optiques ; OBJ : objectif ;
C : diode photosensible ; D : module d'obturation motorisé)

La transmission de la lumière blanche

La lampe de la source de lumière blanche dotée d'un miroir demi-sphérique doit fournir un faisceau de lumière parallèle si son filament est ponctuel et placé exactement au foyer du miroir, ceci selon la loi de réflexion appliquée pour les miroirs sphériques [83].

Cependant ce filament n'est pas ponctuel de telle sorte qu'une partie de la lumière est projetée avec une certaine divergence (figure 4.2.2.).

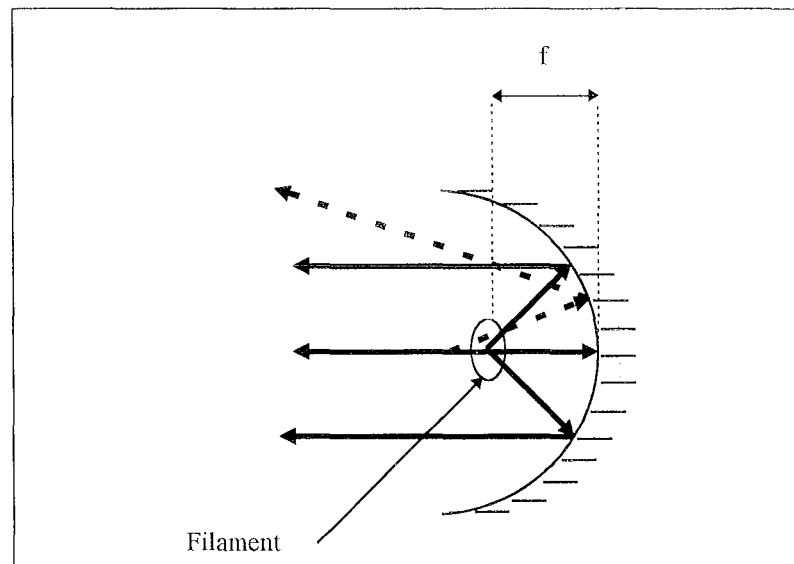


Figure 4.2.2 : Réflexion de la lumière blanche par le miroir sphérique concave
(traits pleins : faisceau provenant du foyer ;
traits pointillés : faisceaux provenant du voisinage du foyer)

Il faut diminuer le diamètre du faisceau de lumière de façon à le focaliser sur une fibre optique d'un diamètre de $800 \mu\text{m}$. Pour cela, nous avons placé devant la lampe un objectif de microscope ayant un grossissement de 12.5 et composé d'une lentille convergente et d'une lentille divergente. Le principe d'action de cet objectif sur un faisceau de lumière parallèle est représenté dans la figure 4.2.3. Ce dernier est disposé à l'envers de façon à diminuer la taille du faisceau.

Le faisceau de sortie est parallèle et a un diamètre plus petit que celui du faisceau d'entrée. Compte tenu du fait que les faisceaux provenant de la source de lumière ne sont pas tous parallèles, le faisceau en sortie de cet objectif n'est pas parallèle mais largement convergent. Ce dernier est ensuite réfléchi par le miroir M : son image par M est un faisceau divergent. Pour pouvoir le focaliser sur la fibre de sortie F_2 , nous plaçons sur son chemin les lentilles convergentes L_1 et L_3 (figure 4.2.1.).

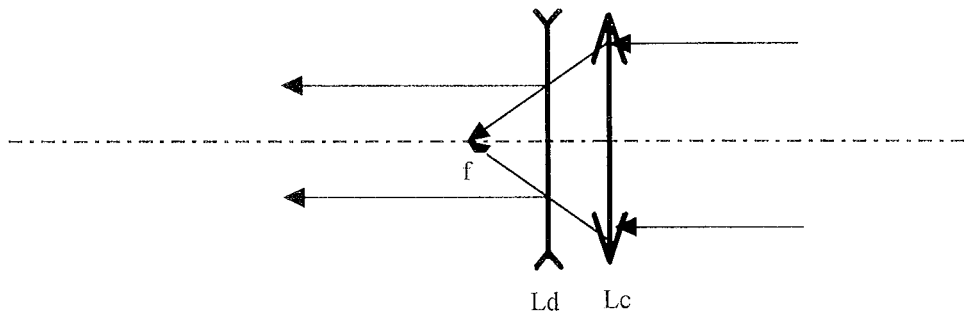


Figure 4.2.3 : Principe d'action d'une lentille convergente et d'une lentille divergente sur un faisceau parallèle

Un double prisme P est également disposé entre les deux lentilles L_1 et L_3 , il transmet le faisceau de lumière blanche sans réfraction mais avec 50% de pertes.

En ce qui concerne le faisceau LASER, il est dévié à 90° par le double prisme sur le plan de séparation des deux prismes. Il subit alors 50% de pertes.

Avant de subir cette réflexion, le faisceau LASER est focalisé à l'entrée du prisme par la lentille convergente L_2 . Enfin, comme pour la lumière blanche, il est focalisé sur la fibre F_2 au moyen de la lentille L_3 .

La fibre de sortie F_2 (Patrick Thielen Microtechnique, FD2) est choisie de façon à fournir un faisceau homogène dont le profil donné par le constructeur est représenté par la figure 4.2.4.

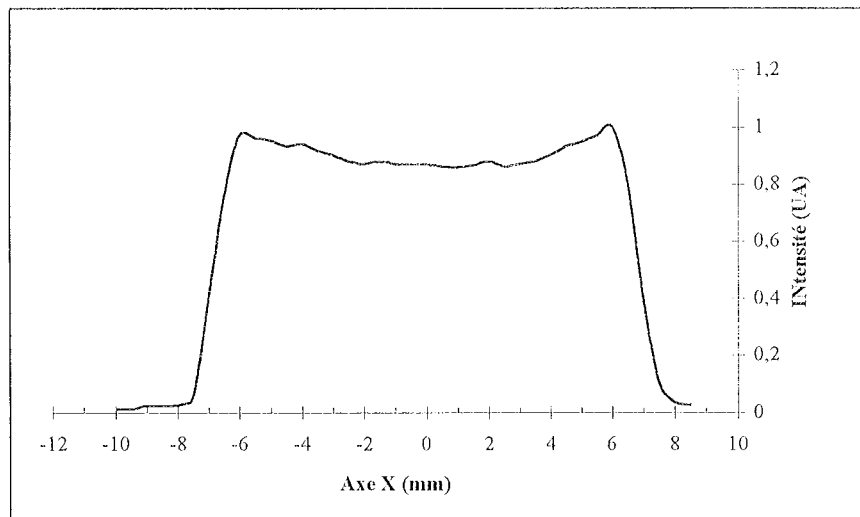


Figure 4.2.4 : Profil de l'intensité lumineuse en sortie de la fibre F_2

Dans cette figure, la distance de chaque point par rapport au centre du faisceau est représentée en abscisses et l'intensité est exprimée en unités arbitraires en ordonnées.

5. Module mécanique

5.1. Description

Nous nous intéressons à présent au module d'obturation D (figure 4.2.1) dont le rôle est de permettre le passage d'une seule lumière à la fois (soit la lumière blanche soit le laser). Pour y parvenir, nous avons mis au point une pièce en aluminium P, composée de trois éléments P1, P2 et P3 (figures 5.1.a et 5.1.b).

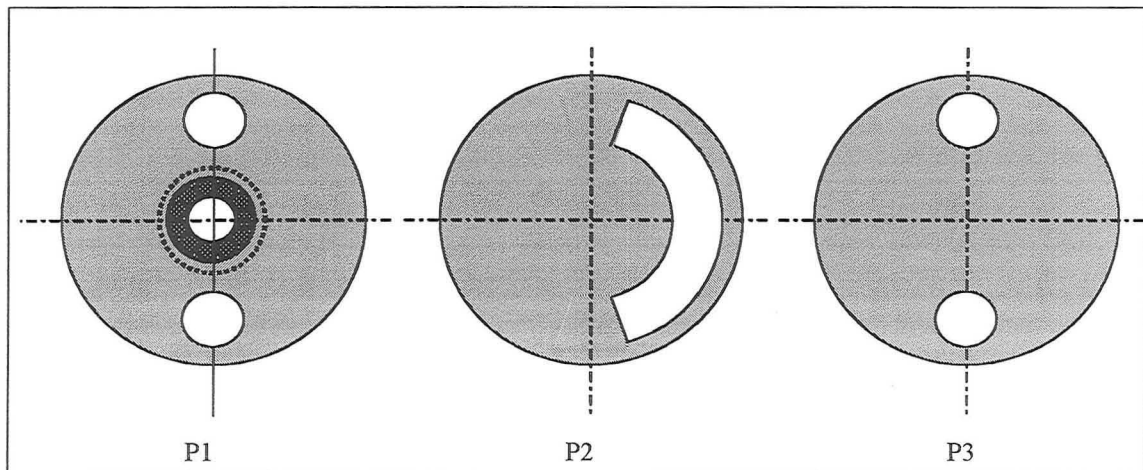


Figure 5.1.1.a : Module d'obturation (vue de face)
(l'élément P1 loge un roulement R, P2 est la partie mobile et P3 est un couvercle solidaire à P1.)

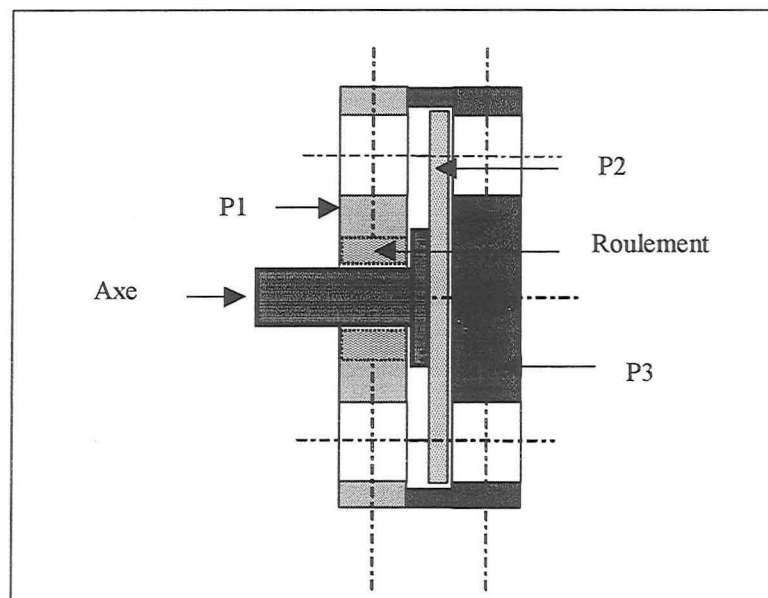


Figure 5.1.1.b : Module d'obturation (vue de profil)

P2 est mobile, il comprend une ouverture en forme d'arc ; Il est solidaire à un axe monté dans un roulement R fixé sur l'élément P1. P1 et P3 sont fixes et solidaire, ils comportent

deux trous alignés, l'un en face de la source de lumière blanche, le second en face du LASER. Le passage de la lumière sera possible lorsque l'ouverture de P2 est aligné avec les ouvertures correspondantes. P2 est entraîné par un moteur pas à pas (ESCAP p532) et ouvre alternativement le passage de la lumière blanche et du laser .

Le rotor de ce moteur est constitué d'un aimant en terre rare en forme de disque mince. Un tel rotor possède une très faible inertie, ce qui se traduit aussi par des vitesses de démarrage très élevées et une très bonne accélération. Ces caractéristiques sont idéales pour notre application car le moteur sera amené à accélérer rapidement et à s'arrêter sur une durée de 40 ms et sur 50 pas environ.

Le moteur comprend quatre phases, pouvant être connectées en série ou en parallèle. Dans ce dernier cas, le moteur pourra supporter une charge plus importante mais sera limité en vitesse d'entraînement.

Le montage du moteur M sur le module d'obturation P2 est donné par la figure 5.1.2. Dans cette figure, l'entraînement de P2 par M se fait par l'intermédiaire de deux poulies identiques P et d'une courroie C.

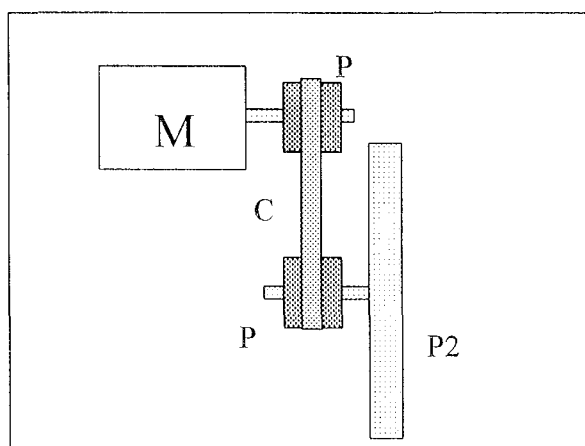


Figure 5.1.2 : Montage du moteur pas à pas sur le disque d'obturation D

Le moteur est commandé par une carte de puissance EDI 201 qui est liée au moteur via son connecteur 32 broches.

5.2. Commande du moteur pas à pas

Un moteur démarré dans la zone d'arrêt-démarrage peut être accéléré en accroissant progressivement la fréquence des impulsions de commande [82].

Ainsi pour arriver à la vitesse optimale du moteur, il faut d'abord passer par des vitesses intermédiaires convenables pour la phase de démarrage. De même, pour s'arrêter, il faut diminuer progressivement la vitesse.

Dans notre cas particulier, le moteur pas à pas doit entraîner le disque P2 jusqu'à ce que son ouverture en forme d'arc, soit en face de la lumière blanche. A ce moment, il doit s'arrêter jusqu'à la fin de l'acquisition de l'image du tissu ainsi éclairé par la lumière blanche. Ensuite le moteur doit redémarrer, accélérer, puis décélérer avant de s'arrêter lorsque l'ouverture est en face du LASER (après avoir effectué un angle de $\pi/2$). Une fois que l'image de fluorescence induite par le laser est saisie, le moteur doit entamer une autre étape de démarrage accélération décélération et arrêt jusqu'à arriver à sa position initiale. Ce processus est infiniment répété jusqu'à la demande d'arrêt par l'utilisateur.

Pour réaliser une telle commande, nous avons programmé un micro contrôleur (MC68HC11A8) dont l'un des signaux de sortie représente le signal d'entrée d'horloge de la carte de puissance du moteur pas à pas. La vitesse du moteur diminue si la période de l'horloge de commande augmente et vice versa.

Le programme écrit en assembleur, répond aux équations suivantes qui donnent l'expression de la fréquence f de l'horloge, en fonction du nombre de pas n effectués par le moteur, et des fréquences minimale et maximale respectives f_1 et f_2 .

Pour n compris entre 0 et N_1 (phase de démarrage et d'accélération) :

$$f = \frac{(f_2 - f_1)n + N_1 f_1 - f_2}{N_1 - 1}$$

pour n compris entre N_2 et N_{\max} (phase de décélération et d'arrêt) :

$$f = \frac{(f_2 - f_1)n + N_2 f_1 - N_{\max} f_2}{N_2 - N_{\max}}$$

pour n compris entre N_1 et N_2 (vitesse constante maximale) :

$$f = \frac{-f_2 n + (2N - 1)f_2}{N - 1}$$

Dans notre application nous avons pris :

$$N_1 = N_2 = 1; f_1 = 200 \text{ Hz}; f_2 = 600 \text{ Hz}$$

Le choix de f_2 est guidé par les caractéristiques du moteur (régime optimal de fonctionnement), tandis que le choix de f_1 est fixé à la suite d'essais avec comme limite inférieure celle dont le dépassement provoque la saccade des images. La valeur adoptée de 200 Hz est celle qui a permis un fonctionnement correct du moteur (pas de saut de pas).

6. Module électronique

6.1. Description du matériel et du logiciel de la carte d'acquisition d'images

Il s'agit de la carte d'acquisition d'images couleur : MAGIC COLOR de chez MATROX. Elle est installée sur le bus EISA du PC.

Nous l'avons choisie car elle présente l'avantage de pouvoir s'adapter à n'importe quel type de caméra, partant du principe que la caméra utilisée qui délivre un signal analogique PAL, pourrait être remplacée à l'avenir. La carte possède 3 Mo de RAM et permet un transfert très rapide des données (transfert DMA jusqu'à 33 Mo/s). Les intensités sont codées en 8 bits ce qui correspond à une échelle variant de 0 à 255.

Cette carte possède également un connecteur à 40 broches normalement destiné pour une entrée/sortie digitale. Ce dernier a été exploité en partie, pour contrôler les entrées/sorties de quelques signaux TTL.

La carte d'acquisition d'images est fournie avec une bibliothèque de fonctions spécifiques. Ces fonctions sont classées selon les groupes suivants :

- commandes de contrôle du système,
- module d'acquisition (fonctions de contrôle de la caméra et du mode d'acquisition),
- module d'affichage,
- module d'entrée sortie (lecture et écriture entre la carte et le PC),
- module de traitement d'images.

Ce dernier module comprend les fonctions de base telles que les fonctions de traitement arithmétique entre images, la convolution d'une image avec un ou deux noyaux, le calcul d'histogramme...

Un connecteur 25 broches mâle a été réalisé et permet de relier la carte d'acquisition d'images et plus précisément son connecteur 40 broches avec un boîtier électronique externe.

Seules les entrées/ sorties : GRAB, USER IN, USER OUT0 sont considérées et permettent respectivement de :

- déclencher l'acquisition d'images sur front montant ou descendant,
- recevoir un signal TTL externe,
- envoyer un signal TTL.

6.2. Le micro-contrôleur

Pour commander le moteur pas à pas, il faut envoyer des impulsions d'horloge à la carte de puissance aux fréquences spécifiées dans le paragraphe précédent. Pour $f_2 = 600$ Hz la durée d'une demi période d'une impulsion de commande est de 0.5 ms. Nous avons d'abord pensé commander cette carte par le micro-processeur du PC en utilisant les commandes DOS qui donnent accès à l'heure de l'ordinateur. Ces commandes comme « `_dos_gettime()` », ont une précision de 10 ms, ce qui est insuffisant.

Une autre fonction plus précise lit la valeur de l'horloge « `clock()` ». Il est possible de simuler un compteur en exécutant un certain nombre de fois, une instruction de durée d'exécution connue, jusqu'à atteindre le délai d'attente souhaité. Par ailleurs, la commande d'acquisition et de traitement d'images se fait sur le PC avec un programme s'exécutant dans un environnement Windows, où il est déconseillé de manipuler des commandes DOS.

Finalement, nous avons décidé de commander le moteur avec un micro-contrôleur pour ces raisons.

Un micro-contrôleur, est un circuit intégré à grande échelle (HSI) possédant toutes les fonctions élémentaires d'un microprocesseur réunies dans un seul boîtier comprenant : unité centrale, mémoires, périphériques d'entrées et de sorties, compteur programmable, convertisseur analogique-numérique et liaisons séries. Nous avons choisi de commander le moteur pas à pas par le micro contrôleur MC68HC11A8.

6.3. La diode photosensible

La diode photosensible, placée dans le boîtier optique de déviation des deux sources de lumière (figure 4.2.1), permet de détecter le passage de la lumière blanche par le module d'obturation D.

Nous avons mis au point un montage électronique pour la mise en forme du signal délivré par la diode photosensible.

La diode est branchée en court circuit à l'entrée d'un amplificateur inverseur AD 349 (figure 6.2.1), de manière à obtenir un courant d'entrée proportionnel au flux de lumière reçu. Un filtre passe bas (fréquence de coupure $f=1/2\pi RC=16$ Hz) [163] est placé en sortie de l'amplificateur de façon à éliminer les fréquences parasites notamment celle du secteur (50 Hz). Cette dernière sortie est mise sous forme TTL par une bascule de Schmitt MC14093BC (FFFL 9413) dont la fonction est un « nand » logique. Le signal final de sortie est alors à 0V lorsqu'il n'y a pas de la lumière et à 5V dans le cas contraire. Nous ne nous intéressons pas à la quantification de la lumière mais à sa présence ou à son absence. Pour cela, les résistances utilisées sont choisies de façon à fournir un signal supérieur au seuil

minimal correspondant à un 1 logique à l'entrée de la bascule de Schmitt dès que la lumière passe. Pour cette raison le boîtier optique est complètement isolé de la lumière ambiante.

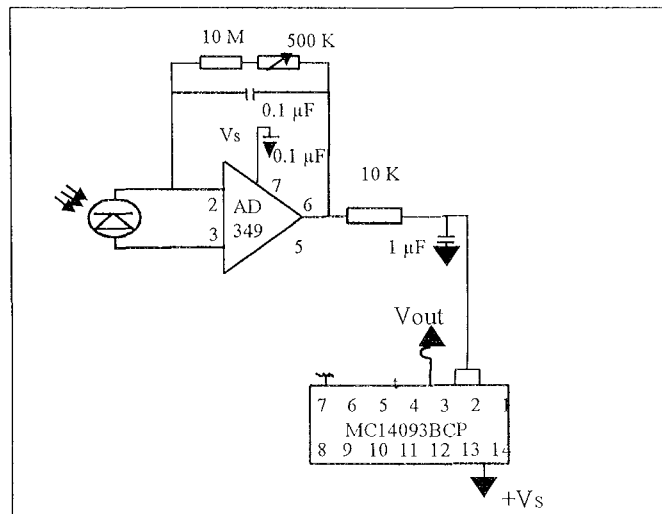


Figure 6.2.1 : Schéma descriptif de la carte de mise en forme du signal photoélectrique

7. Commande

Le chronogramme des signaux échangés entre le PC, le capteur et le micro-contrôleur est donné par la figure 7.1.

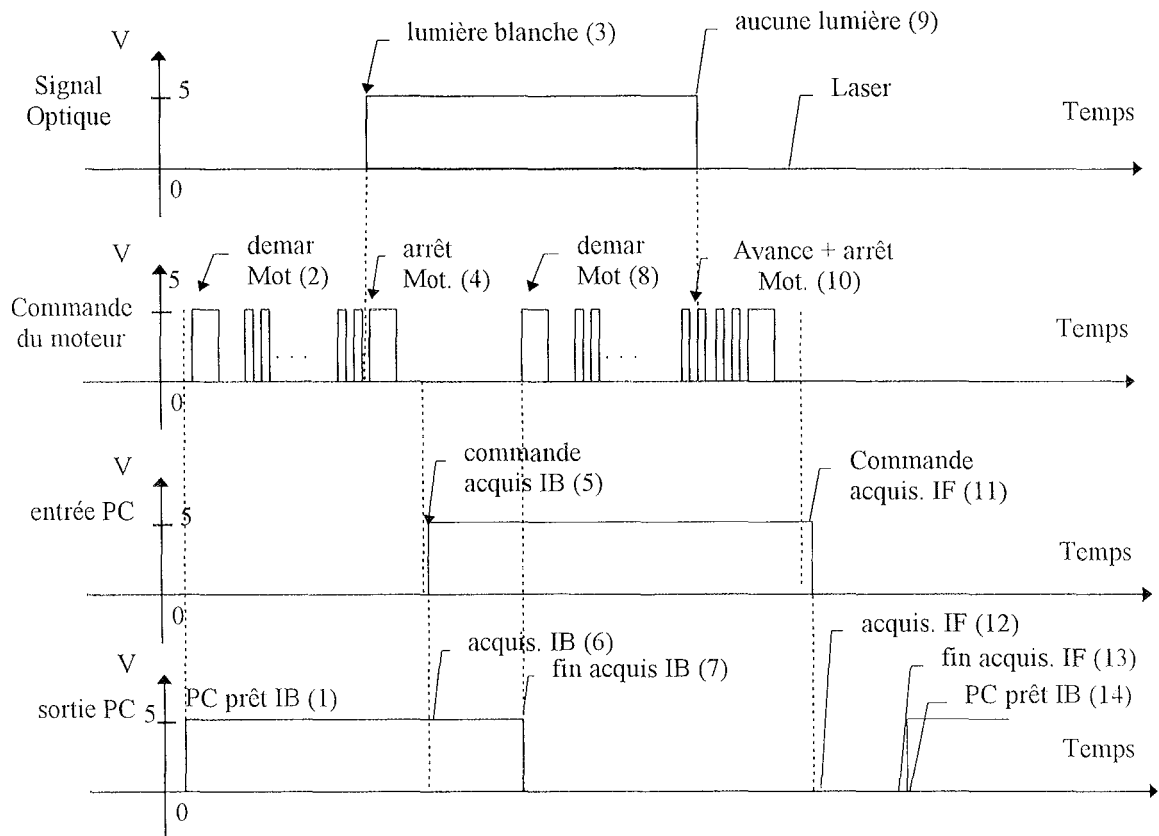


Figure 7.1 : Chronogramme des signaux échangés entre le PC, le capteur et le micro-contrôleur

La commande du moteur pas à pas et de la carte d'acquisition d'images se fait au moyen de deux programmes pouvant échanger des signaux de synchronisation.

Le premier programme est écrit en Windows C++. Il permet de commander l'acquisition et le traitement d'images. Le second programme est écrit en assembleur sur la mémoire RAM du micro-contrôleur. Il permet de commander le moteur pas à pas. Pour la suite, nous appellerons AP le programme assembleur et CP le programme C++. L'organigramme de ces deux programmes est présenté à la figure 7.2.

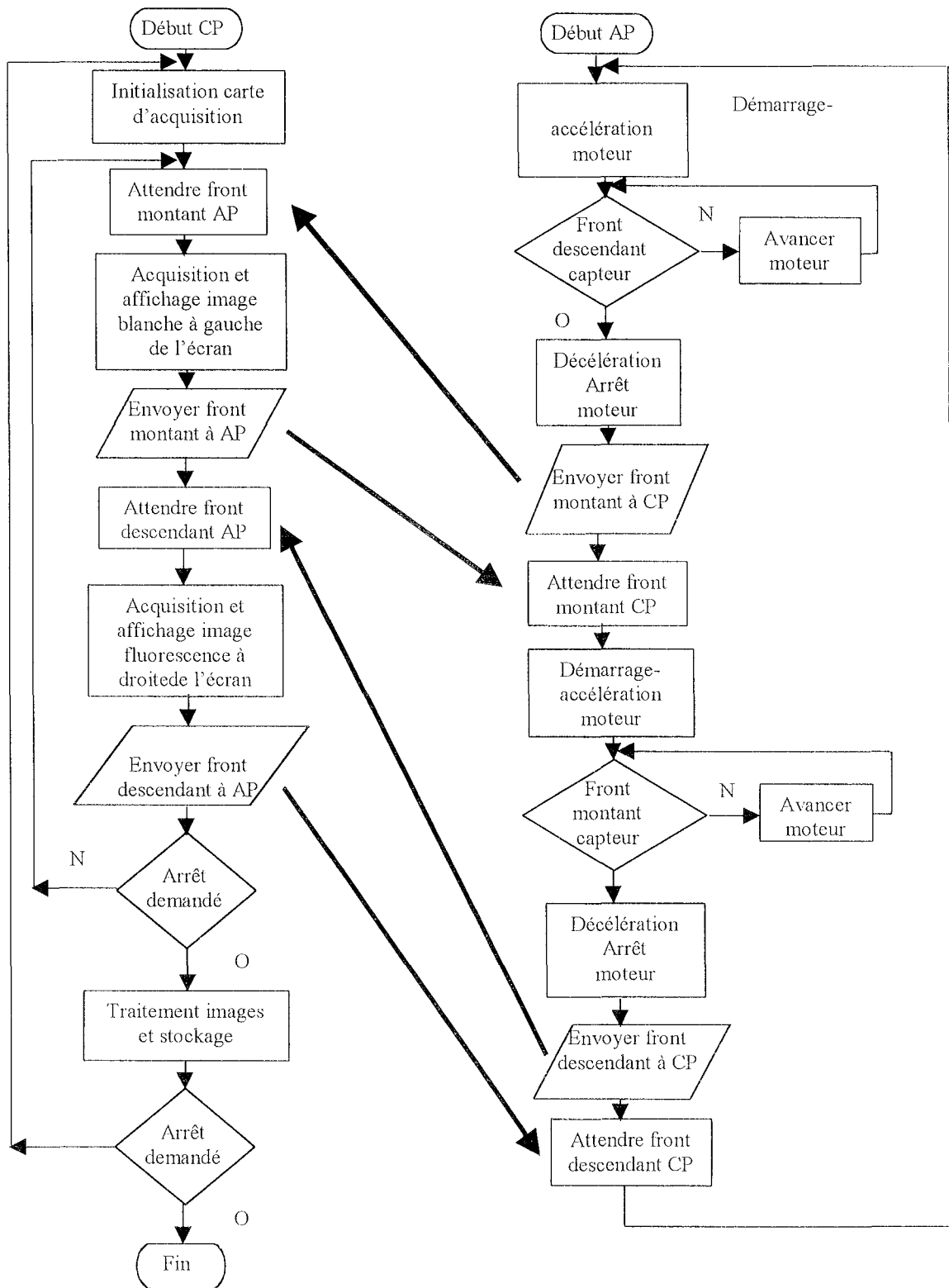


Figure 7.2 : Organigrammes des programmes de commandes du moteur et de la carte d'acquisition d'images

(les flèches épaisses entre les deux organigrammes représentent l'échange de signaux entre CP et AP)

Après une phase d'initialisation des paramètres du micro-contrôleur, AP se met en attente d'un signal de CP. A ce signal, AP lance le moteur pas à pas (phase démarrage-accélération) puis le moteur atteint une vitesse maximale constante jusqu'à ce qu'il reçoive un front descendant provenant de la diode photosensible. Ce dernier signifie le passage de la lumière blanche par le disque d'obturation. AP arrête alors le moteur (phase décélération-arrêt) puis envoie un signal à CP qui était en attente (front montant). CP lance alors l'acquisition de l'image blanche et la visualise à gauche sur l'écran du PC. Une fois l'image prise, CP envoie un signal à AP qui était en attente. AP reprend la boucle entamée précédemment, c'est à dire lance à nouveau le moteur pas à pas jusqu'à réception d'un front montant de la diode photosensible et dans ce cas, il l'avance de 3 pas (phase où ni la lumière blanche ni le laser n'est en sortie) puis l'arrête (laser en sortie) et signale à CP la présence du laser. CP commande l'acquisition de l'image de fluorescence, signale à AP (front descendant) la fin de l'acquisition puis affiche l'image à droite de l'écran.

Le processus décrit ci-dessus est infiniment répété jusqu'à ce que l'utilisateur souhaite son arrêt. A ce moment une procédure de traitement et d'enregistrement d'image est appelée par CP. A la fin de cette dernière, CP lance le processus initial ou arrête le programme selon le choix de l'utilisateur.

Nous avons utilisé le terme « fronts » ci-dessus, pour simplifier l'explication. En réalité, il s'agit d'une détection de changement d'état en mémorisant l'état précédent et en lisant en continu l'état en cours jusqu'à variation de l'état dans le sens attendu. Autrement dit, si la variation est de 0 à 1, il s'agit d'un front montant et si elle est de 1 à 0, il s'agit d'un front descendant.

Les fronts sont donc détectés par programmation, ceci diffère des fronts classiques par le fait que ces derniers sont liés à des entrées « interruption » et ont donc une grande priorité. Cette priorité nous permet d'éviter de perdre un signal reçu pendant que le micro-contrôleur fait autre chose, l'inconvénient étant la sensibilité aux signaux parasites. C'est pour cette raison que nous avons adopté la solution de déclenchement par fronts programmés.

Bien que l'acquisition de l'image en lumière blanche et de l'image de fluorescence dépendent des mêmes entrées/sorties et soient réalisées l'une à la suite de l'autre, nous n'avons pas exploité ces conditions pour faire appel à la même fonction. En effet, nous les avons distinguées l'une de l'autre par des transitions (front) différentes de façon à éviter l'inversion de l'affichage de ces images si un signal parasite survenait.

Il existe deux versions du programme CP. Ils ont la même structure représentée par l'organigramme ci-dessus ; la variante est la partie traitement d'images.

- **gcoraut** : ce programme est préconisé pour le diagnostic par autofluorescence. Il permet de visualiser en continu l'image de fluorescence et l'image en lumière blanche. A la demande de l'utilisateur, un traitement d'images est exécuté. Il permet de réhausser le contraste entre tumeur et tissu sain ou d'identifier une zone d'intérêt. Ce traitement basé sur l'utilisation des composantes vertes de l'image blanche et de fluorescence sera exposé dans la troisième partie. L'image traitée peut être sauvegardée, puis l'affichage reprend à nouveau si l'utilisateur le souhaite.

- **gcorrou** : ce programme est préconisé pour le diagnostic par fluorescence induite. Il permet de visualiser en continu l'image de fluorescence et l'image en lumière blanche. Un traitement d'images est appliqué en exploitant les composantes rouge et verte de l'image de fluorescence, l'image en lumière blanche ainsi qu'une constante déterminée au cours d'une analyse spectrale. Ce traitement permet de supprimer l'autofluorescence de la composante rouge de l'image de fluorescence et d'identifier ou d'améliorer la visualisation de la tumeur. Le traitement sera détaillé dans la troisième partie. L'image traitée peut être sauvegardée, puis l'affichage reprend à nouveau si l'utilisateur le souhaite.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. This includes not only sales and purchases but also any other financial activities that may occur during the course of the business. Proper record-keeping is essential for determining the true financial position of the company at any given time.

In addition, it is important to ensure that all records are kept in a secure and accessible location. This may involve using a combination of physical and digital storage methods to protect against loss or theft of data. Regular backups and secure access protocols are also critical components of a robust record-keeping strategy.

The second part of the document focuses on the role of the accounting department in providing accurate and timely financial information to management. This involves a close working relationship between the accounting staff and other departments within the organization to ensure that all financial data is properly captured and reported.

Management relies on this information to make informed decisions about the company's future. Therefore, it is crucial that the accounting department maintains a high level of accuracy and integrity in all of its reporting. Any discrepancies or errors should be identified and corrected promptly to avoid misleading management.

Finally, the document emphasizes the need for transparency and communication in all financial matters. This means that all financial transactions should be clearly documented and explained to the relevant stakeholders. Open communication helps to build trust and ensures that everyone involved in the business has a clear understanding of the company's financial health.

By following these guidelines, the company can ensure that its financial records are accurate, secure, and accessible, and that its accounting department is providing the highest quality of service to management. This will ultimately contribute to the long-term success and stability of the organization.

PARTIE III : TRAITEMENT D'IMAGES

1. Introduction

L'objectif du traitement d'images est de faciliter le diagnostic des tumeurs. Ce traitement s'applique à l'image de fluorescence. C'est en effet dans cette image que nous devrions pouvoir discriminer tumeur et tissu sain soit à partir de l'autofluorescence soit à partir de la fluorescence induite. L'image en lumière blanche sera utilisée comme outil de correction. Bien que l'algorithme global concerne des images couleur, à chaque étape nous travaillons sur une composante « monochromatique » (composante rouge ou composante verte). De ce fait les algorithmes de traitements d'images que nous avons considérés sont ceux préconisés pour les images noir et blanc.

A travers l'étude bibliographique, nous avons vu que le traitement d'images utilisé avec les systèmes d'imagerie de fluorescence était rarement orienté vers l'amélioration de la qualité d'images. Le premier objectif étant de mettre en évidence le signal de fluorescence d'un photosensibilisant ou de l'autofluorescence. Les différentes techniques mises en oeuvre sont:

- opérations arithmétiques entre les composantes spectrales de l'image de fluorescence pour extraire l'information utile [46][127][43][49][123][124].
- le moyennage d'images pour diminuer le bruit et augmenter la sensibilité. Cette technique est adoptée pour les systèmes d'imagerie de fluorescence résolu dans le temps[67][36][47]. Un moyen équivalent mais réalisé au niveau «matériel» consiste à intégrer sur une durée supérieure à la période standard (40 ms) [46][126].
- détection de contours sur l'image de fluorescence et superposition du résultat à l'image en lumière blanche pour profiter de la bonne qualité de l'image standard tout en lui associant l'information apportée par l'image de fluorescence[38].

Nous avons donc commencé par tester l'effet de la moyenne d'images. Nous avons calculé le rapport signal sur bruit de l'une des images et celui de la moyenne de 10 images consécutives, nous avons alors constaté que ce rapport est inchangé et qu'aucune amélioration de la qualité visuelle n'était notée (résultats non montrés). Ceci nous permet de supposer que le bruit de l'image est constant, il peut être du à la quantification ou à la conversion PAL-RVB.

Nous avons également développé un algorithme de traitement d'image similaire à ceux rencontrés dans la littérature combinant la composante rouge et la composante verte de l'image de fluorescence dans le but de soustraire l'autofluorescence (cas du diagnostic par fluorescence induite).

Un autre algorithme a été développé dans le cas du diagnostic par autofluorescence : il permet de distinguer les zones non fluorescentes, les tissus sains et les tissus tumoraux, en combinant les composantes spectrales rouges et vertes de l'image blanche et de fluorescence. Les premiers résultats obtenus ont montré la nécessité de faire un traitement plus important autour de ces opérations.

Par ailleurs et dans le domaine endoscopique en général, le traitement d'images est principalement orienté vers le rehaussement de contraste[147]. Ceci nous a orienté vers l'étude de ces méthodes et plus généralement des méthodes de prétraitement de l'image.

Le traitement d'images doit pouvoir s'effectuer en temps réel. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés aux méthodes simples et rapides permettant d'améliorer la qualité visuelle des images. Cependant, des algorithmes plus performants ayant des durées d'exécution plus importantes nous ont paru intéressants.

Le traitement doit permettre de discriminer les zones tumorales des zones saines et de donner une information quantitative sur la tumeur dans les deux cas diagnostiques.

Nous distinguerons alors deux algorithmes : l'un est appliqué dans le cas du diagnostic par autofluorescence et l'autre dans le cas du diagnostic par fluorescence induite.

Les deux algorithmes ont quelques fonctions de traitement d'images en commun. Ce sont les fonctions de restauration, de rehaussement de contraste et de contour et les fonctions de seuillage. Leurs intérêts est de diminuer le bruit, d'augmenter le contraste entre le tissu sain et la tumeur, et d'identifier les régions fluorescentes des zones non fluorescentes et la tumeur du tissu sain. Pour cela, nous avons fait appel à des algorithmes développés pour différents types d'images (noir et blanc) et nous avons testé leur performances sur les images endoscopiques.

Nous commençons tout d'abord par introduire quelques méthodes conventionnelles de traitement d'images pour la restauration, le rehaussement de contraste et de contour et la segmentation. Ensuite nous expliquerons le principe du traitement spécifique adapté à nos

images. Enfin nous présenterons les deux algorithmes appliqués aux deux situations diagnostiques.

2. Traitement d'images conventionnel

Dans ce paragraphe nous nous sommes principalement inspirés de deux livres de traitement d'images [86,87], certains passages étant textuellement repris.

2.1. Restauration d'images

Les perturbations qui affectent la qualité de l'image sont désignées sous le terme de bruit d'image. Le bruit est très souvent un signal de type haute fréquence, puisque son échelle spatiale est de faible dimension en comparaison avec la taille des objets.

Dans la plupart des cas, le bruit est considéré comme additif. L'image à traiter A peut se mettre sous la forme :

$A = g + B$, où g représente l'information utile et B représente le bruit (généralement aléatoire).

Le bruit peut également être multiplicatif (cas de l'utilisation d'un intensificateur d'image), et l'image se met alors sous la forme :

$$A = g \cdot B$$

On peut aussi avoir une combinaison de ces différents phénomènes.

Si l'image est prise dans de mauvaises conditions (mouvement, mauvaise mise au point,...), le bruit résultant sera convolutif et l'image se met sous la forme :

$$A = g * B$$

L'objectif de la restauration consiste à réduire l'amplitude de ces perturbations dans chaque région (homogénéité), tout en conservant les transitions entre régions adjacentes (préserver les contours). Parmi les méthodes employées, nous distinguons l'approche linéaire et non linéaire. [87]

2.1.1. Filtres linéaires

Ces opérateurs sont caractérisés par leur réponse impulsionnelle $h(x,y)$; la sortie est exprimée par :

$$C(x,y) = A * h(x,y), \text{ où } * \text{ est l'opérateur de convolution à deux dimensions.}$$

On distingue :

- le filtre moyenneur avec $h(x,y) = \frac{1}{t^2}$, où t est une constante désignant la largeur de la fenêtre d'intérêt. Ce filtre induit un effet de floue.

- le filtre gaussien avec $h(x,y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}}$, il représente le meilleur compromis entre localisation spatiale et fréquentielle.

La puissance du bruit est diminuée en augmentant le paramètre σ au détriment de la netteté des transitions de l'image de sortie.

- le filtre exponentiel : c'est le cas du filtre de SHEN dont la réponse impulsionnelle est donnée par :

$h(x,y) = \frac{\beta}{4} e^{-\beta(|x|+|y|)}$, elle dérive de l'équation générale de CANNY donnée dans le cas monodimensionnel par :

$$f(x) = a_1 e^{\alpha x} \sin(wx) + a_2 e^{\alpha x} \cos(wx) + a_3 e^{-\alpha x} \sin(wx) + a_4 e^{-\alpha x} \cos(wx)$$

La puissance du bruit est réduite en diminuant le paramètre β au détriment de la netteté des transitions de l'image de sortie.

Le filtre de DERICHE est obtenu en étendant les équations de CANNY aux opérateurs à réponse impulsionnelle infinie. Il est donné par :

$$f(x) = (c|x| + 1) e^{-\alpha|x|}$$

La plupart de ces filtres sont séparables et le calcul se fait par colonne puis par ligne. [87]

2.1.2. *Filtres non linéaires*

Ce domaine est très vaste. Cependant les opérateurs les plus courants sont les filtres d'ordre, les filtres homomorphiques et les filtres morphologiques

Le filtre d'ordre : On considère une fenêtre rectangulaire de l'image A dans laquelle les données seront triées par ordre croissant. Un élément $a_{(k)}$ du vecteur résultant est alors caractérisé par son numéro d'ordre ou son rang k . [87]

Les L-filtres introduits par H. A. DAVID en 1981, s'obtiennent par combinaison linéaire des statistiques d'ordre. La sortie C est donnée par :

$$C[i,j] = \sum_{k=1}^L c_k a_{(k)}, \quad k \text{ est le rang d'un pixel dans la fenêtre ; } i \text{ et } j \text{ sont les indices ligne et}$$

colonne du pixel central de la fenêtre.

Le filtre médian est parmi les L-filtres les plus fréquemment utilisés, il est donné par :

$$c_k = \begin{cases} 1 & \text{si } k = \frac{L+1}{2} \\ 0 & \text{ailleurs} \end{cases}$$

Les filtres multiétages : Ces opérateurs comportent généralement deux étages : le premier agit sur les données et le deuxième sur les sorties des filtres. C'est le cas du filtre max/médian de G.R. ARCE (1987), où le premier étage est formé de filtres médians dans les directions horizontale, verticale et diagonale et le deuxième étage sélectionne le maximum des valeurs obtenues. Ce filtre préserve la géométrie des zones angulaires.

Les filtres de rang : C'est un cas particulier des L-filtres, ils ont un effet dissymétrique et sont surtout utilisés pour éliminer le bruit impulsif.

La sortie de ce filtre est donnée par : $C[i, j] = A_{(r)}$; $1 \leq r \leq L$; r fixé ; i et j sont les indices du pixel central de la fenêtre.

Un filtre de rang r , élimine une impulsion négative formée de moins de r pixels et une impulsion positive d'au plus $L - r$ pixels. Pour $r = 1$ et $r = L$, le filtre est identique aux opérateurs morphologiques d'érosion et de dilatation.

Citons également le filtre de type "les k plus proches voisins", qui consiste à affecter au pixel central $C[i, j]$ la moyenne arithmétique de ses k pixels les plus proches (en intensité). Une variante consiste à prendre les « k valeurs » les plus proches de $C[i, j]$ par le rang et d'en calculer la médiane. Ces opérateurs éliminent le bruit impulsif tout en préservant les transitions. [87]

Le filtrage homomorphique : Il comprend trois fonctions en cascade : φ , h et Φ .

φ et Φ sont des opérateurs non linéaires réciproques et h est la réponse impulsionnelle d'un filtre linéaire généralement de type passe bas.

Un des exemples considérés en présence du bruit convolutif, consiste à définir ces opérateurs de la façon suivante :

$$\varphi = \text{TF}^{-1} \cdot \text{LOG} \cdot \text{TF} ; \Phi = \text{TF}^{-1} \cdot \text{EXP} \cdot \text{TF}$$

Le filtrage morphologique : Un filtre morphologique est une transformation idempotente et croissante fondée sur la théorie ensembliste. Il constitue une étape de prétraitement dont le but est de simplifier l'image pour un traitement ultérieur telle que la segmentation. Il est basé sur la connaissance à priori, sur la forme et la taille des structures à localiser. En terme de réduction de bruit, l'ouverture morphologique permet de supprimer les impulsions positives et préserve les impulsions négatives, tandis que la fermeture morphologique réalise l'effet inverse. [87]

2.1.3. *Filtres adaptatifs*

Le filtrage adaptatif permet d'ajuster les coefficients de l'opérateur de filtrage aux situations correspondant à la fenêtre active : le traitement ne sera pas le même selon que l'on ait à faire à une zone homogène ou à une transition qu'il faut préserver. Le filtre adaptatif comporte donc un étage de décision et un étage de filtrage de données.

- Moyennes adaptatives

La sortie de ce filtre est définie par :

$$C[i,j] = \frac{\sum_{k=1}^L w(a_k - A[i,j]) a_k}{\sum_{k=1}^L w(a_k - A[i,j])}$$

avec :

$$w(x) = \begin{cases} 1 & \text{si } |x| \leq t \\ 0 & \text{sinon} \end{cases}$$

a_k est le poids du pixel de rang k dans la fenêtre d'analyse; i et j sont les indices ligne et colonne du pixel central de la fenêtre d'analyse ; t étant un seuil préfixé dont la détermination se fait en fonction de l'écart type du bruit. Cette information n'est pas toujours disponible mais peut être approximée.[87]

- Filtre de rang adaptatif

Ce filtre introduit par ZAMPERONI (1990), permet de supprimer les impulsions négatives et positives tout en préservant les transitions et ceci à la suite d'un étage de décision qui permet d'extraire la statistique de rang r notée $a_{(r)}$ selon la formule :

$$r = Ent[1 + \rho(L-1)]$$

Ent désigne la partie entière de l'expression entre crochets

$$\rho = \frac{1}{2} + \frac{\sum_{k=1}^L a_{(k)} - a_{(1)} - (a_{(L)} - a_{(1)}) \frac{k-1}{L-1}}{(L-1)(a_{(L)} - a_{(1)})}$$

Filtrage par fractionnement de la fenêtre d'analyse

Dans ce cas la sélection des pixels intervenant dans le calcul de la sortie se fait en tenant compte de la géométrie locale. C'est le cas de l'opérateur de NAGAO (1979), qui remplace l'intensité du pixel courant par la moyenne de l'un des 9 domaines de dimensions 5x5 (figure

2.3.1.1. Le domaine choisi est celui qui a la plus faible variance. Une version étendue au cas des filtres de tailles quelconques a été proposée par SCHULZE (1994).

Cet opérateur permet de réduire le bruit tout en renforçant le contraste par diminution de la zone de transition. [87]

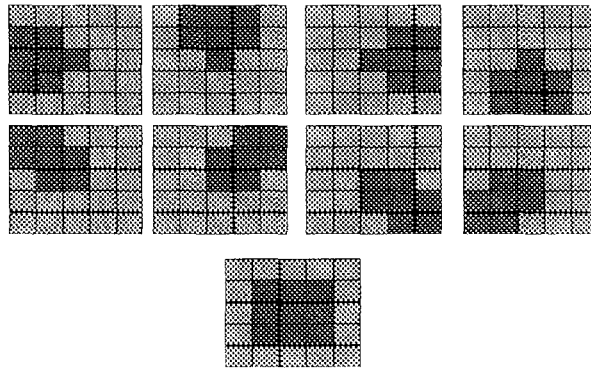


Figure 2.3.1.1 : Masques de NAGAO

2.1.4. Filtrage inverse

Filtre de WIENER [97][86][100][101][102]

Ce filtre est appliqué dans le domaine de Fourier aux images comportant un bruit additif et convolutif. Dans le cas mono-dimensionnel, le signal bruité est donné par :

$$c(t) = s(t) + n(t) \quad (2.1.4.1)$$

avec :

$$s(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} r(t - \tau)u(\tau)d\tau \quad (2.1.4.2)$$

$n(t)$ est le bruit additif, $r(t)$ est le bruit convolutif et $u(t)$ est le signal à déterminer.

La transformée de Fourier du filtre de WIENER est alors donnée par :

$$\Phi(f) = \frac{|S(f)|^2}{|S(f)|^2 + |N(f)|^2} \quad (2.1.4.3)$$

$S(f)$ et $N(f)$ sont les transformées de Fourier respectives de $s(t)$ et $n(t)$.

Le dénominateur de la relation (2.1.4.3) est approximé par la densité spectrale de puissance qui est égale à $C(f)$, transformée de Fourier de $c(t)$. Par ailleurs, $S(f)$ est déduit de $C(f)$ compte tenu de (2.1.4.1) et en admettant que le module du bruit est pratiquement constant. Donc cette formule s'applique pour le filtrage des images ayant un bruit qui ne dépend pas de la fréquence (bruit blanc).

Filtrage inverse par la détermination de la fonction de modulation

La fonction de transfert de modulation peut être déterminée à partir de la transformée de Fourier de la fonction de diffusion en ligne (LSF : Line Spread Function), laquelle peut être déterminée selon trois techniques : la technique de la fente, de la grille ou du bord. La technique de bord est préférable dans le cas de la mesure des paramètres aux faibles fréquences, tandis que celle de la fente est préconisée pour la détermination de la réponse en haute fréquence [99].

Dans le cas général, la transformée de Fourier de la fonction bruitée g est donnée en fonction de la fonction originale f et du bruit h par :

$$G(u, v) = F(u, v)H(u, v)$$

Le calcul de $f(x, y)$ à partir de cette relation n'est pas toujours aisé. En réalisant une approximation basée sur la méthode des moindres carrés entre la fonction $f(x, y)$ et la fonction restaurée $\hat{f}(x, y)$, on aura :

$$\hat{F}(u, v) = \frac{G(u, v)}{H(u, v)} \frac{|H(u, v)|^2}{|H(u, v)|^2 + \Gamma(u, v)}$$

$$\text{avec : } \Gamma(u, v) = \frac{S_w(u, v)}{S_f(u, v)}$$

Cette dernière quantité est supposée constante et est approximée par $\frac{\sigma_w^2}{\sigma_f^2}$

où σ_w^2 est la variance du bruit calculée dans une petite zone d'intérêt et σ_f^2 est la variance du signal calculée dans une région beaucoup plus grande.

Après restriction au profil monodimensionnel, la fonction de transfert du filtre s'écrit :

$$M(u) = \frac{|H(u)|}{|H(u)|^2 + \Gamma}$$

où $H(u)$ est la transformée de Fourier de la coupe mono-dimensionnelle de la LSF. [98]

Cette méthode bien que intéressante, exige la mise en oeuvre d'un moyen précis pour la détermination de la réponse en ligne et en colonne du système, ce qui n'est pas aisé.

2.1.5. Choix et implémentation

Nous avons choisi de programmer et de tester principalement les méthodes qui ne demandent pas une connaissance à priori sur le signal ou sur le bruit.

Nous avons alors implémenté :

- le filtre médian qui est simple et fréquemment utilisé.

- la méthode de NAGAO par fractionnement de la fenêtre d'analyse
 - le filtre de rang adaptatif de ZAMPERONI
 - le filtre de WIENER pour lequel le bruit est supposé constant dans le domaine fréquentiel.
- Nous avons considéré que le module du bruit correspond à la valeur minimale du module de $C(f)$.

Les trois premières méthodes permettent en réalité un simple filtrage, tandis que la dernière permet un filtrage avec rehaussement de l'image connaissant la réponse du système d'imagerie.

La dernière méthode fait appel à la transformée de Fourier. Nous avons utilisé la transformée rapide de Fourier (FFT) à deux dimensions. Le programme correspondant «rlft3.cpp» découle de celui proposée par G. B. RYBICKI [97].

La comparaison des différentes méthodes se fait en considérant la qualité visuelle de l'image, le rapport signal sur bruit (SNR) et le temps d'exécution.

En ce qui concerne la qualité visuelle, nous avons considéré comme image originale celle de l'autofluorescence d'une souris nude présentée à la figure 2.1.5.1. Dans cette figure nous représentons l'image originale et celle obtenue après un changement d'échelle (fenêtrage ou expansion dynamique). Cette opération est appliquée systématiquement à toutes nos images de façon à ce qu'elles occupent toute l'échelle des intensités. Elle a surtout un intérêt de visualisation car les images originales sont trop sombre. Le faisceau d'illumination a été accidentellement coupé lors de la manipulation de la souris, ce qui explique sa forme en croissant. La tumeur correspond à la zone sombre située au milieu de ce croissant tandis que le tissu sain constitue le reste de la région fluorescente avec une intensité plus importante que celle de la tumeur.

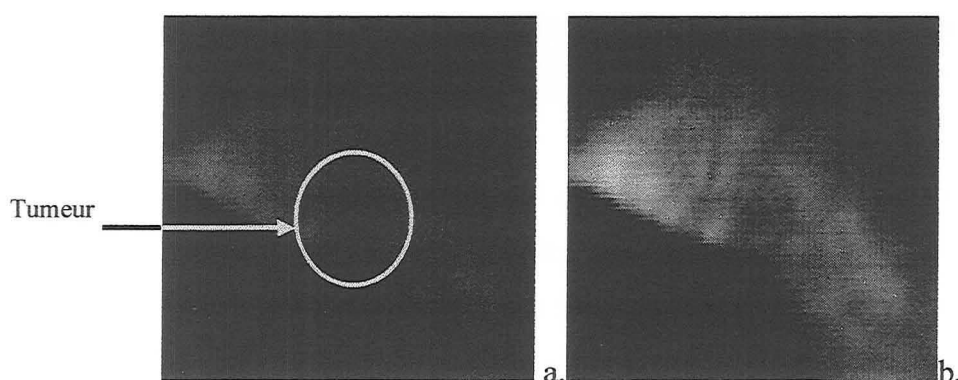


Figure 2.1.5.1 : Image d'autofluorescence d'une souris nude
 (a : image originale ; b : image après changement d'échelle ;
 excitation à 410 nm, irradiance 120 mW/cm²)

Les résultats obtenus à la suite des applications du filtre Médian, du filtre de NAGAO, celui du rang adaptatif et celui de WIENER sont donnés par la figure 2.1.5.2.

Il ne faut pas oublier que l'opération de restauration ne doit pas déformer l'information utile du signal d'origine. Nous remarquons que le filtre de rang adaptatif et le filtre Médian ont des résultats comparables et induisent des plaques homogènes assez grandes au niveau du tissu sain.

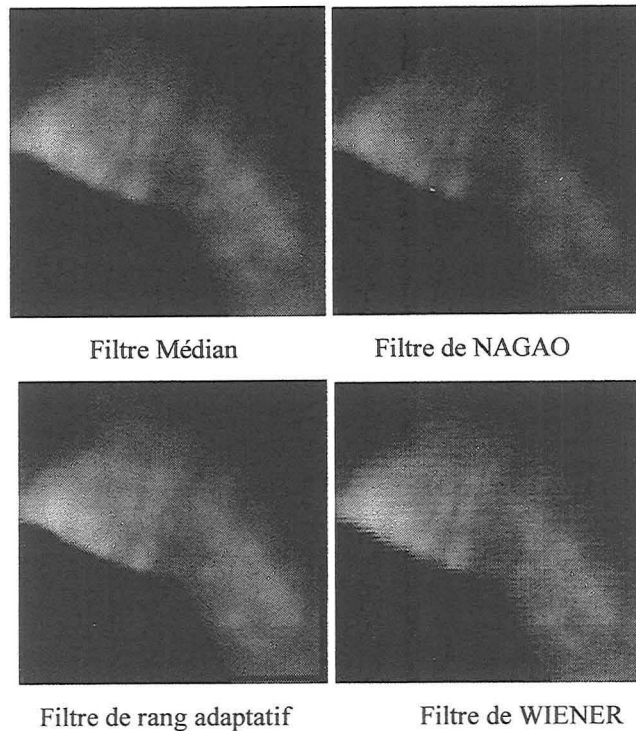


Figure 2.1.5.2 : Résultats de l'application du filtre médian, du filtre de NAGAO, du filtre de rang adaptatif et du filtre de WIENER sur l'image b. de la figure 2.1.5.1.

Le filtre de NAGAO a un effet visuel comparable aux deux algorithmes précédents mais avec une perte dans la dynamique du signal. Donc apparemment il n'y pas beaucoup de différence entre les trois algorithmes. Le filtre de WIENER ne provoque presque aucun changement.

Une étude comparative sur la durée d'exécution de ces algorithmes a été réalisée sur 8 images de dimensions 128x128. Le temps relatif d'exécution pour chaque algorithme (figure 2.1.5.3. est obtenu en divisant chaque durée d'exécution par la durée maximale pour chaque image, ensuite la moyenne de ces durées relatives est calculée. La valeur maximale de l'ordonnée de la figure 2.1.5.3 correspond à un temps de 18.46 secondes sur le micro-processeur Intel Pentium 75 MHz. Les barres d'erreurs délimitent les temps minimaux et maximaux enregistrés.

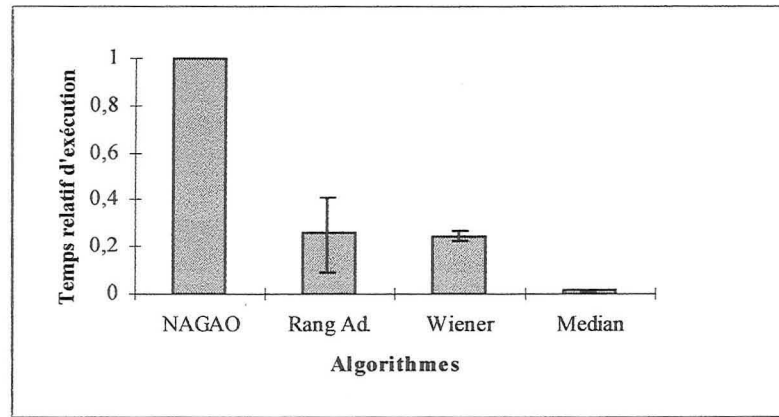


Figure 2.1.5.3 : Durée d'exécution des algorithmes de restauration
 (Le maximum correspond à une durée de 18.46 secondes avec un μ processeur Pentium 75 MHz)

Le filtre médian est le meilleur candidat du point de vue durée d'exécution (66 fois plus rapide que NAGAO), suivi de façon équivalente par le filtre de rang et le filtre de WIENER (4 fois plus rapides que NAGAO). Le filtre de NAGAO est le plus lent.

Nous avons défini le rapport signal sur bruit comme étant le rapport de la variance du signal et du bruit sur celle du bruit [98]. Les régions d'intérêts correspondant respectivement au signal et au bruit sont présentées à la figure 2.1.5.4 pour l'image d'autofluorescence de la souris nude.

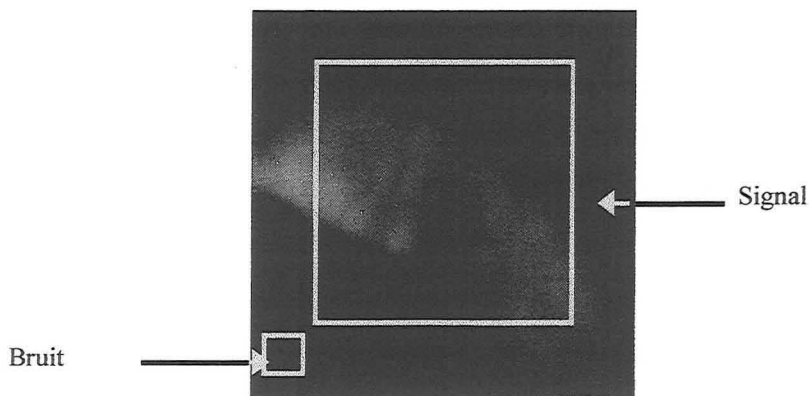


Figure 2.1.5.4 : Choix des régions d'intérêt pour le signal et le bruit dans l'image d'autofluorescence de la souris nude

(la grande région d'intérêt qui englobe la tumeur et une grande partie du tissu sain correspond au signal et la petite région correspond au bruit)

La région d'intérêt qui correspond au signal est délimitée par un carré dont le côté est 5 fois plus grand que celui du carré correspondant au bruit. Cette première région comprend le

signal utile c'est à dire la tumeur et une grande partie du tissu sain. La région d'intérêt correspondant au bruit est située dans un endroit non illuminé.

Le calcul des rapports signal sur bruit à la suite de l'application de chacun des trois algorithmes est effectué sur une image donnée. Ensuite, ces calculs sont fait sur d'autres images puis les moyennes arithmétiques de ces différentes mesures sont considérées.

La moyenne des rapports signal sur bruit obtenue avant et après l'application des algorithmes de restauration sur 7 images différentes, est donnée par la figure 2.1.5.5.

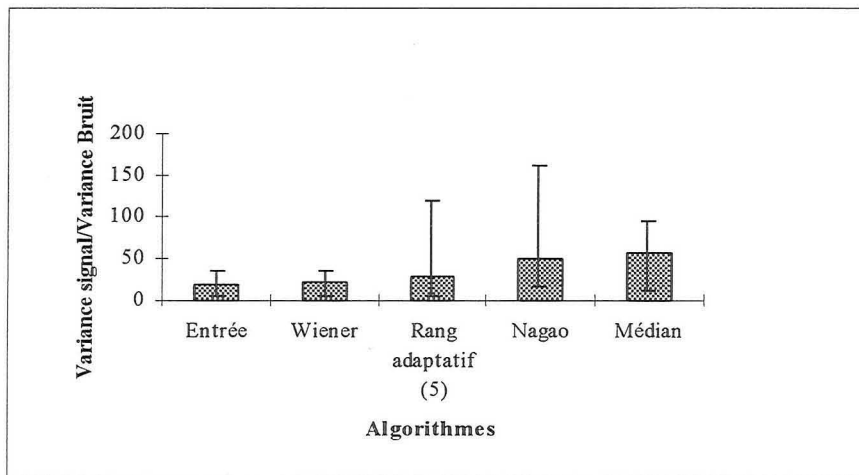


Figure 2.1.5.5 : Comparaison du rapport signal sur bruit sur une moyenne de 7 images avant (entrée) et après application de 4 algorithmes de restauration (NAGAO, rang, WIENER et le filtre Médian)

Nous constatons que c'est le filtre Médian qui possède le plus grand rapport S/B (gain=2.86) suivi par le filtre de NAGAO (gain=2.53), du filtre de rang adaptatif (gain=1.46). Le filtre de WIENER améliore légèrement ce rapport (gain =1.02).

Les gains sont définis comme le rapport S/B de l'image d'entrée sur celui de l'image de sortie du filtre.

Du point de vue rapport signal sur bruit le filtre Médian est le meilleur. En ce qui concerne la durée d'exécution il est également le plus rapide. Si l'on s'intéresse à la qualité visuelle, le filtre de NAGAO, le filtre de rang adaptatif et le filtre Médian sont comparables. Ce dernier critère de comparaison doit être vérifié sur un plus grand nombre d'images (partie IV).

Nous portons donc notre choix sur le filtre Médian.

2.2. Techniques digitales de rehaussement de contraste et de contour

Dans ce paragraphe, deux approches sont considérées : les méthodes de rehaussement et de détection de contours et les méthodes de rehaussement de contraste. L'objectif visé est de

faciliter le diagnostic de la tumeur en rehaussant son contour ou son contraste par rapport au tissu sain.

Le rehaussement de contraste peut être décrit comme une cartographie qui assigne à chaque pixel une nouvelle valeur dans la palette des niveaux de gris disponible.

Différentes techniques sont utilisées pour le **rehaussement des contours**. Les filtres passe-haut sont appliqués pour supprimer l'information à caractère passe-bas (les contours correspondent aux hautes fréquences), ce qui accentue les contours.[89][86]

D'autres chercheurs ont utilisé des techniques morphologiques ou des filtres non linéaires pour détecter les contours.

2.2.1. Rehaussement de contraste global

On décrit ci-dessous les techniques les plus connues.

2.2.1.1. Windowing (fenêtrage)

C'est une transformation linéaire des intensités des pixels à partir d'un intervalle défini par une frontière inférieure et supérieure vers tous les niveaux de gris disponibles. Les pixels dont l'intensité est à l'extérieur de la fenêtre auront un seul niveau de gris ce qui les rend non remarquables. Les frontières sont définies par l'utilisateur. Une seule fenêtre permet rarement un contraste acceptable pour toute une image ayant plusieurs contrastes faibles à différentes intensités. [87][88]

2.2.1.2. Egalisation d'histogramme (HE)

C'est une transformation unique qui fait en sorte que les niveaux de gris dans l'image rehaussée seront occupés par un nombre égal de pixels. C'est à dire que l'histogramme sera plat. Pour les images digitales où les niveaux de gris sont quantifiés, cet objectif sera approximatif.

Cette transformation est un histogramme intégré, c'est à dire une fonction de distribution cumulative de l'image originale (CDF : Cumulative Distribution Fonction), normalisée vers le domaine de niveaux de gris disponibles. Cette technique convient aux images non bruitées. [86]

2.2.1.3. Hyperbolisation d'histogramme (HH)

Une condition alternative sur l'histogramme de l'image rehaussée a été proposée par FREI (1977). La réponse de l'oeil humain est proportionnelle au logarithme des intensités des

pixels, de telle sorte que la distribution uniforme des logarithmes des intensités est équivalente à un histogramme hyperbolisé de l'image rehaussée. [88][86]

2.2.1.4. Transformation sigmoïde de la densité optique d'une image

Il s'agit de rehausser le contraste visuel qui est donné par :

$$C_v = (1 - 10^{-\Delta OD}) / (1 + 10^{-\Delta OD})$$

ΔOD est la différence de la densité optique de l'objet et du fond

La transformation sigmoïde consiste à appliquer une transformation exponentielle pour des OD faibles, et logarithmique pour des OD élevées.

- transformation logarithmique de la densité de l'image :

$$B = \gamma \log(OD_i) + b$$

γ est la pente, b est le décalage et B est le niveau de gris.

- transformation exponentielle :

$$B = \exp(OD / k), 1/k \text{ est la pente de l'exponentielle.}$$

La transformation sigmoïde est équivalente à la transformation linéaire.[93]

2.2.2. Rehaussement de contraste local

Les méthodes globales conviennent aux images ayant une distribution légèrement uniforme de l'intensité. Cependant plusieurs images sont caractérisées par des contrastes faibles sur un nombre différent d'intensités. Ceci a exigé le développement de méthodes de rehaussement locales. La transformation F est alors dépendante de la position et chaque pixel a sa propre transformation basée sur les propriétés des pixels voisins. Pour chaque pixel, un voisinage différent doit être défini et une nouvelle transformation calculée. L'une des techniques alternatives consiste à diviser l'image en zones carrées et une transformation bilinéaire est réalisée entre quatre transformations correspondant à quatre carrés voisins pour des pixels se trouvant à peu près au centre. Ceci diminue considérablement le temps d'exécution.[88]

2.2.2.1. Local Range Modification (LRM)

C'est une technique de fenêtrage adaptée introduite par FAHNESTOCK et SCHOWENGERDT en 1983. La transformation d'un pixel est une déformation (étirement) du contraste avec comme frontières minimales et maximales, les valeurs minimales et maximales localement estimées par une interpolation bilinéaire entre les extrêmes des quatre régions proches du pixel. [88]

2.2.2.2. Egalisation d'histogramme adaptative (Adaptative Histogramme Equalisation (AHE))

Cette méthode a été introduite par PIZER et al. (1984), (1987). C'est une version interpolée de la modification locale d'histogramme. L'image NxN est divisée en régions continues JxJ et la transformation qui permet l'égalisation d'histogramme (CDF) est trouvée pour le pixel central p de chaque région séparément (ce sont les pixels de la grille). La transformation finale pour un pixel quelconque consiste à interpoler bilinéairement les résultats des quatre régions les plus proches du pixel. Si le pixel considéré est à la position (x,y) et a une intensité i , et m_{+-} est la fonction du pixel grille $(x+,y-)$ situé dans le coin supérieur droit de p , et de même pour m_{++} , m_{--} , m_{-+} , qui correspondent aux pixels grilles respectifs $(x+,y+)$ $(x-,y-)$ $(x-,y+)$, le résultat de l'interpolation est :

$$m(i) = a[bm_{--}(i) + (1-b)m_{+-}(i)] + [1-a][bm_{-+}(i) + (1-b)m_{++}(i)]$$

où : $a = \frac{(y-y_-)}{y_+ - y_-}$ et $b = \frac{(x-x_-)}{x_+ - x_-}$

Pour les pixels de bord, une interpolation linéaire est réalisée entre deux voisins[91].

Cette technique permet un excellent rehaussement mais également le rehaussement du bruit, particulièrement dans les régions dont le contraste est très bas. Il y a également un phénomène d'ombre de quelques contours forts.[84][96]

2.1.2.3. Egalisation d'histogramme adaptative tronquée (Clipped Adaptative Histogram equalisation (CLAHE))

C'est une amélioration de AHE, elle permet d'imposer un maximum défini par l'utilisateur sur le poids de l'histogramme local.

En effet, AHE rehausse le bruit en plus du signal, et cette nouvelle méthode permet de limiter le rehaussement [84][85].

2.2.2.4. Egalisation d'histogramme avec déplacement (Moving Histogram Equalisation (MHE))

C'est une méthode introduite par LESZCZYNSKI et SHALEV (1989). Elle réduit l'erreur d'interpolation introduite par AHE.

Dans MHE, une bande de n pixels se déplace à travers l'image, pixel par pixel. Les CDF régionales sont ajustées après chaque mouvement et la transformation colinéaire des pixels du centre des régions qui sont dans la bande est calculée par une interpolation linéaire entre

les CDF les plus proches. L'interpolation est dans une seule direction (pas d'artefact introduit par l'interpolation bilinéaire ce qui réduit le temps d'exécution). [90]

2.2.2.5. Unsharp masking

Ce filtrage consiste à soustraire une version floue de l'image originale [89].

Unsharp Masking (UM) se déroule en trois étapes :

- 1- l'image originale est rendue floue par un masque $h(x,y)$ pour former une image masque,
- 2- soustraction du masque de l'image originale,
- 3- le résultat est pondéré et ajouté à l'image originale

$$g(x, y) = f(x, y) + K[f(x, y) - f(x, y) * h(x, y)] = f(x, y) * PSF_{um}(x, y)$$

$$PSF_{um}(x, y) = (1 + K)\delta(x, y) - K \cdot h(x, y) \quad (1)$$

PSF_{um} : Point Spread Function de unsharp masking, δ est la fonction de Dirac, $*$ est la convolution à deux dimensions, f est l'image originale, g est la sortie.

La technique de UM est équivalente à un filtrage spatial dans lequel l'image originale est convoluée avec la réponse impulsionnelle ponctuelle. UM est connue pour augmenter le contraste local pour des composantes relativement petites et en haute fréquence, les artefacts sont introduits lorsque les contours sont accentués. [84] [94] [95]

2.2.2.6. Décalage d'histogramme (Histogram Shifting : HS)

Cet algorithme permet le rehaussement et la détection de contours. Il est basé sur une modification locale de l'histogramme. Il consiste à passer un noyau dans l'image pixel par pixel et le niveau de gris minimal dans le noyau est calculé pour chaque pixel. La valeur minimale est multipliée par un paramètre d'échelle f compris entre 0 et 1, soustraite du pixel central, puis écrite dans la nouvelle image.

Cet algorithme décale l'histogramme vers les niveaux de gris les plus sombres. Donc la variation des niveaux de gris reste constante mais la valeur moyenne est réduite. Les histogrammes des régions claires seront décalés beaucoup plus que les histogrammes des régions plus sombres ce qui réduit la différence entre les régions sombres et claires de l'image.

L'effet de HS sur les bords est tel que les pixels qui sont à l'intérieur sont assombris et ceux qui sont à l'extérieur sont éclaircis ce qui augmente le contraste. Cependant lorsque cette image est ajoutée à l'image originale et lorsqu'une égalisation d'histogramme est réalisée, les frontières de l'objet sont rehaussées. [92]

Le résultat est que les contours sont détectés ou/et rehaussés dans l'image et les artefacts sont réduits selon le choix des paramètres.

Le décalage d'histogramme est basé sur la formule suivante :

$$X'_{k,l} = X_{k,l} - [f \times \min(X_{i,j})]$$

$X'_{k,l}$ est le niveau de gris final ; $X_{k,l}$ est le niveau de gris initial ; f contrôle le degré de décalage de l'histogramme.

Alternativement l'histogramme peut être modifié de telle sorte que la valeur maximale soit décalée vers 255 :

$$X'_{k,l} = X_{k,l} - [f(255 - \max(X_{i,j}))]$$

Dans ce dernier cas les contours seront affichés en blanc.

Par la suite, les images sont linéarisées pour retrouver leurs niveaux de brillance originale si cela est souhaitable.

Si f est égale à 1, nous aurons une extraction de contour. Plus f diminue plus nous passerons de l'extraction au rehaussement de contour. Nous avons testé les résultats obtenus avec différentes valeurs de f comme le montre la figure 2.2.2.6.2. L'image originale étant celle de la figure 2.2.2.6.1.

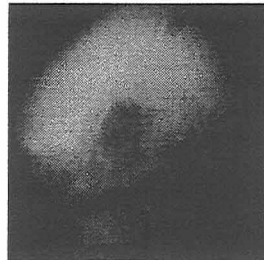


Figure 2.2.2.6.1 : Image d'une lésion cutanée non maligne (après changement d'échelle)

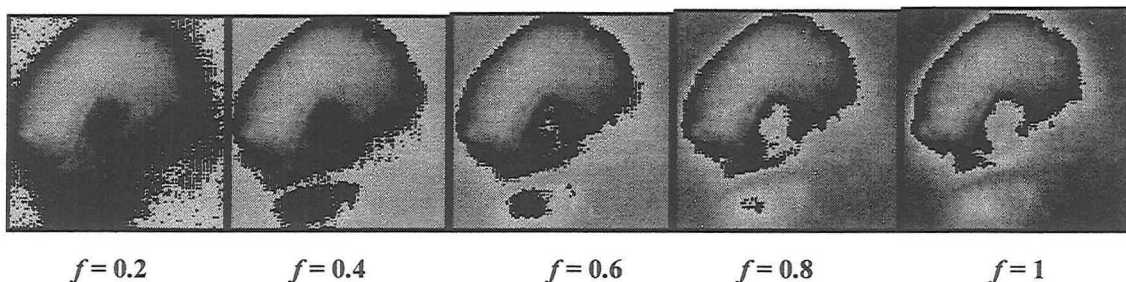


Figure 2.2.2.6.2 : Résultats obtenus avec HS (avec décalage vers les niveaux de gris claires) pour différentes valeurs de f et pour un masque de taille 5

D'après cette dernière figure, le meilleur rehaussement est obtenu pour f égale à 0.8. En effet, les valeurs inférieures permettent un rehaussement entre le fond et le site illuminé et non entre la lésion et les autres tissus. Les valeurs plus grandes que 0.8 sont moins sensibles

aux plus faibles transitions ce qui diminue la sensibilité comme nous pouvons le voir pour $f=1$ où le rehaussement ne s'opère pas entre le bas de la lésion et le tissu normal.

La taille du noyau détermine de quelle façon les détails seront affichés. Les objets dont la taille est inférieure ou égale à la demi taille du noyau ne seront pas affectés par HS, tandis que les objets plus grands seront affichés comme contours, soit comme front montant, soit comme front descendant.

Les petits noyaux auront pour conséquence d'afficher les frontières de la plupart des objets tandis que les noyaux plus grands montreront les détails dans un même objet.[89]

Nous avons choisi une taille de masque de 5 pour les images testées en raison de la taille des régions d'intérêt.

2.2.3. Rehaussement de contours [86]

Parmi les méthodes de détection de contours citons SOBEL Prewitt et le Laplacien. Elles sont basées sur le calcul de la dérivée des contours dans la direction horizontale et verticale. Ceci est assuré en passant un noyau sur l'image de façon ponctuelle et en prenant la somme pondérée des pixels concernés à chaque étape. D'autres techniques rotationnelles sont sensibles à différentes orientations (filtre compas : série séquentielle de noyaux de SOBEL, la valeur retenue est celle qui est maximale dans une certaine direction)

A titre d'exemple la figure 2.2.3.1 représente les noyaux de SOBEL dans toutes les directions possibles. Chaque nouveau masque est obtenu à partir de la rotation à 45° du masque qui le précède.

$$\begin{array}{cccc}
 \begin{pmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{pmatrix} & \begin{pmatrix} 0 & -1 & -2 \\ 1 & 0 & -1 \\ 2 & 1 & 0 \end{pmatrix} & \begin{pmatrix} 1 & 0 & -1 \\ 2 & 0 & -2 \\ 1 & 0 & -1 \end{pmatrix} & \begin{pmatrix} 2 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & -1 \\ 0 & -1 & -2 \end{pmatrix} \\
 0^\circ & -45^\circ & -90^\circ & -135^\circ \\
 \\
 \begin{pmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{pmatrix} & \begin{pmatrix} 0 & 1 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \\ -2 & -1 & 0 \end{pmatrix} & \begin{pmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{pmatrix} & \begin{pmatrix} -2 & -1 & 0 \\ -1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 2 \end{pmatrix} \\
 -180^\circ & 135^\circ & 90^\circ & 45^\circ
 \end{array}$$

Figure 2.2.3.1 : Noyaux de SOBEL

Ces techniques bien qu'adéquates pour la détection des contours bien définis, sont sensibles au bruit et peuvent produire des artefacts. Compte tenu de la taille du noyau et le poids des éléments, le contour dont l'épaisseur est inférieure ou égale à la taille du noyau dans l'image

originale, sera affiché en double contour. Pour les mêmes raisons, les contours rapprochés sont souvent incorrectement détectés.

Plusieurs techniques ont été implémentées pour détecter les contours sur des images bruitées, par exemple CANNY a défini un détecteur de contour optimal et l'a approximé en prenant la première dérivée d'un filtre gaussien. DERICHE en a dérivé un filtre optimal récursif de meilleure qualité.

Le filtre de DERICHE est donné par :

$$f(x, y) = b^2 (\alpha|x| + 1)e^{-\alpha|x|} \cdot (\alpha|y| + 1)e^{-\alpha|y|}$$

avec :

$$b = \frac{(1 - e^{-\alpha})^2}{1 + 2\alpha e^{-\alpha} - e^{-2\alpha}}$$

Dans le cas bidimensionnel, les dérivées selon x et y par le filtre de DERICHE sont données par les équations suivantes :

$$f_x(x, y) = \eta x e^{-\alpha|x|} \cdot (\alpha|y| + 1)e^{-\alpha|y|}$$

$$f_y(x, y) = \eta y e^{-\alpha|y|} \cdot (\alpha|x| + 1)e^{-\alpha|x|}$$

Nous retrouvons alors l'expression du filtre de DERICHE selon la direction x dans la dérivée par rapport à y et vice versa.

Le coefficient α influence la détection de contour : plus α est petit plus les contours sont fins.

Le rehaussement s'obtient en ajoutant l'image module obtenue à l'image originale.

Nous avons testé l'effet de la variation de α sur le rehaussement entre une lésion humaine et le tissu qui l'entoure représentée à la figure 2.2.2.6.1(p. 100). Nous représentons à la figure 2.2.3.2 les images modules obtenues avec α respectivement égale à 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 3 et 4.

Nous pouvons constater que pour les faibles valeurs de α , les contours sont flous. Plus α est grand plus les contours sont fins. Nous avons préféré utiliser une valeur intermédiaire ($\alpha = 0.8$). En effet pour α petit, les petites lésions ne sont pas détectées et le rehaussement s'opère entre le fond et le site éclairé. Par contre si α est grand certaines régions sans intérêts (rainures...) sont réhaussées.

Pour α égale à 0.8 nous obtenons un contour net et légèrement épais, ce qui donne un bon rehaussement en ajoutant l'image ainsi obtenue à l'image originale. Cette valeur a été testé sur un grand nombre d'images et semble donner des résultats satisfaisants.

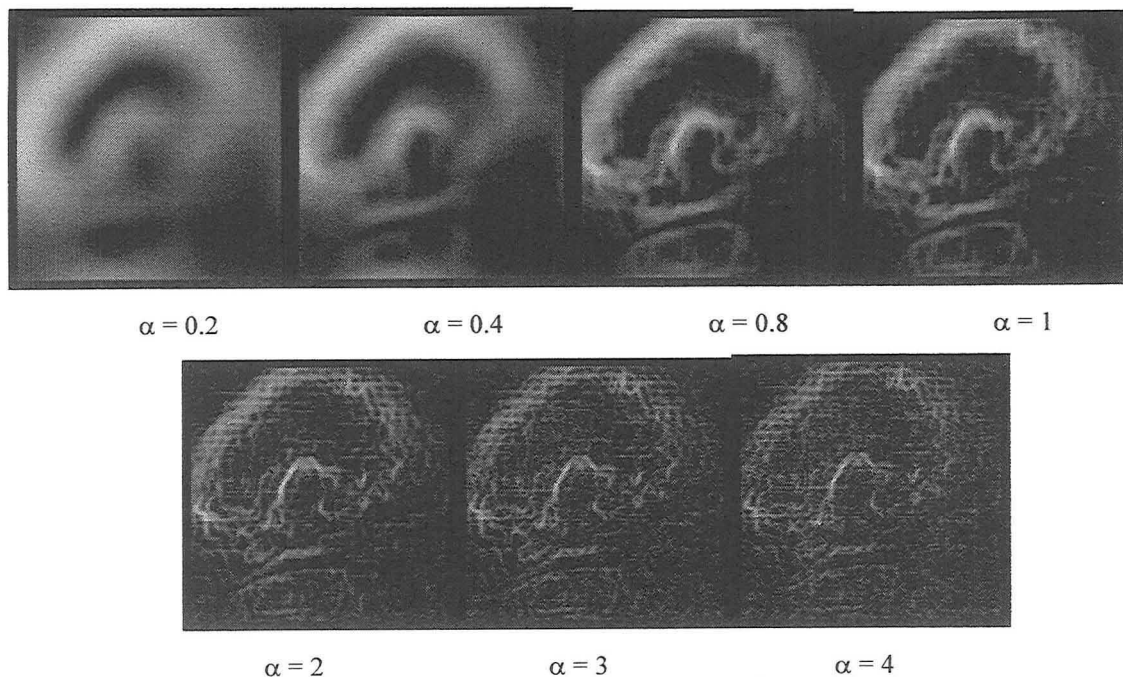


Figure 2.2.3.2 : Effet de variation du coefficient α sur le rehaussement de contour par DERICHE de l'image de la figure 2.2.3.2.

2.2.4. Choix et implémentation

Nous avons choisi d'implémenter et de tester :

- Le détecteur de contour de DERICHE, parcequ'il permet à la fois un rehaussement de contour et le lissage tout en préservant les transitions,
- L'égalisation d'histogramme qui est une méthode simple et couramment utilisée,
- L'égalisation d'histogramme adaptative qui permet un rehaussement local,
- Le décalage d'histogramme HSN (avec décalage vers les niveaux sombres et ajout de l'image obtenue à l'image originale) et HSX (décalage vers les niveaux clairs) car le rehaussement se fait de façon local,
- Extraction de contour de SOBEL à deux directions (horizontale et verticale) avec ajout de l'image obtenue à l'image originale. Cette méthode est simple et permet de lisser l'image tout en rehaussant ses contours,
- Extraction de contour de SOBEL à huit directions (favorise le rehaussement des contours dans la direction la plus intéressante).

En plus de ces méthodes testées, nous faisons appel à une technique très simple de rehaussement de contraste qui ne déforme pas l'information dans l'image : il s'agit d'un

changement d'échelle (fenêtrage ou expansion dynamique) qui étale les intensités dans la zone disponible (0 à 255) alors qu'à l'origine l'image est située dans les faibles intensités.

La fonction appliquée pour chaque pixel est la suivante :

$$X'_{k,l} = \frac{(X_{k,l} - X_{\min}) \cdot 255}{X_{\max} - X_{\min}}$$

$X'_{k,l}$ est l'intensité finale, $X_{k,l}$ est l'intensité initiale, X_{\min} est l'intensité minimale dans l'image, X_{\max} est l'intensité maximale dans l'image, k et l sont les indices de ligne et de colonne du pixel.

Cette expansion dynamique serait plus efficace si elle était effectuée de façon électronique par le gain du module de digitalisation d'images. Cependant, notre dispositif ne se prête pas à cette opération.

La comparaison des algorithmes de rehaussement de contraste et de contour se fait selon trois critères : l'aspect visuel des images qui en résultent, la durée d'exécution et une mesure de contraste.

Les images résultant de l'application de HE, AHE, HS avec décalage vers les faibles intensités de verte ou de rouge, HS avec décalage vers les grandes intensités, DERICHE avec $\alpha=0.8$ et SOBEL à 2 et 8 directions sont représentées dans la figure 2.2.4.1.

Une étude comparative sur la durée d'exécution de ces algorithmes a été réalisée sur 8 images de dimensions 128x128. Le temps relatif d'exécution pour chaque algorithme est donné par la figure 2.2.4.2. Ce nombre est obtenu en divisant chaque durée d'exécution pour une image donnée par la durée maximale obtenue avec l'un des algorithmes. Ces mesures sont faites sur un certain nombre d'images (8) ensuite la moyenne arithmétique de ces durées relatives est calculée. La valeur maximale de l'ordonnée de la figure 2.2.4.2 correspond à un temps de 11.48 secondes (Intel Pentium 75 Mhz).

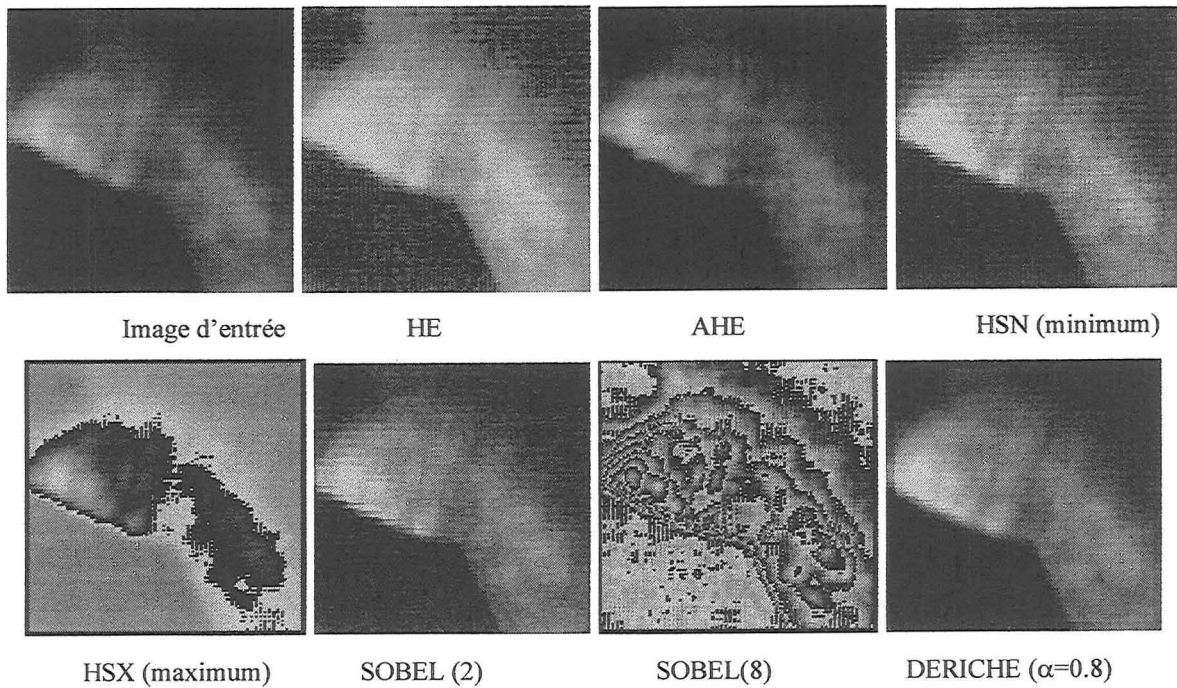


Figure 2.2.4.1 : Application de AHE (avec un masque de taille 3), HS (avec $f=0.8$ et un masque de taille 5), SOBEL (à deux directions et à 8 directions) et DERICHE (avec $\alpha=0.8$), sur l'image d'autofluorescence de la souris nude

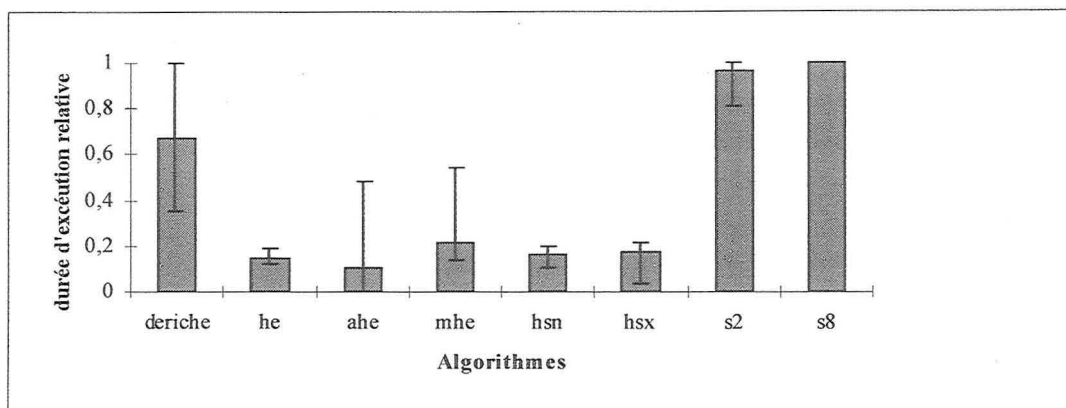


Figure 2.2.4.2 : Durée d'exécution des algorithmes de rehaussement de contraste et de contour (HE : histogram equalisation, AHE : adaptative histogram equalisation, HSN : histogram shifting minimum, HSX : histogram shifting maximum, S2 : SOBEL à deux directions, S8 : SOBEL à 8 directions ; la valeur maximale correspond à une durée de 11,48 secondes ; les barres d'erreur sont limitées par la valeur minimale et maximale du temps d'exécution enregistré)

AHE a en moyenne la plus faible durée d'exécution.

En ce qui concerne la mesure de contraste, nous l'avons définie comme étant la différence entre le niveau de gris maximal et minimal d'une ligne profil qui traverse la zone séparant la

tumeur du tissu sain. Les coordonnées de la ligne profil sont les mêmes pour une image donnée.

Le contraste moyen est ensuite calculé et représente pour chaque algorithme, la moyenne des contrastes sur 10 images. Enfin, le contraste relatif pour chaque algorithme est calculé en divisant le contraste moyen par le contraste moyen de l'image originale. L'image originale est celle qui est obtenue à la suite de l'opération de changement d'échelle.

Le contraste relatif moyen des différents algorithmes est donné par la figure 2.2.4.3. Les barres d'erreurs délimitent les valeurs minimales et maximales du contraste relatif.

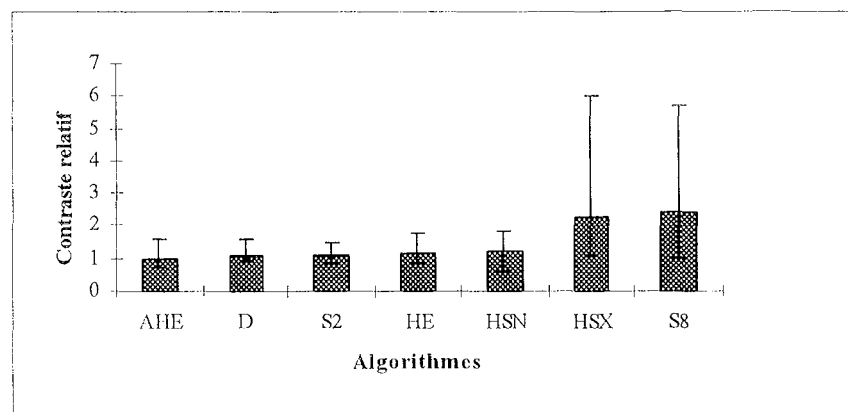


Figure 2.2.4.3 : Contraste relatif des algorithmes de rehaussement de contraste et de contours

(HE : histogram equalisation, AHE : adaptative histogram equalisation, HSN : histogram shifting minimum, HSX : histogram shifting maximum, S2 : SOBEL à deux directions, S8 : SOBEL à 8 directions)

Dans cette figure, nous constatons que le meilleur contraste est obtenu par SOBEL à 8 directions suivi de HSX (HS avec décalage vers les grandes intensités), puis HSN (HS avec décalage vers les faibles intensités).

La mesure de contraste et du temps d'exécution ont une faible priorité dans le choix de l'algorithme en comparaison avec l'aspect visuel. Aussi, l'algorithme de rehaussement de contours par SOBEL à 8 directions est éliminé à cause de la mauvaise qualité des images qui en résultent bien qu'il fournisse un bon contraste à priori.

HE qui est une méthode globale, rehausse le contraste beaucoup plus entre les zones illuminées et les zones non illuminées qu'entre la tumeur et le tissu sain.

HSN avec décalage vers les faibles intensités semble être un bon candidat que ce soit du point de vue mesure de contraste sur une ligne profil ou du point de vue qualité visuelle des images rehaussées.

Cependant HSX semble donner de meilleurs résultats sur tous les plans, il est donc provisoirement choisi. Nous verrons dans la partie résultats s'il est efficace (du point de vue de la qualité visuelle) sur un plus grand nombre d'images.

2.3. La classification

La classification permet de diviser l'image en plusieurs classes. Pour les méthodes monodimensionnelles, le pixel a un seul attribut (intensité), pour les méthodes multidimensionnelles, le pixel possède d'autres attributs.

Les méthodes monodimensionnelles reposent sur l'exploitation de l'histogramme normalisé qui caractérise la distribution des niveaux de gris. Ces méthodes déterminent des seuils qui sont les limites de différents modes. Ils peuvent être déterminés globalement à partir de l'histogramme de l'image complète par exemple en cherchant des minima locaux.

On distingue trois catégories de méthodes de seuillage.

Si on désigne par s un site, $A[s]$ son niveau de gris, $p(s)$ le résultat d'un opérateur local agissant sur un voisinage $V(s)$ du site s , le seuillage peut être associé à un opérateur $T(s, A[s], p(s))$. On parle de:

- seuillage global si T ne dépend que de $A[s]$
- seuillage local si T ne dépend que de $A[s]$ et de $p(s)$
- seuillage dynamique si T dépend de $A[s]$, de $p(s)$ et de s .

L'opérateur de seuillage est assimilé à la comparaison à un seuil définissant la limite entre la classe fond et la classe objet : on parle alors de binarisation. L'extension au cas de plusieurs seuils est désignée par le terme multiseuillage ou classification.

Le seuillage comporte trois étapes :

- identification des seuils interclasses,
- affectation des points aux différentes classes,
- extraction des composantes connexes de chaque classe[87].

2.3.1. Méthodes globales

Elles consistent à :

- rechercher les seuils par analyse de l'histogramme des niveaux de gris et rechercher des minimum locaux, après amélioration de l'histogramme par lissage ou approximation (moindres carrés par exemple).

ou

- rechercher les modes : ces méthodes sont moins sensibles au bruit, elles modélisent

l'histogramme par une somme pondérée de distributions gaussiennes.

2.3.1.1. Algorithme ISODATA de DIAS VELASCO (1980) [86]

Il permet de déterminer les seuils automatiquement avec comme connaissance initiale les valeurs moyennes m_i associées à chacune des L classes.

Si $h(j)$ est la densité de probabilité de l'attribut j de l'image et si $[min, max]$ est le plus petit intervalle contenant des valeurs non nulles de $h(j)$, une première estimation des m_i consiste à diviser l'axe j en L classes équidistantes et en calculant la moyenne arithmétique de chaque classe comme si la densité de probabilité de l'attribut était uniforme dans l'intervalle considéré.

Les $L-1$ seuils T_i sont évalués par :

$$T_i = \left[\left(m_i + m_{i+1} \right) / 2 \right] \text{ pour } i = 1..L \quad (2.3.1.1.1)$$

Ensuite à chaque classe i , sont assignés les pixels dont l'attribut se trouve dans l'intervalle $[T_{i-1}, T_i]$

La mise à jour des moyennes m_i est effectuée par :

$$m_i = \frac{\sum_{j \in A_i} jh(j)}{\sum_{j \in A_i} h(j)} \text{ pour } i = 1..L \quad (2.3.1.1.2)$$

Si l'application de cette équation modifie l'une des moyennes, il faut recalculer les seuils par la relation (2.3.1.1.1) sinon l'algorithme a convergé.

2.3.1.2. La méthode de FISHER [87]

Cette méthode consiste à localiser les seuils comme séparateurs des distributions, en minimisant la somme des inerties associées aux différentes classes. Elle nécessite la connaissance du nombre de classes N_c et se déroule en N_c étapes.

2.3.1.3. La méthode de BHATTACHARYA

Cette méthode identifie chaque mode par sa moyenne et sa variance et ne nécessite pas la connaissance du nombre de classes.

Il s'agit d'étudier le comportement du logarithme de la fonction histogramme, au travers de la fonction z définie sur $[1, L]$ par :

$z(a) = \ln(h(a)) - \ln(h(a-1))$ et de rechercher les intervalles sur lesquels la fonction $z(a)$ est décroissante (a appartient à l'intervalle $[1, L]$ des niveaux de gris). Les seuils sont associés aux limites supérieures des intervalles de décroissance.

Pour chacun de ces intervalles, une approximation linéaire au sens des moindres carrés de la fonction $z(a)$ est effectuée par la droite $z=ma+b$

avec :

$$m = \frac{\sum_{a=\alpha}^{\beta} az(a) - \frac{\alpha + \beta}{2} \sum_{a=\alpha}^{\beta} z(a)}{\sum_{a=\alpha}^{\beta} a^2 - \frac{1}{\beta - \alpha - 1} \left(\sum_{a=\alpha}^{\beta} a \right)^2} \quad b = \frac{\sum_{a=\alpha}^{\beta} z(a) - m \sum_{a=\alpha}^{\beta} a}{\beta - \alpha - 1}$$

où $[\alpha, \beta]$ est l'un de ces intervalles maximaux sur lequel la suite $z(a)$ est décroissante.

Chaque mode c de l'histogramme associé à un intervalle $[\alpha_c, \beta_c]$, est approximé par une gaussienne dont la valeur moyenne μ_c et l'écart type σ_c sont donnés par :

$$\mu_c = \frac{b}{|m|} + \frac{\delta}{2} \quad \text{et} \quad \sigma_c = \sqrt{\frac{\delta}{|m|}}$$

δ désigne le pas de quantification des niveaux de gris qui est généralement égal à 1.

De cette façon, l'histogramme initial est corrigé et l'estimation des modes est améliorée.[87]

Cette méthode peut être appliquée de façon locale, si l'histogramme global est unimodal.

2.3.1.4. Algorithme des centres locaux par WILSON [86]

Cet algorithme ressemble à ISODATA. Il permet de déplacer itérativement les valeurs de $P^i(k)$ vers le centre de gravité le plus proche.

$P^i(k)$ est la densité de probabilité de l'attribut k de l'image à l'itération i , k est compris entre k_{\min} et k_{\max} . L'algorithme converge lorsque $p^n(k) = p^{n-1}(k)$.

On définit la moyenne glissante $m^i(k)$ par :

$$m^i(k) = \left[\frac{\sum_{k_1 \in D_{k_1}} k_1 p^i(k_1)}{\sum_{k_1 \in D_{k_1}} p^i(k_1)} \right]$$

D_{k_1} est l'étendue sur laquelle la moyenne glissante est calculée, elle correspond à une fenêtre de taille $2a+1$.

$$D_{k_1} = \{ \max\{(k-a), k_{\min}\} \dots \min\{(k+a), k_{\max}\} \}$$

La densité de probabilité à l'itération $i+1$ est donnée par :

$$p^{i+1}(k) = \sum_{k_1 \in D_{k_1}} p^i(k_1) \delta\{k - m^i(k_1)\}$$

δ représente le symbole de KRONECKER. L'équation précédente exprime le déplacement d'une partie des masses de $p^i(k)$ vers leurs centroïdes locaux.

2.3.1.5. Algorithme basé sur l'analyse discriminante par OTSU (1979) [86]

Cet algorithme permet de segmenter l'image originale en L classes disjointes en maximisant un critère statistique de séparabilité des classes.

Considérons le cas d'un seuil unique T . Soit $p(i)$ la densité de probabilité de l'attribut i de l'image et soient μ et σ^2 la valeur moyenne et la variance de cet attribut, données respectivement par :

$$\mu = \sum_{i=1}^I ip(i) \quad \sigma^2 = \sum_{i=1}^I (i - \mu)^2 p(i)$$

On calcule la probabilité d'un point d'appartenir à la classe 0 (en dessous du seuil) et celle d'appartenir à la classe 1 (en dessus de T). Ces probabilités sont respectivement données par :

$$\omega^0 = \omega(k) = \sum_{i=1}^T p(i)$$

$$\omega^1 = 1 - \omega(k) = \sum_{i=T+1}^I p(i)$$

Les valeurs moyennes des attributs calculés dans les classes 0 et 1 sont données par :

$$\mu(T) = \sum_{i=1}^T ip(i)$$

$$\mu - \mu(T) = \sum_{i=T+1}^I ip(i)$$

En les normalisant par la probabilité d'appartenance à chaque classe on obtient :

$$\mu_0 = \frac{\mu(T)}{\omega(T)}$$

$$\mu_1 = \frac{\mu - \mu(T)}{1 - \omega(T)}$$

La variance qui sépare les deux classes est alors donnée par :

$$\sigma_B^2(T) = \frac{(\mu(T) - \mu\omega(T))^2}{\omega(T)(1 - \omega(T))}$$

le seuil optimal T^* est celui qui maximise cet écart type.

2.3.1.6. Autres méthodes basées sur l'analyse d'histogramme

- Dans l'algorithme de BÖCKER[103], l'histogramme est balayé dans les deux directions, de 0 à 255 et de 255 à 0, le premier niveau de gris G_{min} à partir de 0 ayant une intensité non nulle est déterminé, puis le second niveau de gris G_{max} à partir de 255 et ayant une intensité non nulle est également déterminé. L'histogramme est lissé, puis la première intensité maximale à partir de G_{min} ainsi que la première intensité maximale à partir de G_{max} sont calculées. Le seuil global est celui qui sépare les deux régions identifiées par ces deux maximums.
- Une autre méthode basée sur la quantification d'histogramme est décrite par WANG [106]. Dans cette méthode, on commence par choisir la première moyenne m_1 , on calcule les moyennes et les seuils des K régions et si la dernière moyenne est proche du vrai centroïde de la dernière région, alors la première moyenne est correcte, sinon on recalcule la première moyenne en fonction de la distance entre la dernière moyenne et le vrai centroïde.
- Une autre méthode globale est exposée par BAE [105]. Elle consiste à :
 - calculer la moyenne cumulée du bord vers le milieu de l'image où l'objet est supposé exister (l'objet est plus clair que le fond)
 - calculer la moyenne cumulée du milieu vers le bordles frontières correspondent à la différence maximale entre les deux séries
 - calculer la moyenne de chaque région
 - le seuil est égal à la moyenne des deux moyennes
 - binarisation par rapport au seuil

2.3.2. Méthode hybride [86]

Dans cette approche décrite par KIBBY (1979), le seuil calculé T dépend d'une mesure locale $l(x,y)$ définie dans un domaine Ω , et d'une mesure globale $g(x,y)$ définie dans un domaine I . Ces deux informations sont regroupées dans un histogramme à deux dimensions représenté par un accumulateur $C(g,I)$.

- L'accumulateur est initialisé à 0 pour $g=1..G$ et $l=1..L$.
- Les attributs $g(x,y)$ et $l(x,y)$ sont calculés pour chaque point de l'image et l'accumulateur correspondant aux valeurs trouvées est incrémenté. La mesure globale peut être le niveau de gris du pixel et la mesure locale peut être une moyenne locale définie par :

$$l(x,y) = \frac{1}{(2a+1)^2} \sum_{\Delta x=-a}^a \sum_{\Delta y=-a}^a g(x+\Delta x, y+\Delta y),$$
 a étant la demi largeur de la fenêtre de moyennage.

- L'histogramme monodimensionnel est ensuite déduit de l'histogramme bidimensionnel soit:

- en considérant les valeurs proches de la diagonale de façon à ne considérer que les zones où le niveau de gris est proche de la moyenne locale ce qui correspond aux zones homogènes. L'histogramme monodimensionnel aura donc deux modes discernables : l'objet et le fond,

- en calculant deux histogrammes l'un correspondant aux points situés loin au dessus de la diagonale et l'autre aux points situés loin en dessous de la diagonale de l'histogramme bidimensionnel. Ce qui revient à prendre les points contours. Chaque histogramme possède un mode dont on calcule la valeur moyenne et le seuil optimal T et la moyenne arithmétique de ces deux moyennes.

Cette méthode peut également s'appliquer de façon locale sur des sous-images.

2.3.3. Méthodes locales

Dans cette approche, le seuil dépend d'une mesure locale calculée sur un domaine Ω puis intégrée sur toute l'image.

3.3.3.1. Méthode de KOHLER (1981) [86]

Elle consiste à diviser les points de l'image en vrais et faux contours. Le seuil optimal T est celui qui détecte le plus grand nombre de vrais contours et le plus petit nombre de faux contours.

Le nombre de points contours est donné par :

$$N(T) = \sum_{(a,b) \in A} f(a,b,T) \quad (3.1.1)$$

$$\text{avec } f(a,b,T) = \begin{cases} 1 & \text{pour } I(a) < T \leq I(b) \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \quad (3.1.2)$$

$I(a)$ est l'attribut du point a et A est l'ensemble des couples de points adjacents (a,b) tel que : $I(a) \leq I(b)$

Le contraste moyen est défini comme la moyenne des différences en valeurs absolues entre les niveaux de gris appartenant à l'intérieur et à l'extérieur du contour.

Le contraste total détecté par le seuil T est donné par :

$$C(T) = \sum_{(a,b) \in A} g(a,b,T) \quad (3.1.3)$$

$$g(a, b, T) = \begin{cases} \min\{(I(a) - T), (I(b) - T)\} & \text{pour } I(a) < T \leq I(b) \\ 0 & \text{sin on} \end{cases} \quad (3.1.4)$$

le contraste moyen est défini par :

$$\bar{C}(T) = \begin{cases} \frac{C(T)}{N(T)} & \text{pour } N(T) \neq 0 \\ 0 & \text{sin on} \end{cases} \quad (3.1.5)$$

le seuil optimal est celui qui maximise le contraste moyen.

$$T^* = T \text{ tel que } \bar{C}(T^*) = \max_{T=1..L} \{C(T)\} \quad (3.1.6)$$

Cette méthode peut être étendue aux cas de plus de deux classes.

3.3.3.2. Méthodes de seuillage basées sur l'entropie

L'entropie locale traduit le désordre, ou la largeur de l'histogramme ou la brillance. Elle est plus importante dans une région brillante que dans une région sombre.

Elle est définie par :

$$ENT = - \sum_{g=0}^L P_g \ln(P_g) \quad \text{avec } P_g = \frac{N_g}{N} \quad \text{pour une région de N pixels}$$

- BÖCKER et al. [103] ont rapporté parmi les algorithmes qu'ils ont utilisés pour le seuillage d'images, une méthode basée sur la maximisation de l'entropie interclasses.

$S = s_0 + s_1$ est la somme des entropies à maximiser

avec

$$s_0 = - \sum_{i=G_{\min}}^T \frac{P_i}{w_0} \bullet \log\left(\frac{P_i}{w_0}\right)$$

$$s_1 = - \sum_{i=T}^{G_{\max}} \frac{P_i}{w_1} \bullet \log\left(\frac{P_i}{w_1}\right)$$

avec :

$$P_i = \frac{his[i]}{N} ; N = \sum_{i=G_{\min}}^{G_{\max}} his[i] ; w_0 = \sum_{i=G_{\min}}^T P_i ; w_1 = \sum_{i=T}^{G_{\max}} P_i$$

Dans la première itération, le seuil T_1 est déterminé en calculant s_1 entre G_{\min} et G_{\max} , jusqu'à ce que s_1 soit maximal.

Dans la deuxième itération, s_2 est calculé entre G_{min} et T_1 .

- Une autre méthode de seuillage proposée par ZIMMER est basée sur une transformation de l'entropie [104]. Il s'agit de *la cross-entropie* qui mesure la distance entre deux distributions $P = \{p_1, p_2, \dots, p_N\}$ et $Q = \{q_1, \dots, q_N\}$

définie par :

$$D(Q, P) = \sum_{k=1}^N q_k \log_2 \left(\frac{q_k}{p_k} \right)$$

A partir de cette entropie une nouvelle formule est apparue : *Minimum Cross Entropy* (MCE). Elle permet d'exprimer différemment la probabilité q_k . Cette dernière est alors égale au rapport du niveau de gris du k^{eme} pixel sur la somme des niveaux de gris de tous les pixels de l'image.

Les deux niveaux de gris $\mu_1(t)$ et $\mu_2(t)$ choisis dans l'image segmentée sont donnés en fonction du seuil. La "cross entropy" est proportionnelle à l'expression suivante :

$$\eta(t) = \sum_{j=1}^{t-1} j h_j \ln \left(\frac{j}{\mu_1(t)} \right) + \sum_{j=t}^L j h_j \ln \left(\frac{j}{\mu_2(t)} \right)$$

avec :

$$\mu_1(t) = \frac{\sum_{j=0}^{t-1} j h_j}{\sum_{j=0}^{t-1} h_j} \quad \mu_2(t) = \frac{\sum_{j=t}^L j h_j}{\sum_{j=t}^L h_j}$$

h_j est le numéro du pixel ayant le niveau de gris j .

La minimisation de $\eta(t)$ est équivalente à la minimisation de la *cross-entropie* entre l'image originale et l'image segmentée. Le seuil optimal t est celui qui minimise $\eta(t)$.

La MCE est également étendue au cas bidimensionnel où deux variables sont utilisées (par exemple niveau de gris et entropie).

2.3.4. Méthodes dynamiques

Quelquefois, une segmentation globale n'est pas convenable et notamment dans le cas d'une non uniformité de l'éclairage dans l'image. Il est alors intéressant de diviser l'image en b

blocs et de calculer les seuils pour chaque bloc. La décomposition peut également se faire par points.

- par blocs : pour chaque région, un seuil optimal est calculé. Pour les régions où aucun seuil n'a été déterminé, le calcul se fait par interpolation par rapport aux régions voisines. Ensuite un seuil $T(k,l)$ est attribué pour chaque point de l'image. Si le point (k,l) se trouve sur le bord de l'image, on lui applique le seuil du bloc dont le centre est le plus proche, sinon on applique une interpolation bilinéaire par rapport aux seuils des quatre régions les plus proches.

- par point : C'est l'approche dite de relaxation. Elle se déroule en trois étapes :

a) à l'itération 0, la probabilité initiale d'appartenance à la classe a est assignée à chaque point i de l'image selon les relations suivantes :

$$p_{(i,a)}^0 > 0 \text{ pour } i = 1..I \text{ et } a \in A$$

$$\sum_{a \in A} p_{(i,a)}^0 = 1 \text{ pour } i = 1..I$$

b) un coefficient de compatibilité $r(i, a ; j, a')$ est calculé. Il représente la compatibilité ($r > 0$), l'incompatibilité ($r < 0$) ou l'indifférence ($r = 0$) qui lie l'attribution du point i à la classe a , avec l'attribution du point voisin j à la classe a' .

PELEG et ROSENFELD (1978) ont déterminé r par la relation suivante :

$$r(i, a, j, a') = \log \left(\frac{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N p(i, a) p(j, a')}{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N p(i, a') \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N p(i, a)} \right)$$

j_i est le voisin de i , on utilise le voisinage en 4 connexités.

c) Ces coefficients de compatibilité sont utilisés pour mettre à jour itérativement la probabilité initiale d'un point, en tenant compte de la classification de ses voisins directs.

Ceci est donné par :

$$p_{(i,a)}^{k+1} = \frac{p_{(i,a)}^k (1 + q_{(i,a)}^k)}{\sum_{a' \in A} p_{(i,a')}^k (1 + q_{(i,a')}^k)}$$

$q_{(i,a)}^k$ représente la variation (gain ou perte) de la confiance concernant l'appartenance du point i à la classe a , à l'itération k .

Cette variation se calcule en fonction des coefficients de compatibilité de la manière suivante :

$$q_{(i,a)}^k = \sum_{j \in V(i)} w_{ij} q_{(i,a;j)}^k$$

$V(i)$ est le voisinage du point i et w_{ij} sont les coefficients de pondération décrivant l'anisotropie de ce voisinage. Ces coefficients pondèrent la variation de la confiance concernant l'appartenance du point i à la classe a en fonction du point voisin j à l'itération k .

On a :

$$q_{(i,a;j)}^k = \sum_{a' \in A} p_{(j,a')}^k r(i,a;j,a')$$

Enfin la fonction originale est seuillée pour attribuer chaque point à la classe la plus probable.

$$i \in a \text{ si } p_{(i,a)}^k = \max_{a \in A} \{p^k(i,a)\}$$

2.3.5. Choix et implémentation

Nous avons d'abord considéré un histogramme typique de nos images de fluorescence. Nous avons constaté qu'il n'était pas unimodal mais que les modes ne sont pas clairement séparés. Nous avons donc essayé une méthode globale, mais par la suite nous avons constaté qu'elle n'était pas parfaitement adaptée. Pour cela, nous avons considéré une méthode dynamique en espérant obtenir de meilleurs résultats.

Nous avons donc implémenté et testé les méthodes suivantes :

- ISODATA (cf 2.3.1.1) : Ce choix est motivé par la simplicité de cet algorithme dont le principe (centre des masses) se retrouve dans plusieurs algorithmes globaux. Il permet une bonne segmentation des images dont l'histogramme n'est pas unimodal. Cet algorithme peut également être appliqué localement sur des sous-images, ou globalement après transformation de l'histogramme. Nous avons adapté l'algorithme initial à nos applications en le simplifiant pour le cas de deux et de trois classes et en choisissant pour chaque classe une intensité pour l'affichage différente de celle estimée et qui correspond au centres des masses. Ce choix permet d'augmenter le contraste dans l'image finale et correspond à des niveaux de 0 et de 255 dans le cas de la binarisation et de 0, 128 et 255 dans le cas de la classification en trois classes.

- Le seuillage par relaxation (cf 2.3.4): Cet algorithme est complexe mais possède une grande souplesse dans la classification de chaque point. Nous l'avons choisi car il a déjà donné selon la littérature, de bons résultats avec les images biomédicales. En plus, la classification de chaque point est basée sur celle de ses voisins et est indépendant de l'histogramme global. Cette approche serait efficace là où la première échouerait.

La segmentation par la méthode de relaxation dépend beaucoup de l'estimation initiale. Nous recherchons trois classes, nous devons donc fournir une estimation de la moyenne de chaque classe (triplet). Le résultat de l'application des triplets de valeurs suivantes : (30, 100, 220) ; (30, 60, 220) ; (10, 100, 220); (30, 100, 280) et (42, 128, 221) est donné par la figure 2.3.5.1. Le premier triplet correspond aux valeurs moyennes mesurées sur l'image originale sur des régions d'intérêt de 20x20 pixels positionnées respectivement sur le fond, la lésion et le tissu sain. Le dernier triplet correspond à une répartition équidistante des intensités comme c'est le cas pour ISODATA. Les triplets intermédiaires ont des valeurs décalées à droite ou gauche par rapport à celles du premier triplet.

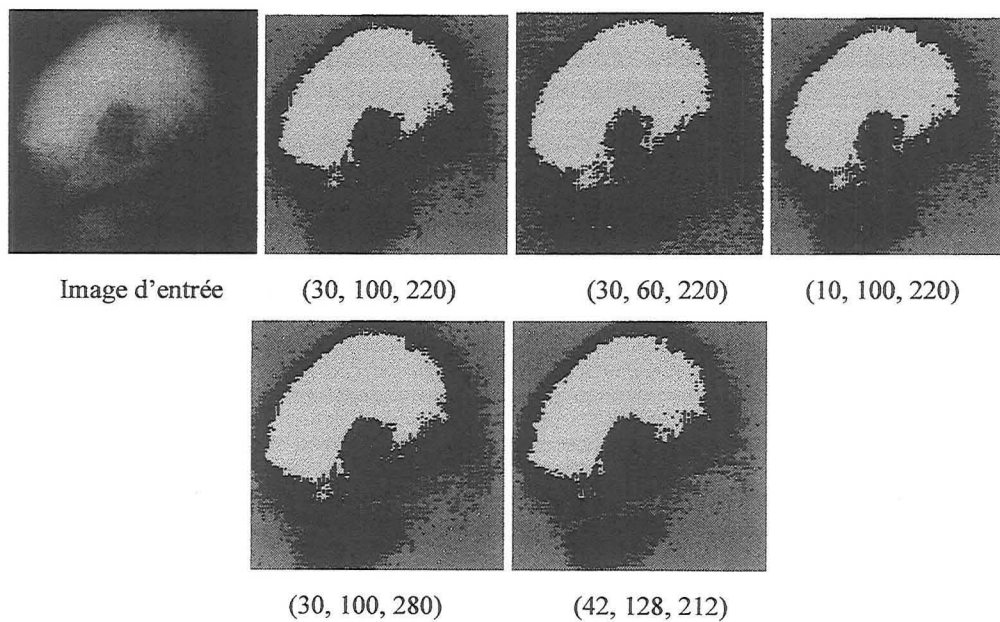


Figure 2.3.5.1: Résultats obtenus avec l'algorithme de relaxation avec des moyennes initiales différentes

Nous remarquons que la classification dépend du choix des moyennes initiales. Même avec un choix qui correspond aux valeurs moyennes locales (30, 100, 220), la classification n'est pas réussie à 100%. Cette dernière s'approche de celle de la dernière image où les moyennes initiales sont celles de ISODATA (42, 128, 212). Pour cela, et en raison de la difficulté de connaître à priori les valeurs moyennes locales sur les images traitées (puisque le traitement se fait en temps réel), nous avons décidé de prendre des valeurs initiales équidistantes.

Nous nous intéressons à présent, aux résultats obtenus avec les deux algorithmes de segmentation.

Les images obtenues après l'application de ISODATA et l'algorithme de relaxation sont données par la figure 2.3.5.2.

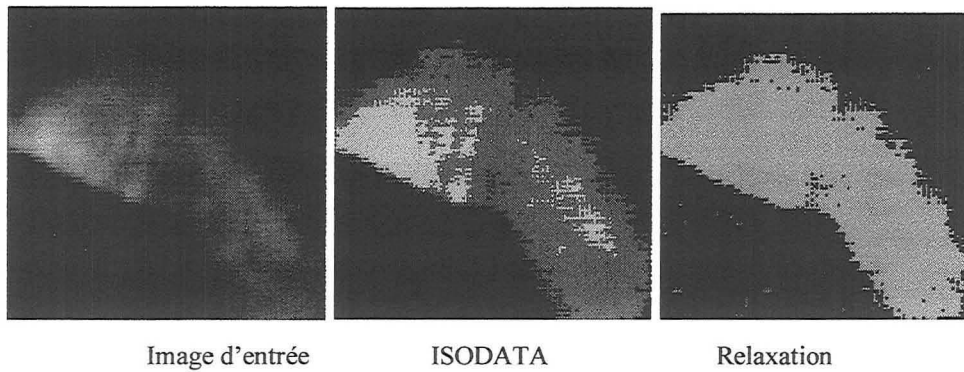


Figure 2.3.5.2 : Résultats de la segmentation de l'image d'autofluorescence d'une souris nude, par ISODATA et l'algorithme de relaxation

Nous constatons que ISODATA détecte trois classes :le fond, le tissu sain et la tumeur mais avec une partie du tissu sain. L'algorithme de seuillage par relaxation ne détecte que deux classes : le tissu sain avec la tumeur et le fond ; une petite partie de la tumeur est classée avec le fond.

ISODATA permet également de donner la valeur moyenne de chaque classe après la segmentation, ce n'est pas le cas de l'algorithme de relaxation. Ce dernier utilise les moyennes estimées de chaque classe pour l'initialisation des probabilités d'appartenance de chaque pixel à une classe donnée, mais ne met pas à jour ces moyennes pendant le traitement.

Une étude comparative sur la durée d'exécution des deux algorithmes a également été effectuée. Le temps relatif d'exécution pour chaque algorithme est représenté par la figure 2.3.5.3. La valeur maximale de l'ordonnée dans cette figure correspond à un temps de 57.59 secondes (Intel Pentium 75 MHz) .

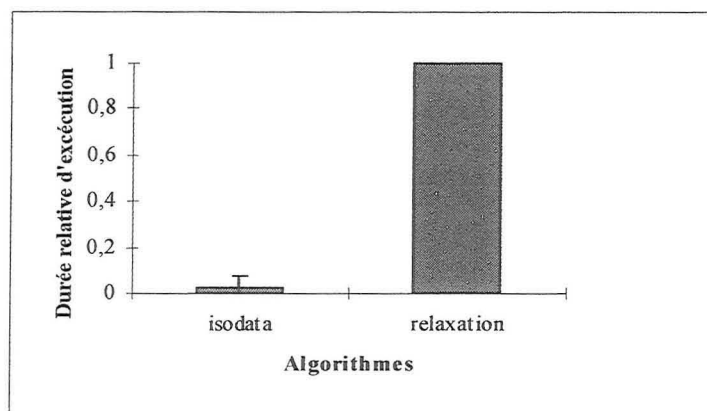


Figure 2.3.5.3 : Durée d'exécution des algorithmes de segmentation
(le maximum correspond à une durée de 57,79 secondes)

Nous pouvons constater que ISODATA possède un temps d'exécution beaucoup plus faible que la méthode de relaxation (ISODATA est 37.2 fois plus rapide que l'algorithme de relaxation). Ceci est normal car ISODATA manipule l'histogramme qui est une table de 256 caractères, alors que l'algorithme de relaxation manipule la matrice des probabilités qui a trois dimensions : les deux premières sont celles de l'image et la dernière correspond au nombre de classes.

En plus, la qualité de la segmentation est meilleure avec ISODATA en comparaison avec celle obtenue avec l'algorithme de relaxation.

2.4. Conclusions

A la suite de ces études comparatives effectuées entre différents algorithmes de restauration, de rehaussement de contraste et de segmentation, nous avons choisi pour chaque catégorie un algorithme qui sera inséré dans l'algorithme global de traitement d'image. Il s'agit du filtre Médian pour la restauration, du décalage d'histogramme vers les grandes intensités (HSX) pour le rehaussement de contraste et de ISODATA pour la segmentation.

3. Traitement d'images spécifique au système d'imagerie de fluorescence

3.1. Principe du traitement d'images relatif à la suppression de l'autofluorescence

Nous allons exploiter les fonctions de transfert de la caméra COHU, que nous avons déterminées dans la partie instrumentation, ceci pour corriger l'image de fluorescence dans le cas du diagnostic par fluorescence induite. En effet, dans ce cas, le signal de fluorescence est composé du signal d'autofluorescence et de la fluorescence due au photosensibilisant. Le traitement consiste à supprimer le signal dû à l'autofluorescence [141].

Soit un point "p", de l'image analysée, il est caractérisé par son spectre d'intensité d'autofluorescence noté $S_p(\lambda)$, λ étant la longueur d'onde. Ce spectre est la répartition dans le domaine fréquentiel de l'intensité globale de fluorescence. Cette intensité est donnée par :

$$I(p) = \int_{\lambda} S_p(\lambda) d\lambda \quad (3.1.1)$$

Elle est modulée par le système optique qui l'achemine (figure 3.1.1).

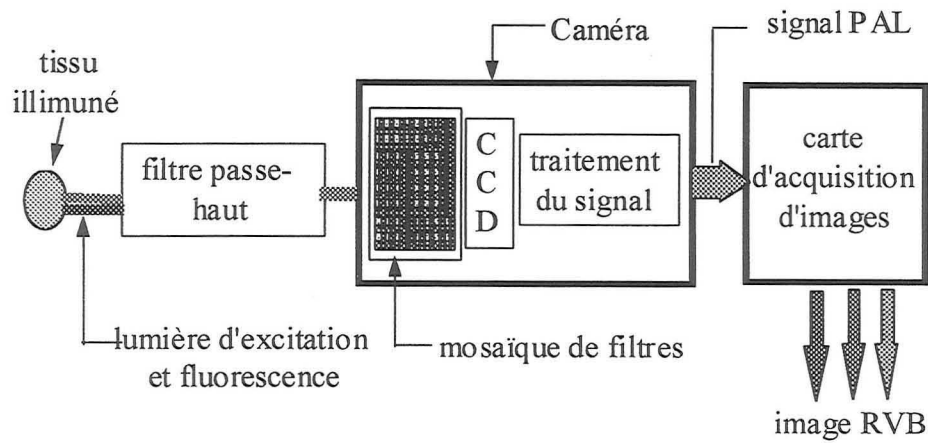


Figure 3.1.1 : Représentation schématique du chemin parcouru par la fluorescence depuis le tissu jusqu'à la conversion en mode RVB

A la sortie de ce système, le point se trouve dans trois images différentes caractérisées chacune par son spectre. Une deuxième représentation du système d'acquisition en termes de fonctions de transfert est fournie par la figure 3.1.2. On y distingue deux parties, l'une correspondant au passage à travers le filtre passe-haut et l'autre au passage de la CCD à la sortie numérisée en mode RVB.

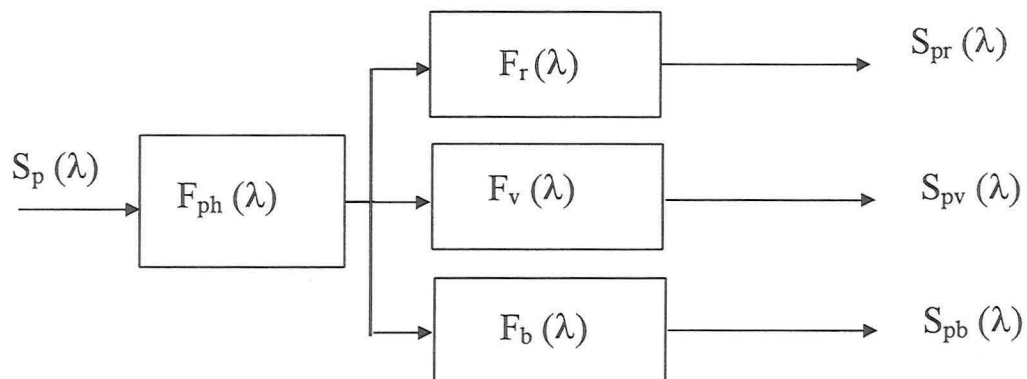


Figure 3.1.2 : Représentation du chemin parcouru par la fluorescence depuis le tissu jusqu'à la conversion en mode RVB avec les fonctions

Ces spectres sont notés respectivement : $S_{pr}(\lambda)$, $S_{pv}(\lambda)$ et $S_{pb}(\lambda)$.

et leur intégrales :

$$I_r(p) = \int_{\lambda} S_{pr}(\lambda) d\lambda \quad (3.1.2)$$

$$I_v(p) = \int_{\lambda} S_{pv}(\lambda) d\lambda \quad (3.1.3)$$

$$I_b(p) = \int_{\lambda} S_{pb}(\lambda) d\lambda \quad (3.1.4)$$

correspondent, à un facteur près, aux signaux mesurés en sortie du système. Ce sont les intensités de rouge, de vert et bleu de l'image couleur au point « p » de coordonnées (x,y).

Ces composantes vérifient les équations suivantes :

$$I_b(p) = \alpha \cdot I_b(p) \quad (3.1.5)$$

$$I_v(p) = \alpha \cdot I_v(p) \quad (3.1.6)$$

$$I_r(p) = \alpha \cdot I_r(p) \quad (3.1.7)$$

On adopte la notation générale suivante : $I_x^y(p)$ pour l'intensité d'un pixel p avec :

$x = (r, v \text{ ou } b)$; $y = \text{aut}$ (autofluorescence) ou PS (fluorescence due au PS) ou « _ » (PS et aut)

Dans le cas particulier où l'image analysée est celle d'un tissu ayant fixé le photosensibilisant, le spectre d'émission du point p représente la somme du signal d'autofluorescence (maximum d'émission dans le vert) et de la fluorescence due au photosensibilisant (maximum d'émission dans le rouge), l'intensité du rouge du pixel p est donnée par :

$$I_r(p) = I_r^{\text{aut}} + I_r^{\text{ps}} = \alpha \left(\int_{\lambda} S_{pr}^{\text{aut}}(\lambda) d\lambda + \int_{\lambda} S_{pr}^{\text{ps}}(\lambda) d\lambda \right) \quad (3.1.8)$$

l'intensité due au photosensibilisant est donc donnée par :

$$I_r^{\text{ps}}(p) = I_r(p) - \alpha \int_{\lambda} S_{pr}^{\text{aut}}(\lambda) d\lambda = I_r(p) - R \cdot I_v(p) \quad (3.1.9)$$

où R est défini par :

$$R = \frac{\alpha \int_{\lambda} S_{pr}^{\text{aut}}(\lambda) d\lambda}{\alpha \int_{\lambda} S_{pv}^{\text{aut}}(\lambda) d\lambda} = \frac{I_r^{\text{aut}}(p)}{I_v^{\text{aut}}(p)} = \frac{I_r^{\text{aut}}(p)}{I_v(p)} \quad (3.1.10)$$

Ceci est vrai si $I_v^{\text{aut}}(p) = I_v^i(p)$, c'est à dire, si la composante verte est la même avant et après injection du PS, cela est vérifié si le photosensibilisant n'a pas d'influence sur la composante verte de l'image de fluorescence, comme c'est le cas pour la mTHPC.

Le rapport R est calculé à partir de l'analyse spectrale. Il est constant, puisque la forme du spectre reste inchangée pour une classe donnée de tissus.

L'équation (3.1.9) est appliquée sur chaque point de la composante rouge de l'image de fluorescence.

3.2. Algorithme de traitement d'images appliqué dans le cas du diagnostic par fluorescence induite : GLOBI

L'objectif visé est de discerner la tumeur du tissu sain, à la base des informations fournies par l'image en lumière blanche et l'image de fluorescence. Les données dont nous disposons sont les suivantes :

- dans la composante rouge de l'image de fluorescence, le tissu sain se distingue du tissu tumoral par une intensité plus faible, cette intensité peut être assez faible pour être confondue avec le signal de fond et les ombres ;
- dans l'image en lumière blanche, il n'y a pas de phénomène de fluorescence, il n'y a par conséquent aucune différence de contraste (ou presque aucune, tout dépend de l'état pathologique), entre tissu sain et tissu malade. La seule différence de contraste qui existe est la luminosité entre tissus illuminés et tissus non illuminés (ombres et zones externes au faisceau) ;
- le faisceau de lumière blanche éclaire de la même façon les mêmes endroits que le faisceau laser (images de fluorescence et image en lumière blanche superposables).

L'algorithme présenté en figure 3.2.1, se déroule en plusieurs étapes.

Dans un premier temps, après la lecture de l'image couleur globale, nous supprimons le signal d'autofluorescence de la composante rouge de l'image de fluorescence, comme expliqué au paragraphe précédent, puis nous effectuons un filtrage de l'image de fluorescence et de l'image en lumière blanche pour supprimer le bruit. Les étapes suivantes se succèdent pour parvenir à la normalisation de l'image de fluorescence par rapport à la variation de l'illumination (principalement due à un positionnement quelconque du faisceau d'excitation par rapport au site ou à la géométrie du site).

- la composante rouge de l'image blanche B_R est seuillée de façon à attribuer une intensité nulle aux zones sombres.

- si un pixel $B_R(i,j)$ est nul, alors le pixel correspondant de la composante rouge est rendu nul. Ceci à pour effet de limiter la zones de correction aux pixels éclairés,

- la composante rouge de l'image de fluorescence F_R est divisée par B_R et multipliée par un facteur d'échelle $\alpha = \frac{B_{\min} \cdot 255}{F_{\max}}$, pour les pixels $F_R(i,j)$ tel que $B_R(i,j)$ est différent de zéro.

F_{\max} est l'intensité maximale de F_R et B_{\min} est l'intensité minimale et différente de zéro de B_R .

$\forall i, j \in [0, N - 1] \quad \frac{F_R(i, j)}{B_R(i, j)} \leq \frac{F_{\max}}{B_{\min}}$, N étant la dimension de l'image. le facteur α permet

d'étaler les intensités au maximum. Notons que la valeur 255 ne sera atteinte que si :

$$\exists i, j \in [0, N - 1] \quad \frac{F_R(i, j)}{B_R(i, j)} = \frac{F_{\max}}{B_{\min}}$$

Cette normalisation corrige la fluorescence de chaque pixel comme si l'excitation reçue était uniforme et proportionnelle à l'intensité moyenne de la lumière blanche. Ceci est possible grâce à l'unicité de la fibre optique d'excitation et à la linéarité en puissance du signal de fluorescence comme le montre la figure 3.2.2 dans laquelle la fluorescence émise par un fantôme (à base de fluorescéine) est mesurée à différentes puissances d'excitation.

- les pixels $F_R(i, j)$ tel que $B_R(i, j)$ est nul sont mis à zéro. Ceci a pour effet de distinguer les zones non illuminées (classifiées avec le fond dans la segmentation de l'image blanche) des zones utiles de F_R ayant une faible intensité.

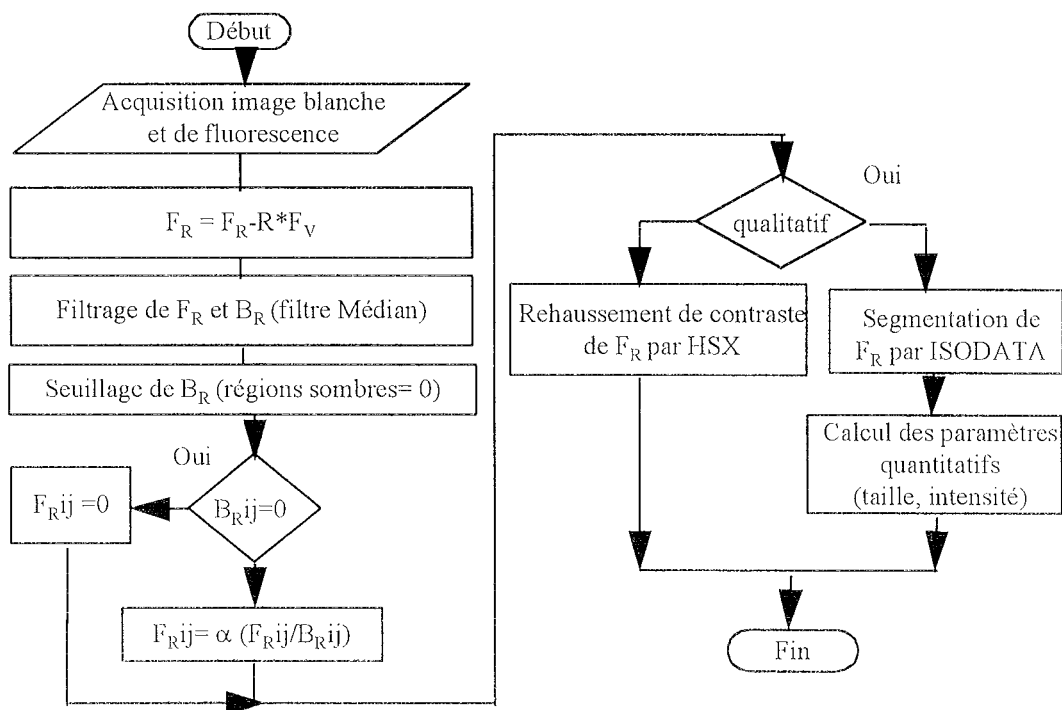


Figure 3.2.1 : Organigramme de traitement d'images appliqué dans le cas du diagnostic par fluorescence induite

Ensuite, selon le choix de l'opérateur, le traitement sera dirigé vers une analyse qualitative ou quantitative. Dans le premier cas F_R est rehaussée par HS avec décalage vers les grandes intensités.

Dans le deuxième cas, F_R est segmentée en trois zones : la première englobe les zones non fluorescentes, la deuxième concerne le tissu sain dont l'intensité est plus faible que la tumeur, et la dernière classe correspond à la tumeur.

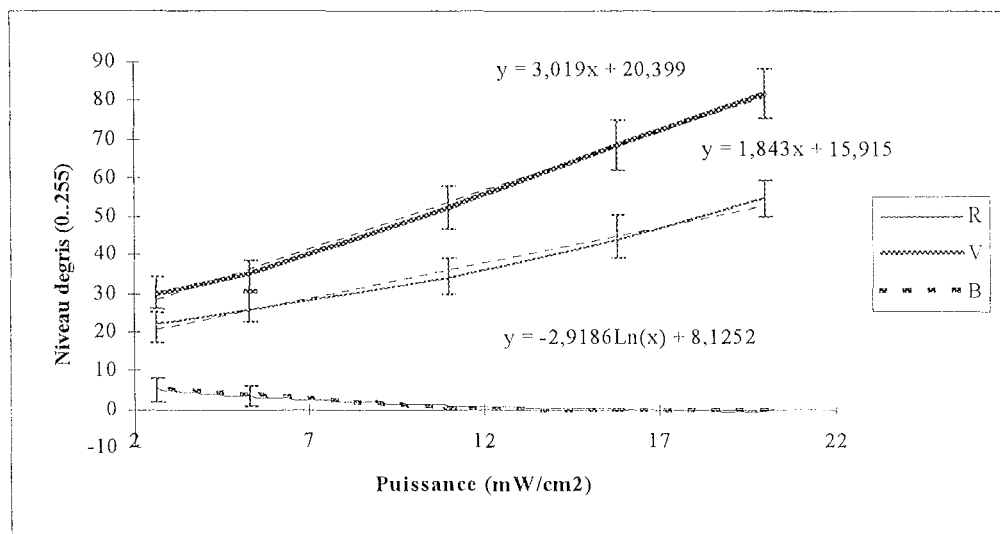


Figure 3.2.2 : Etude de la variation du signal de fluorescence d'un fantôme à base de fluorescéine en fonction de la puissance d'excitation (LASER Krypton)
(les courbes en pointillés sont les approximations des courbes réelles)

A la suite de cette segmentation, deux opérations sont effectuées : le calcul de la taille relative de la tumeur et du tissu sain et les intensités moyennes de la tumeur et du tissu sain. La taille de chaque zone est obtenu à partir du nombre de pixels de chaque zone dans l'histogramme résultant de la segmentation. Les intensités moyennes sont celles fournis par ISODATA (centres de gravité de chaque région) multiplié par le facteur $\beta = \frac{B_{moy}}{\alpha}$ B_{moy} est l'intensité moyenne de l'image en lumière blanche et α est le facteur d'échelle défini précédemment.

La connaissance des intensités moyennes de chaque région peut permettre une étude pharmacologique de la drogue.

3.3. Algorithme de traitement d'images appliqué dans le cas du diagnostic par autofluorescence : GLOBAL

Les données sont légèrement différentes de celles du premier algorithme :

- il y a un seul signal utile : l'autofluorescence ;
- l'information de fluorescence est contenue dans la composante verte et non dans la composante rouge ;

- dans l'image de fluorescence, la tumeur se distingue du tissu sain par un signal de fluorescence plus faible ; ce signal est parfois trop faible et peut être confondu avec le bruit de fond ;
- l'image en lumière blanche possède les mêmes caractéristiques citées dans le cas du diagnostic par fluorescence induite.

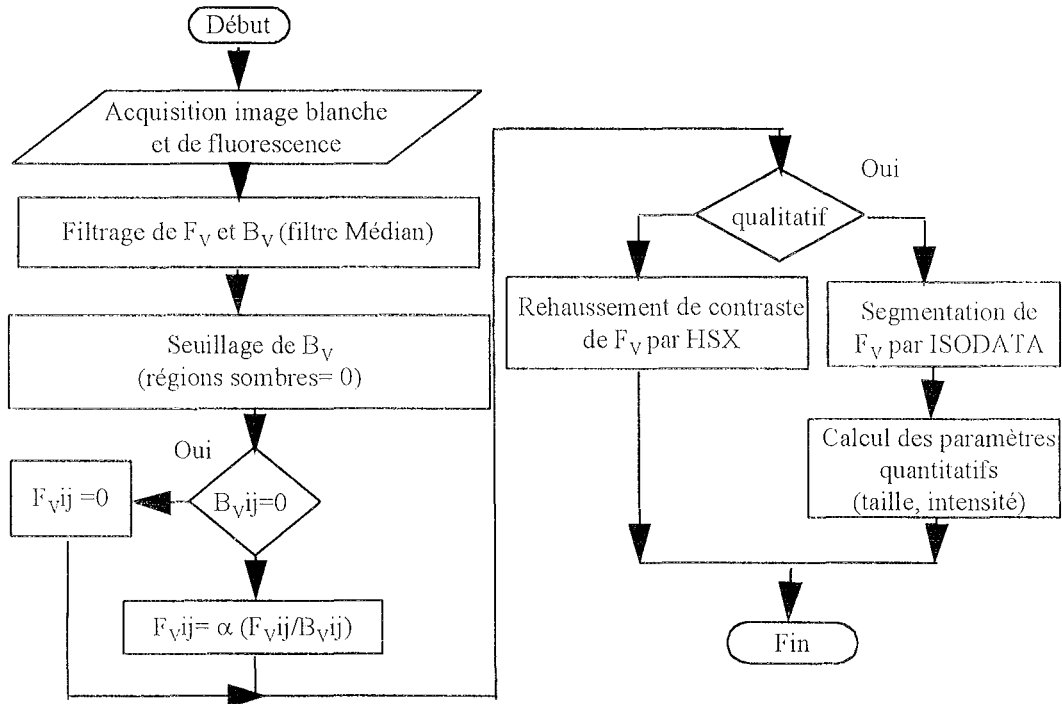


Figure 3.3.1 : Organigramme de traitement d'images appliqué dans le cas du diagnostic par autofluorescence

L'algorithme de traitement d'images décrit par la figure 3.3.1 et appliqué dans le cas du diagnostic par autofluorescence, est presque identique à celui du paragraphe précédent. Les seules variantes sont les suivantes :

- la première opération n'est pas effectuée,
- tous les traitements concernent les composantes vertes de l'image de fluorescence.

4. Conclusions

Dans cette partie, nous avons testé et comparé différents algorithmes de restauration, de rehaussement de contraste ou de contour et le segmentation. La comparaison s'est effectuée à la base de : la qualité visuelle, la durée d'exécution et la mesure d'un paramètre traduisant l'amélioration apportée par l'algorithme (rapport signal sur bruit pour la restauration et mesure de contraste pour le rehaussement de contraste).

En ce qui concerne la restauration c'est le filtre Médian (meilleur rapport signal sur bruit et plus faible durée d'exécution) qui est le meilleur candidat.

Pour le rehaussement de contraste nous avons choisi HSX (décalage d'histogramme vers les grandes intensités) en raison de sa faible durée d'exécution, de son important contraste mesuré (maximal si on ne tient pas compte de SOBEL à 8 directions) et de la qualité visuelle de l'image rehaussée.

Pour la segmentation nous avons choisi ISODATA pour sa rapidité (méthode globale) et son efficacité sur les images biologiques.

Nous avons construit les algorithmes globaux appliqués au diagnostic par autofluorescence et par fluorescence induite en insérant les algorithmes de restauration de rehaussement de contraste et de segmentation préalablement choisis. Ces deux derniers algorithmes exploitent à la fois l'image de fluorescence et l'image en lumière blanche pour parvenir à un rehaussement de contraste entre tumeur et tissu sain ou à l'identification de la tumeur. Dans le cas du diagnostic par fluorescence induite un paramètre de correction est calculé au cours d'une analyse spectroscopique du signal d'autofluorescence du site examinée. Cette correction peut être jugée facultative si le signal d'autofluorescence est faible en comparaison avec celui induit par le photosensibilisant.

PARTIE IV : MESURES ET RESULTATS

INTRODUCTION

Dans cette partie, nous allons tester le matériel et le logiciel du système d'imagerie pour vérifier sa validité.

Le but recherché est de :

- pouvoir distinguer la tumeur du tissu sain puis éventuellement corréler le signal au stade pathologique, lorsque le diagnostic se fait en autofluorescence,
- distinguer la fluorescence induite par le fluorophore indépendamment de l'autofluorescence et corréler l'intensité du signal à la concentration intracellulaire de fluorophore.

Les mesures effectuées avec le système d'imagerie sont complétées par des mesures en spectrofluorimétrie, car le dispositif d'imagerie donne une quantité globale (l'intensité de rouge ou de vert) qu'il est important de situer dans un domaine spectral.

Nous n'avons pas pu appliquer le système d'imagerie sur des patients à cause de certaines limites :

- le faisceau d'excitation laser est très faible en sortie du module de déviation optique,
- la caméra n'est pas assez sensible à la fluorescence qui résulte de cette excitation, lorsqu'elle est couplée au cystoscope dont les pertes sont 10 fois plus importantes qu'avec l'objectif standard.

De ce fait, les applications *in-vivo* seront principalement faites avec l'objectif standard. Pour valider le dispositif avec le cystoscope, nous avons travaillé avec des fantômes fluorescents. En effet, dans ce cas nous pouvons augmenter le signal de fluorescence jusqu'à ce qu'il soit détectable par le système sans augmenter ni la puissance d'excitation ni la sensibilité de la caméra (ces deux derniers paramètres sont dans leur domaine limite). Ceci nous permet de savoir comment ce système se comportera lorsque la puissance d'excitation sera optimisée, lorsque le détecteur sera plus sensible, ou lorsque le signal de fluorescence sera plus intéressant (choix du fluorophore).

Cette partie est divisée en deux chapitres. Dans le premier chapitre nous étudierons les réponses du système d'imagerie à différents phénomènes optiques (fluorescence, absorption, diffusion). Dans le deuxième chapitre nous donnerons les résultats des algorithmes de traitement d'images sur les fantômes, sur des cobayes animaux et sur des lésions humaines.

CHAPITRE 1 : REPONSES DU SYSTEME D'IMAGERIE A CERTAINS PHENOMENES OPTIQUES

1. Etude de la sensibilité de la caméra à la base des mesures spectroscopiques

La grandeur à mesurer est la fluorescence qui est de nature photométrique : nous la mesurons avec le spectrofluorimètre et la caméra.

Le spectrofluorimètre nous fournit une mesure radiative en Watts/nm. La caméra, comme l'oeil, possède une sensibilité exprimée en lux. C'est une grandeur photométrique qui sera convertie en une grandeur électrique analogique, laquelle sera digitalisée puis quantifiée en Intensités variant de 0 à 255.

Pour transposer les études spectrofluorimétriques à l'étude en imagerie, il faut convertir la grandeur radiative en grandeur photométrique.

1.1 L'oeil humain

La mesure photométrique dépend de l'apparence de la source de radiation vis à vis de l'œil humain. En d'autres termes, la variation de la réponse de l'œil en fonction de la longueur d'onde et le spectre de la radiation déterminent la valeur photométrique. De ce fait, les sources invisibles (ultraviolette ou infrarouge) n'ont pas de valeurs photométriques même si elles ont une radiation intense.

La réponse standard de l'œil humain est notée $V(\lambda)$ (Figure 1.1.1)

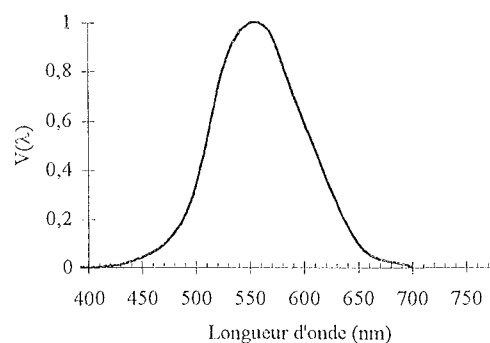


Figure 1.1.1 : Réponse de l'œil

Pour faire la conversion d'une grandeur photométrique vers une grandeur radiométrique, il faut connaître la distribution spectrale de la radiation. Cette dernière sera multipliée par la réponse photométrique de l'oeil et par un facteur de conversion de 683.[137]

Soit PQ la quantité photométrique et SPQ_λ la quantité radiométrique. Nous aurons alors :

$$PQ = 683 \int SPQ_\lambda \cdot V(\lambda) \cdot d\lambda \quad (1.1.1)$$

Dans le cas discret, l'intégrale devient une somme et PQ est alors donnée par :

$$PQ = \left(\sum_n (SPQ_{\lambda_n}) \cdot V(\lambda) \right) \cdot \Delta\lambda \quad (1.1.2)$$

Où SPQ_{λ_n} exprimée en $\text{mWm}^{-2}\text{nm}^{-1}$, est la valeur moyenne de la quantité radiométrique dans l'intervalle spectrale $\Delta\lambda$.

Le résultat obtenu est multiplié par 683 pour obtenir une unité en lm/m^2 ou en lux (lm : lumen) [137]

1.2. La caméra

Dans ce cas l'œil est remplacé par la caméra, nous considérons alors la fonction de transfert de l'une des composantes RVB de la caméra. Nous prenons cependant le même facteur de correction (683) pour passer des Watts au Lumens.

Le signal à mesurer est celui de l'autofluorescence de la main dont le spectre d'émission de fluorescence à une excitation de (0.7 mW/cm^2 , 410 nm) est donné par la figure 1.2.1.

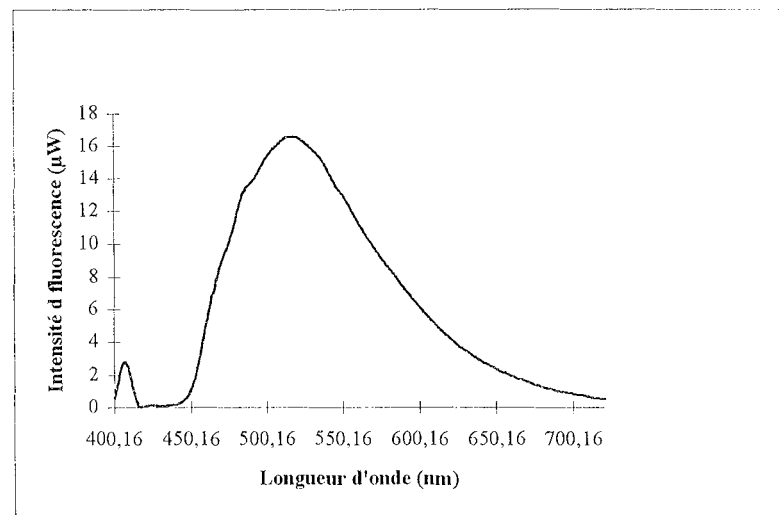


Figure 1.2.1 : Spectre d'autofluorescence de la paume de la main normalisé en unités proches des microwatts

Nous allons appliquer la relation (1.1.2) en remplaçant $V(\lambda)$ par la réponse verte, bleue et rouge de la caméra respectivement et SPQ_λ par les coordonnées du spectre d'autofluorescence. Le produit du spectre de la figure 1.2.1 avec ces réponses est représenté par la figure 1.2.2.

En intégrant les trois courbes et en multipliant les résultats par le facteur de normalisation, nous obtenons les valeurs suivantes : 0.6 lux pour la réponse rouge, 0.9 lux pour la réponse verte et 0.1 lux pour la réponse bleue.

Comme la sensibilité de la caméra est de 13 lux, on se situe en deçà du seuil de détection.

Par exemple, en ce qui concerne la composante verte dans laquelle nous récupérons une grande partie du signal d'autofluorescence, et en admettant que l'excitation soit proportionnelle à l'émission, il faudrait que l'excitation soit environ 15 fois plus importante pour générer un signal détectable par la caméra, ce qui correspondrait à une irradiance de 10 mW/cm^2 .

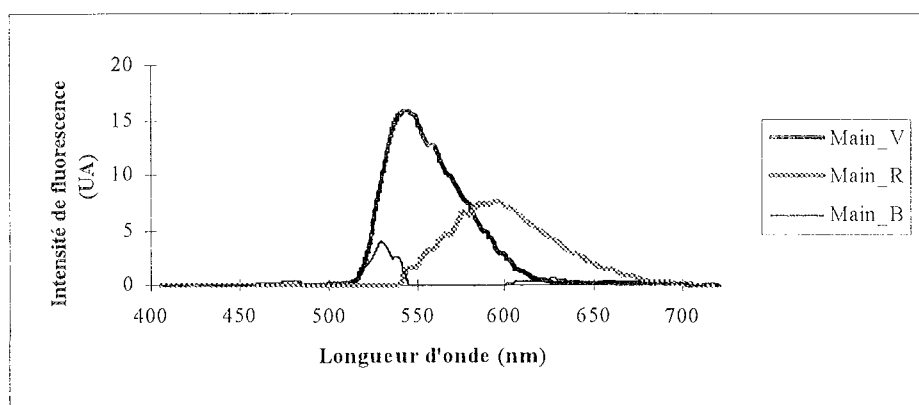


Figure 1.2.2 : Produit du spectre d'autofluorescence de la main par les réponses RVB de la caméra

Nous avons effectivement constaté que c'est à partir de cette valeur que nous obtenons un signal de fluorescence détectable.

En ce qui concerne la composante rouge, il faut que l'irradiance soit de 15.4 mW/cm^2 pour que l'autofluorescence soit détectée.

On peut par exemple exploiter cette différence de puissance minimale entre composante verte et composante rouge pour faire en sorte que seul le signal de fluorescence induite soit détecté dans la composante rouge et pas l'autofluorescence.

2. Etude statistique du bruit généré par le dispositif d'imagerie

Le signal de fluorescence est en général faible. Il est important de savoir si le signal mesuré correspond effectivement à la fluorescence ou au bruit de fond.

Nous avons étudié le bruit généré par le système d'imagerie en procédant à la saisie d'images d'un fond noir, en absence ou en présence du faisceau d'excitation (410 nm).

2.1. Pas d'excitation

L'espérance mathématique et l'écart type ont été calculés sur une série de 10 images consécutives. Par la suite, les moyennes arithmétiques de ces deux paramètres ont été calculées sur l'ensemble des images (figure 2.1.1). Ces mesures sont exprimées en intensités de vert de rouge et de bleu. Les barres d'erreurs correspondent aux moyennes arithmétiques des écarts types des 10 images de bruit.

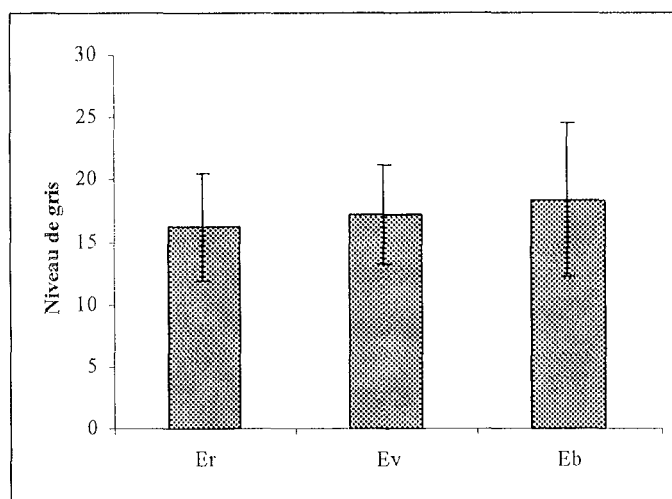


Figure 2.1.1 : Espérances mathématiques et écarts type du bruit
(Er, Ev et Eb espérances des composantes rouge, verte et bleue ;
les barres d'erreur correspondent aux écarts type de chaque composante)

2.2. En présence du faisceau d'excitation

Pour étudier l'influence du faisceau d'irradiation sur le bruit de fond, nous avons saisi des images d'un fond noir, illuminé par un faisceau d'irradiation à 410 nm avec des puissances variables. Les espérances mathématiques et les écarts types des composantes rouge verte et bleue de ces images sont respectivement représentés dans la figure 2.2.1 et 2.2.2

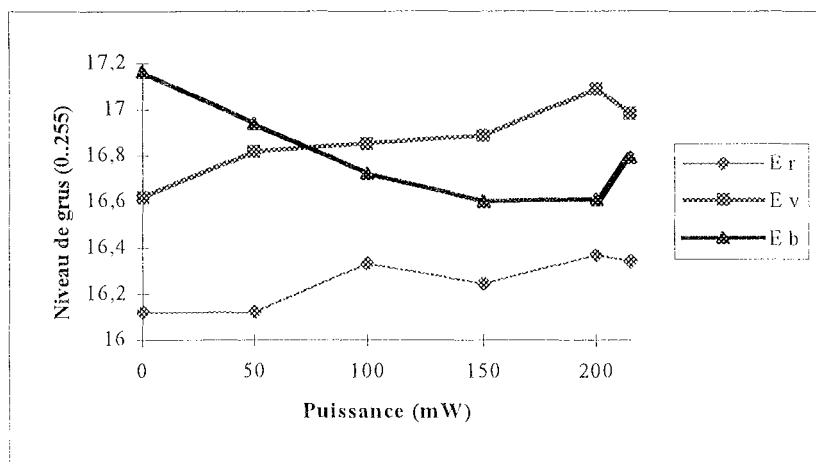


Figure 2.2.1 : Variation de l'espérance mathématique du bruit de fond en fonction de la puissance d'excitation (Er, Ev, Eb espérances des composantes rouge verte et bleue)

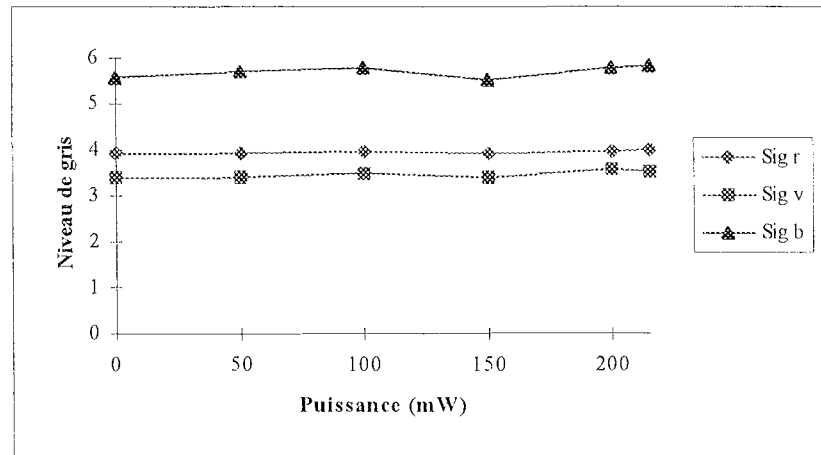


Figure 2.2.2 : Variation de l'écart type du bruit en fonction de la puissance d'excitation (Sigr, Sigv et Sigb correspondent respectivement à l'écart type de la composante rouge verte et bleue)

D'après ces résultats, nous pouvons dire que :

- L'espérance mathématique de la composante rouge du bruit délimitée par son écart type ($E_r \pm Sig_r$) ne change pas en l'absence ou en présence de faisceau, soit respectivement : 16.3 ± 3.9 et 16.2 ± 4.4 . Cette dernière valeur correspond à la moyenne arithmétique des espérances mathématiques calculées pour chaque puissance d'excitation. Notons que la puissance maximale (215 mW) est nettement supérieure à celle utilisée pour le diagnostic.
- L'espérance mathématique de la composante verte du bruit délimitée par son écart type ($E_v \pm Sig_v$) a pour valeurs respectives en absence et en présence de faisceau : 16.9 ± 3.5 et 17.2 ± 4 . La différence n'est pas significative.
- L'espérance mathématique de la composante bleue du bruit délimitée par son écart type ($E_b \pm Sig_b$) a pour valeurs respectives en absence et en présence de faisceau : 16.8 ± 5.7 et 18.4 ± 6.2 . La différence n'est pas significative.

Donc le bruit de fond ne dépend pas de la puissance du faisceau d'excitation. Par ailleurs, pour que les mesures soient significatives, il faut faire en sorte de se placer en dehors des limites énoncées ci-dessus.

3. Mise au point d'un modèle fluorescent

Ce modèle doit posséder les mêmes propriétés optiques que les tissus. Ces propriétés sont la fluorescence, l'absorption et la diffusion.

La diffusion est simulée en utilisant des **intralipides**.

L'absorption est simulée par un composé qui absorbe dans la zone d'excitation (violet-bleu). Le composé le plus naturel est l'hémoglobine. Cependant ce composé n'est pas le

plus facile à manipuler en solution. Nous avons choisi le **rouge de Méthyl** dont le spectre d'absorption est donné en comparaison avec celui de l'hémoglobine par la figure 3.1

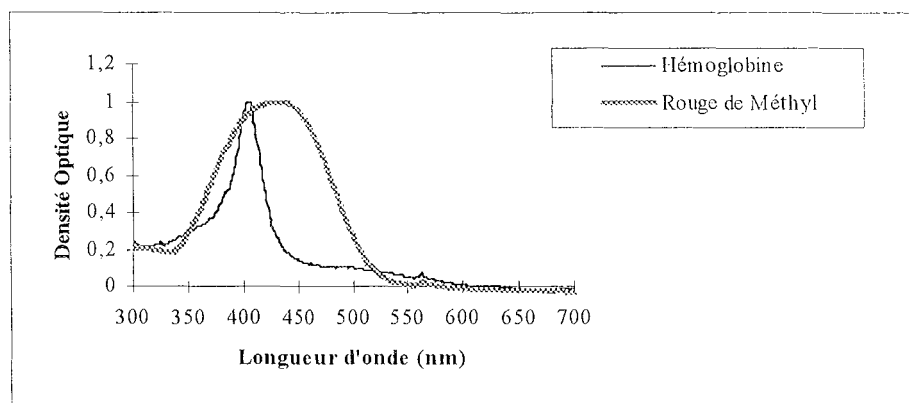


Figure 3.1 : Spectre d'absorption du rouge de méthyl et de l'hémoglobine

Comme le montre cette figure le rouge de méthyl est un bon candidat pour simuler l'absorption des tissus dans la zone d'excitation.

En ce qui concerne la fluorescence, nous savons que les tissus biologiques renferment un certain nombre de fluorophores endogènes comme le collagène le NADH les flavines,...(partie I, chapitre 2). L'ensemble de ces fluorophores constitue le signal d'autofluorescence. Des techniques spectroscopiques (somme de gaussiennes, durée de vie des fluorophores...) ont été développées pour retrouver les proportions de chaque composant à partir du (ou des) spectre(s) de fluorescence [115, 122]. Dans cette étude nous ne projetons pas de connaître la proportion individuelle des fluorophores endogènes *in-vivo* car la caméra ne permet pas cette dispersion (spectrale ou temporelle) : elle mesure une quantité globale représentant l'intégrale du spectre d'émission de fluorescence dans deux fenêtres spectrales (rouge et verte). Par conséquent, le fantôme fluorescent que nous voulons préparer ne doit pas avoir nécessairement un spectre d'émission de fluorescence identique à celui des tissus biologiques. Il suffit d'arriver à une intensité de fluorescence dans la fenêtre spectrale désirée. Donc pour simuler l'autofluorescence nous n'aurons pas besoin de combiner plusieurs fluorophores.

Pour choisir un composant fluorescent, nous avons représenté les spectres d'émission de fluorescence de certains fluorophores (*collagène* (1 mg/ml), de *NADH* (1 mg/ml) des *flavines* (1mg/ml)), le spectre de la fluorescéine (0.1 µg/ml) et celui d'un tissu humain (figure 3.2).

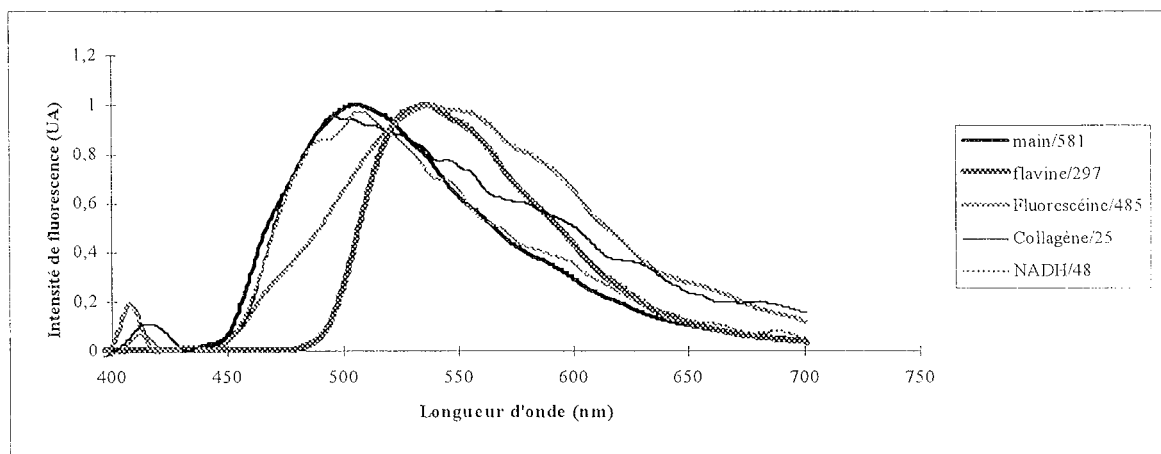


Figure 3.2 : Spectres d'émission de fluorescence de certains fluorophores en comparaison avec la paume de la main, pour une excitation à 410 nm
(collagène (1 mg/ml); NADH (1 mg/ml); flavines (1mg/ml); fluorescéine (0.1 µg/ml))

Les spectres sont normalisés par rapport au maximum du pic d'émission. L'encadré de la figure 3.2 indique pour chaque composant (fluorophore ou fantôme) la valeur de ce pic. Nous remarquons que le spectre de NADH s'approche le plus de celui de la paume de la main. Cependant pour obtenir une intensité de fluorescence du même ordre de grandeur que le tissu humain, il faut une grande concentration de NADH ($\cong 12$ mg/ml).

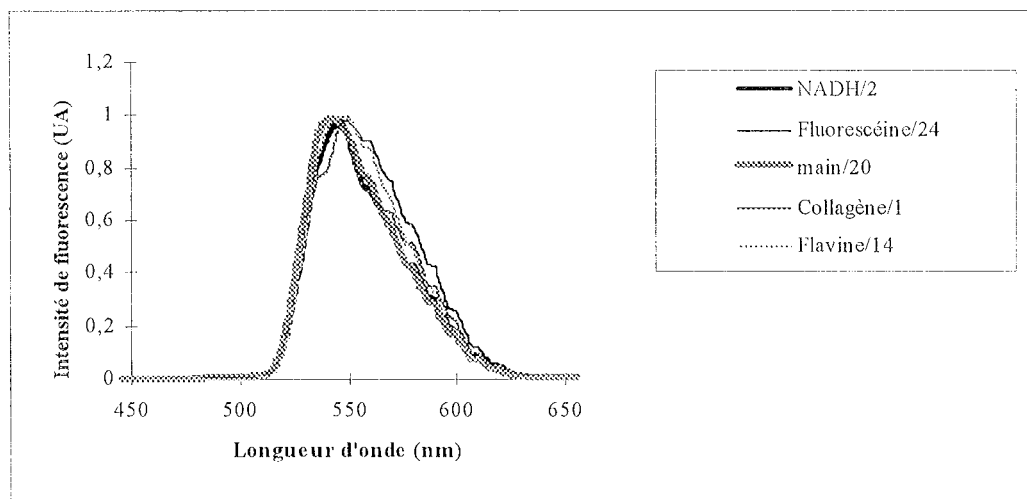


Figure 3.3 : Composantes vertes des spectres de fluorescence des fluorophores en comparaison avec la paume de la main, pour une excitation à 410 nm
(collagène (1 mg/ml); NADH (1 mg/ml); flavines (1mg/ml); fluorescéine (0.1 µg/ml))

Nous considérons plus particulièrement les composantes vertes de ces spectres obtenues après la multiplication des spectres originaux par la composante verte de la caméra (figure 3.3). Nous remarquons alors que l'allure de toutes les courbes s'approche de celle de la paume de la main.

Nous avons mesuré l'écart entre chaque courbe et celle de la paume de la main en considérant le test statistique des séries appariées [156]

Les valeurs obtenues sont indiquées au tableau 3.1.

diff/main	NADH	collagène	flavine	fluorescéine
eps	3,27	0,198	3,64	7,19
erreur	0,001	0,84	0,0001	1E-09
Intégrale	103,43	95,40	92,06	90,15

Tableau 3.1 : Ecart entre les composantes vertes des spectres d'émission de fluorescence des fluorophores choisis (NADH, Collagène, flavine, fluorescéine) par rapport au spectre de la main

D'après ces résultats, c'est l'allure du collagène qui est la plus proche de celle de la main suivis de NADH puis des flavines et enfin de la fluorescéine.

Il ne faut pas oublier que dans l'image de fluorescence, l'intensité de vert correspond à l'intégrale de la composante verte du spectre de fluorescence. Donc les erreurs de décalage entre les différentes courbes n'ont un sens que vis à vis de l'intégrale.

Le tableau 3.2 indique les intégrales obtenues pour chaque spectre normalisé, ce qui permet de les comparer en supposant que leurs pics maximum soient égaux pour les concentrations choisis (première ligne du tableau 3.2).

Nous voyons en particulier que l'intégrale du fantôme à base de fluorescéine dont le spectre s'écarte le plus de celui de la main, est plus importante que les autres valeurs. Cependant et compte tenu du facteur multiplicateur utilisé lors de la normalisation des spectres (ligne 2), c'est la fluorescéine qui présente le plus faible écart d'intensité par rapport à la main (ligne 3) pour une concentration de seulement 5 µg/ml de fluorescéine en comparaison avec les autres fluorophores dont la concentration est de 1 mg/ml.

	main/20	flavine/14	collagène/1	NADH/2	fluorescéine/24
Intégrale	91,84	95,40	92,06	90,15	102,80
f	1	1,37	19,95	10,19	0,74
ΔI		39,35923	1744,926	826,54	15,31

Tableau 3.2 : Intégrales des composantes vertes des spectres d'émission de fluorescence normalisés des fluorophores choisis (NADH, Collagène, flavine, fluorescéine) et de la main (f : facteur multiplicateur pour arriver à une intensité égale à celle obtenue avec la main, ΔI : différence d'intensité par rapport à la main)

Nous nous sommes intéressés aux facteurs susceptibles de modifier l'allure spectrale et par conséquent son intégrale, d'un fantôme à base de fluorescéine. Ce dernier est noté i60rmxx ce qui signifie qu'il comprend, 60 µg/ml d'intralipides et une concentration xx µg/ml (xx

varie de 10 à 50) en rouge de méthyl et une concentration constante de fluorescéine (5 $\mu\text{g/ml}$). Nous avons remarqué que le spectre de fluorescence est décalé vers les plus grandes longueurs d'onde lorsque la concentration de rouge de méthyl augmente (tableau 3.3) ; ΔI est l'écart de l'intensité de fluorescence d'un fantôme donné par rapport à celui dont le signal de fluorescence est le plus important (*i60rm10*). Cet écart est calculé au pic d'émission de fluorescence de chaque fantôme. $\Delta\lambda$ est le décalage en nm de chaque spectre avec comme origine le spectre dont le décalage vers les grandes longueurs d'onde est le plus important (*i60rm30*).

abs	i60rm10	i60rm20	i60rm30	i60rm40
ΔI	0,00	7,18	25,91	41,72
$\Delta\lambda$	4,86	3,78	0,00	2,7

Tableau 3.3 : Décalage en nm des spectres d'émission de fluorescence en fonction de la concentration du rouge de méthyl

Ces décalages sont négligeables et ne seront pas pris en considération.

Nous n'avons observé aucun décalage des pics d'émissions en absence d'intralipides et en faisant varier la concentration de rouge de méthyl. Par ailleurs, aucun décalage n'a été noté en absence de rouge de méthyl et en faisant varier la concentration d'intralipides.

Nous avons également considéré les fantômes (à base de fluorescéine, d'intralipides et de rouge de méthyl) et les fluorophores précédents avec une excitation dans l'UV, nous avons remarqué que les pics d'émission sont décalés vers les petites longueurs d'onde en comparaison avec ceux obtenus précédemment à 410 nm. En ce qui concerne l'intensité de fluorescence, elle est liée au spectre d'excitation de chaque fluorophore. En effet et à titre d'exemple, le NADH qui est excitable dans l'UV a une émission de fluorescence plus importante quand il est excité dans l'UV que quand il est excité dans le violet. Cette dernière remarque est facultative pour la suite de notre étude car la longueur d'onde d'excitation est fixée autour de 410 nm (410 ± 2 nm pour la spectroscopie avec la lampe Xénon filtrée ou 407 nm et 413 nm pour l'imagerie avec le laser Krypton). Cependant si une fenêtre spectrale était fixée dans des longueurs d'onde plus courtes (autour de 340 nm), il faudrait tenir compte de cet écart d'intensité de fluorescence.

A la suite de cette étude comparative nous avons choisi d'utiliser la fluorescéine comme source de fluorescence. Ce choix est motivé par plusieurs facteurs valables pour une excitation à 410 nm :

- son spectre d'émission de fluorescence a une allure générale qui s'approche de celui du tissu humain,
- la différence spectrale avec le tissu humain n'est pas contraignante en imagerie car le paramètre considéré n'est pas l'allure du spectre mais son intégrale dans la bande passante de la voie verte de la caméra filtrée,
- son coût est faible et sa fluorescence dans la fenêtre spectrale verte de la caméra est importante pour une faible concentration.

Rappelons que parmi les critères de comparaison entre tissus sains et tissus pathologiques nous avons :

- une intensité de fluorescence plus importante dans les tissus sains aux alentours de 520 nm ou
- une absorption plus importante dans les tissus pathologiques,
- une émission dans le rouge due aux porphyrines endogènes dans certains tissus pathologiques.

Ainsi pour simuler un tissu sain et un tissu pathologique pour un diagnostic par autofluorescence, nous considérerons l'un de ces trois critères.

- Le premier critère sera satisfait en utilisant une concentration plus importante de fluorescéine dans le fantôme simulant le tissu sain que dans celui simulant le tissu pathologique, tout en gardant les autres paramètres constants (mêmes concentrations de rouge de méthyl (absorption) et d'intralipides).
- Le deuxième critère sera satisfait en utilisant une concentration plus importante de rouge de méthyl dans le fantôme simulant le tissu pathologique que dans celui simulant le tissu sain.
- Le troisième critère est satisfait par la protoporphyrine IX (**PpIX**), dont la concentration est plus importante dans le fantôme simulant le tissu pathologique.

En ce qui concerne le diagnostic par apport d'un photosensibilisant, nous utiliserons la mTHPC ou l'HpD ou la PpIX avec une concentration plus importante dans le fantôme simulant le tissu pathologique que dans celui simulant le tissu sain.

4. Etude de la réponse du système d'imagerie en fonction de la variation des paramètres optiques du modèle fluorescent

La différence d'intensité que nous relevons entre tissu sain et tissu pathologique correspond, par exemple, à une différence de concentration de fluorophores endogènes. Pour connaître cette fonction de correspondance qui lie une différence de fluorescence et plus généralement l'atténuation (absorption + diffusion) à une différence d'intensité, nous devons étudier la réponse de notre système d'imagerie en variant la concentration des composants qui simulent la fluorescence, l'absorption et la diffusion. Nous considérons les réponses des composantes rouge et verte (RV).

Dans ce qui suit, le rouge de méthyl sera noté RM , la fluorescéine F et les intralipides I , la mTHPC M , la PpIX P et l'HpD H .

4.1. Etude en fonction de la variation de la diffusion

Nous avons considéré la réponse de la caméra en fonction de la concentration des intralipides en fixant la concentration de la fluorescéine à $5\mu\text{g/ml}$: sans rouge de méthyl (figure 4.1.1) et avec rouge de méthyl à $50\mu\text{g/ml}$ (figure 4.1.2) et $10\mu\text{g/ml}$ (figure 4.1.3).

Nous ne constatons pas de variation des réponses RV dans la figure 4.1.1. Les discrètes fluctuations peuvent être dues au bruit compte tenu des erreurs de mesure.

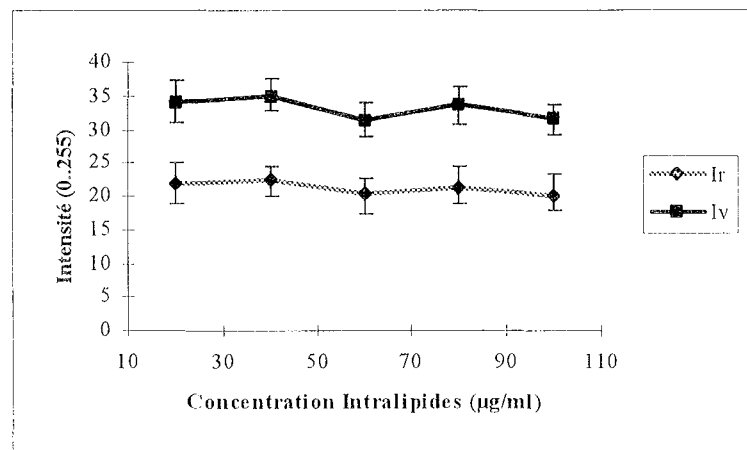


Figure 4.1.1 : Réponse de la caméra en fonction de la variation de la diffusion

($I=10..100\mu\text{g/ml}$; $F= 5\mu\text{g/ml}$; $RM = 0$; $\lambda= 410\text{ nm}$)

Dans le cas où nous avons une concentration de $50\mu\text{g/ml}$ de rouge de méthyl (figure 4.1.2), les courbes obtenues sont indépendantes de la concentration des intralipides. Le niveau de fluorescence est plus faible en relation avec l'absorption du milieu.

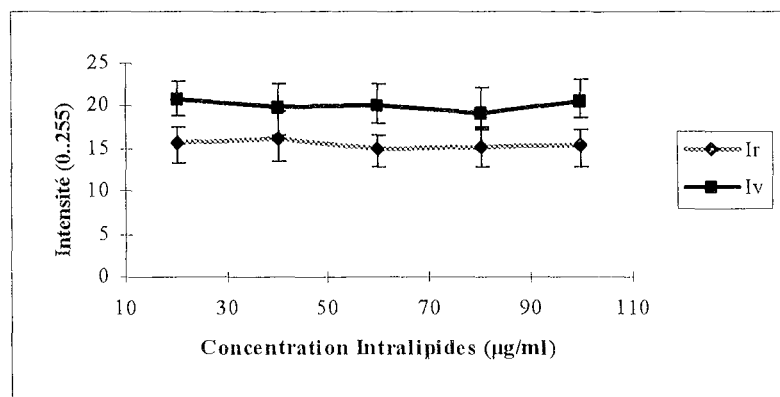


Figure 4.1.2 : Réponse de la caméra en fonction de la variation de la diffusion
(I=10..100µg/ml ; F= 5µg/ml; RM = 50 µg/ml)

Avec une concentration de rouge de méthyl à 10 µg/ml (figure 4.1.3), il n'y a pas de variation selon la concentration d'intralipides et le niveau de fluorescence est intermédiaire entre les deux milieux précédemment étudiés (RM = 0 et RM = 50 µg/ml)

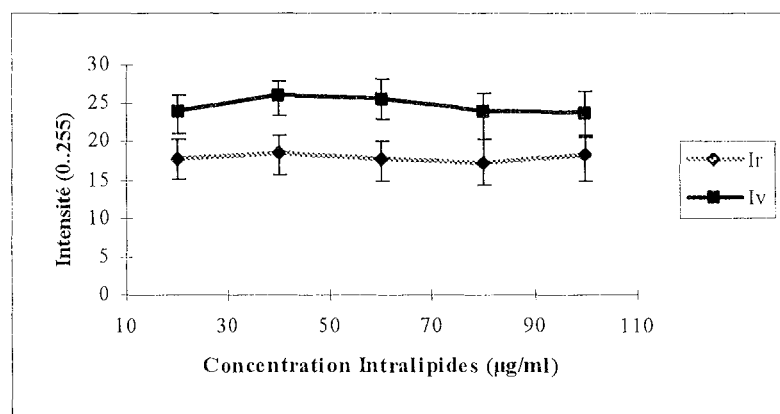


Figure 4.1.3 : Réponse de la caméra en fonction de la variation de la diffusion
(I=10..100µg/ml ; F= 5µg/ml; RM = 10 µg/ml)

La variation de la concentration des intralipides n'influence pas le signal de fluorescence.

Cependant, la présence ou l'absence des intralipides n'est pas sans conséquence car cette substance permet la diffusion de la fluorescence et en particulier sa rétrodiffusion vers le capteur. Pour vérifier l'effet des intralipides sur le signal mesuré, nous avons considéré trois fantômes à base de fluorescéine, de mTHPC et de PpIX. Nous mesurons le rapport de fluorescence des composantes RVB avec et sans intralipides (tableau 4.1.1).

D'après ces données nous constatons que le gain du signal de fluorescence mesurée par la caméra en présence des intralipides est important.

Rapport d'intensité de fluorescence dans chaque voie	R_{intra}/R	V_{intra}/V	B_{intra}/B
Fantôme fluorescéine	2.8	2.5	0.0008
Fantôme mTHPC	2.22	0.96	0.95
Fantôme PpIX	11.99	8.17	6.6

Tableau 4.1.1 : Influence des intralipides sur le signal de fluorescence

4.2. Etude en fonction de la variation de l'absorption

Cette réponse est donnée pour des fantômes dont la concentration de fluorescéine et d'intralipides est constante et dont la concentration de rouge de méthyl est variable (figure 4.2.1). Les réponses verte et rouge décroissent de façon logarithmique selon les équations suivantes :

$$I_v = \frac{68}{\log_{10}(RM + 1) + 1} \text{ avec } R^2 = 0.961$$

$$I_r = \frac{33.13}{\log_{10}(RM + 1) + 1} \text{ avec } R^2 = 0.898$$

On peut dire que pour des concentrations supérieures à 20 µg/ml de rouge de méthyl, le milieu devient très absorbant.

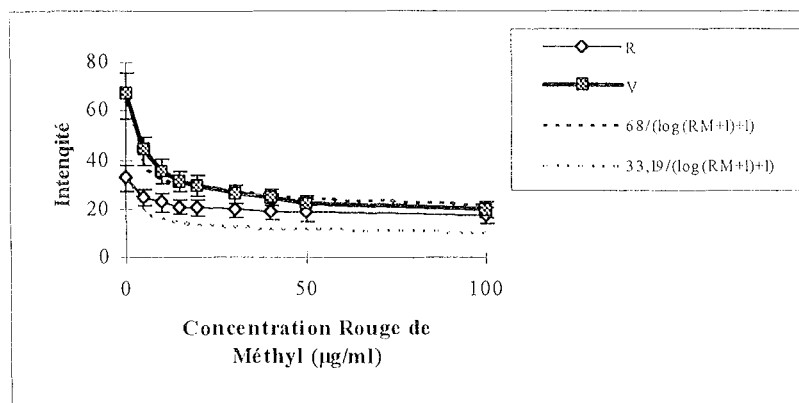


Figure 4.2.1 : Réponses RV de la caméra en fonction de la variation de l'absorption

($I=100$ µg/ml ; $F=10$ µg/ml et $RM=(0..100)$ µg/ml) ; $\lambda=410$ nm)

Les réponses rouge et verte obtenues à partir de l'analyse spectrale (figure 4.2.2) varient dans le même sens que dans la figure 4.2.1.

$$S_v = \frac{68}{\log_{10}(RM + 1) + 1} \text{ avec } R^2 = 0.961$$

$$I_r = \frac{33.13}{\log_{10}(RM+1)+1} \text{ avec } R^2 = 0.973$$

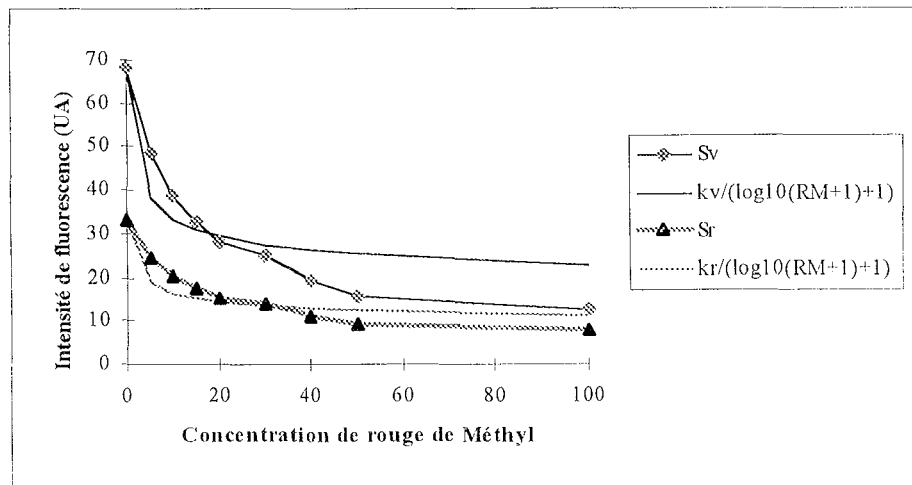


Figure 4.2.2: Intégrales des spectres RV en fonction de la variation de l'absorption
($F=10 \mu\text{g/ml}$, $I = 100 \mu\text{g/ml}$, $RM = 0..100\mu\text{g/ml}$, $\lambda = 410 \text{ nm}$)

4.3. Etude en fonction de la variation de la fluorescence

4.3.1. Variation de la Fluorescéine (autofluorescence)

Nous mesurons le signal émis par une série de fantômes ayant une absorption et une diffusion ($RM = 20 \mu\text{g/ml}$, $I = 100 \mu\text{g/ml}$) constantes et une fluorescence variable (figure 4.3.1.1)

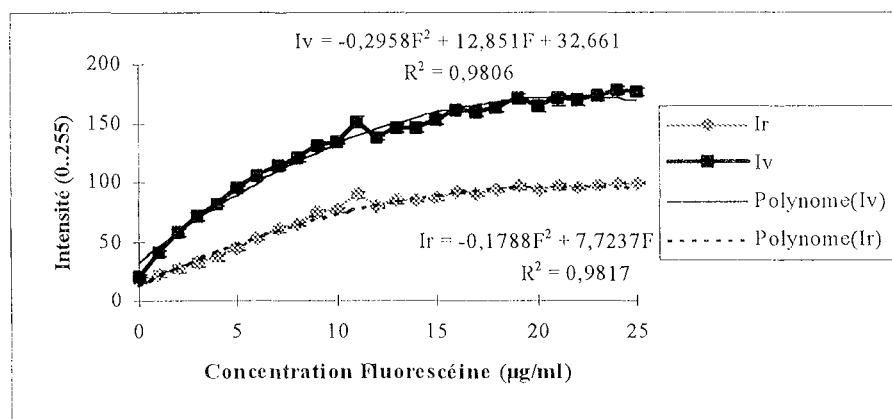


Figure 4.3.1.1 : Variation des intensités de vert (Iv) et de rouge (Ir) de la caméra pour $RM = 20 \mu\text{g/ml}$
; $I=100 \mu\text{g/ml}$; $F=0..25 \mu\text{g/ml}$; $\lambda = 410 \text{ nm}$, $p = 15 \text{ mW/cm}^2$; optique : cystoscope

La réponse verte suit une loi polynomiale du deuxième degré selon l'équation suivante :

$I_v = -0.3F^2 + 12.8F + 32.7$ avec un coefficient de détermination $R^2 = 0.98$. Le faible coefficient de F^2 signifie que la réponse est presque linéaire mais qu'elle atteint la saturation lorsque la concentration de fluorescéine augmente. La réponse rouge est également

polynomiale du deuxième degré avec des coefficients plus faibles que ceux de la réponse verte ($I_r = -0.18F^2 + 7.72F + 13.8$; coefficient de détermination $R^2 = 0.98$). ce qui est prévisible puisque la fluorescéine émet principalement dans la composante verte, comme nous pouvons le voir dans la figure 4.3.1.2 où le spectre d'émission de fluorescence d'un des fantômes à base de fluorescéine est superposé aux réponses RV du système d'acquisition. L'étude comparative avec l'analyse spectrale se fait en multipliant les spectres originaux de chaque fantômes avec les réponses RV du système d'imagerie. Un exemple d'une telle multiplication est montré dans la figure 4.3.1.3. Enfin pour chaque fantôme de la série considérée, les spectres RV sont intégrés (de 400 nm à 710 nm) de façon à obtenir deux composantes RV spectrales, que nous représentons dans figure 4.3.1.4.

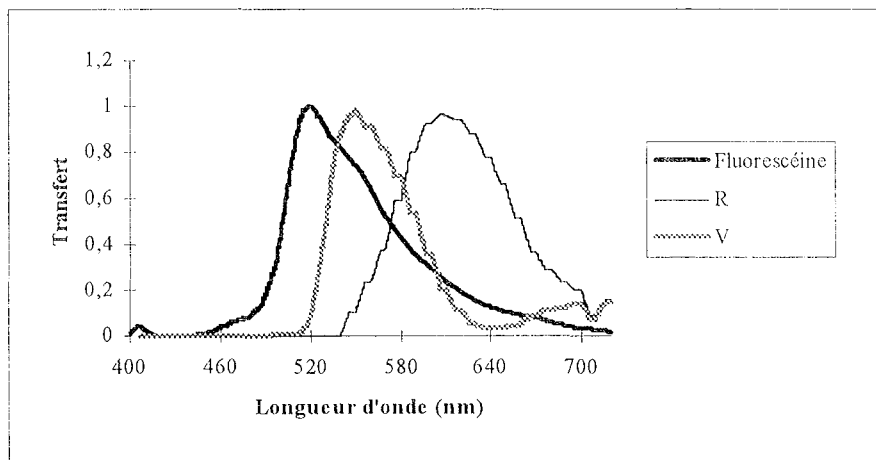


Figure 4.3.1.2 : Superposition du spectre d'émission de fluorescence d'un fantôme à base de fluorescéine avec les fonctions de transfert RV du système d'acquisition

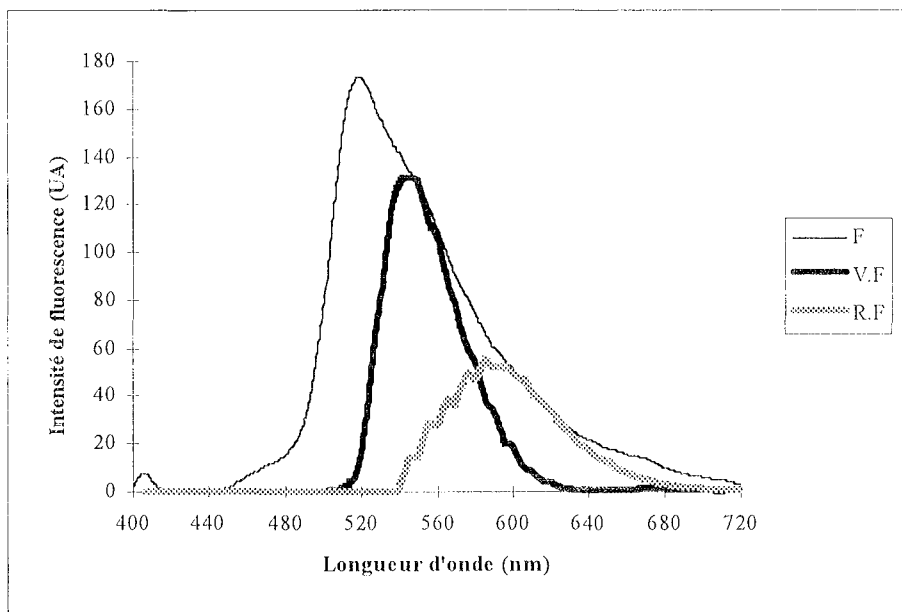


Figure 4.3.1.3 : Spectre d'émission de fluorescence (F) et spectres RV (R.F et V.F) d'un fantôme à base de fluorescéine

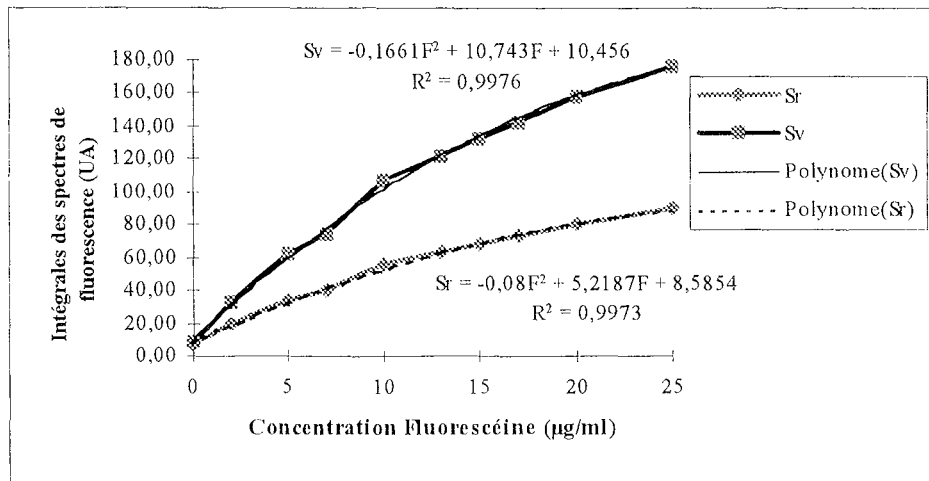


Figure 4.3.1.4: Intégrales des spectres RV en fonction de la concentration de la fluorescéine

(RM=20 µg/ml, I = 100 µg/ml, F = 0..25µg/ml, λ= 410 nm ; P=15mW/cm²)

Les réponses rouge et verte obtenues à partir de l'analyse spectrale sont divisées par une constante (dans ce cas 192) de façon à faire coïncider le maximum de la réponse spectrale avec l'intensité maximale enregistrée (correspond au fantôme ayant la plus grande concentration de fluorescéine). Cette division nous permet de comparer les deux résultats. Les réponses spectrales RV suivent également une loi polynomiale du deuxième degré selon les équations suivantes :

$$Sv = -0.166F^2 + 10.75F + 10.5 \text{ avec } R^2 = 0.997$$

$$Sr = -0.08F^2 + 5.22F + 8.58 \text{ avec } R^2 = 0.997$$

Les coefficients de F^2 et de F pour Sv et Iv ainsi que pour Sr et Ir sont légèrement différents. Ceci peut être dû à la variation de la puissance d'excitation pendant l'acquisition des images de fluorescence. Ce qui est fort probable car nous avons noté une fluctuation des intensités dans les images en lumière blanche prises en même temps que les images de fluorescence pour ces fantômes. L'erreur de mesure des réponses RV du système d'acquisition peut également être considérée comme l'une des raisons de cette différence entre réponses spectrales modulées par le système d'imagerie et réponses en analyse d'images pure.

4.3.2. Etude en fonction de la fluorescence induite par la mTHPC

Dans cette étape nous mesurons la réponse de la caméra sur une série de fantômes dont la variable est la concentration de la mTHPC en fixant les concentration d'intralipide et de rouge de méthyl (figure 4.3.2.1).

La réponse rouge est linéairement croissante avec un pente voisine de 1 ($I_r = 1.18M + 18.96$; $R^2=0.973$), tandis que la réponse verte est pratiquement constante ($I_v = -0.27M + 19.99$; $R^2=0.959$) avec une intensité moyenne voisine du bruit. La superposition du spectre d'émission de fluorescence de l'un des fantômes de cette série avec les réponses RV du système d'acquisition d'images est donnée dans la figure 4.3.2.2.

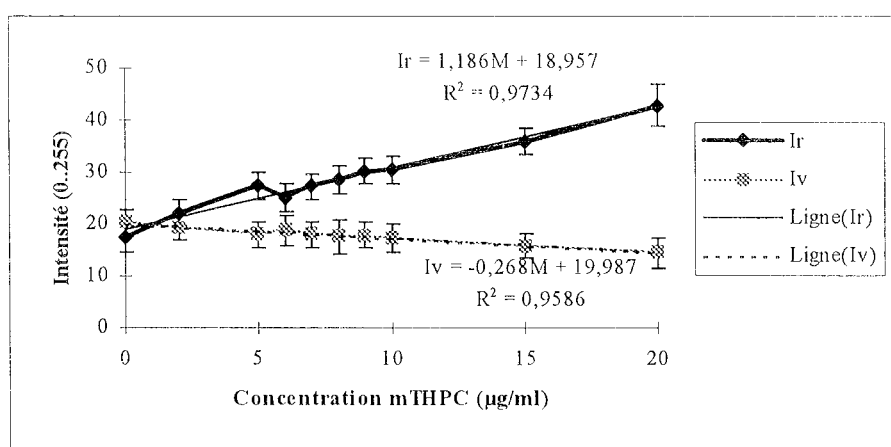


Figure 4.3.2.1 : Etude de la réponse de la caméra en fonction de la variation de la concentration de la mTHPC (avec RM = 20 µg/ml et I = 20 µg/ml ; Excitation ($\lambda = 410$ nm : 15 mW/cm²)

Nous remarquons que la mTHPC est transmise exclusivement à travers la composante rouge (ce photosensibilisant répond aux conditions de correction en fluorescence induite énoncées dans la partie III, 3.1).

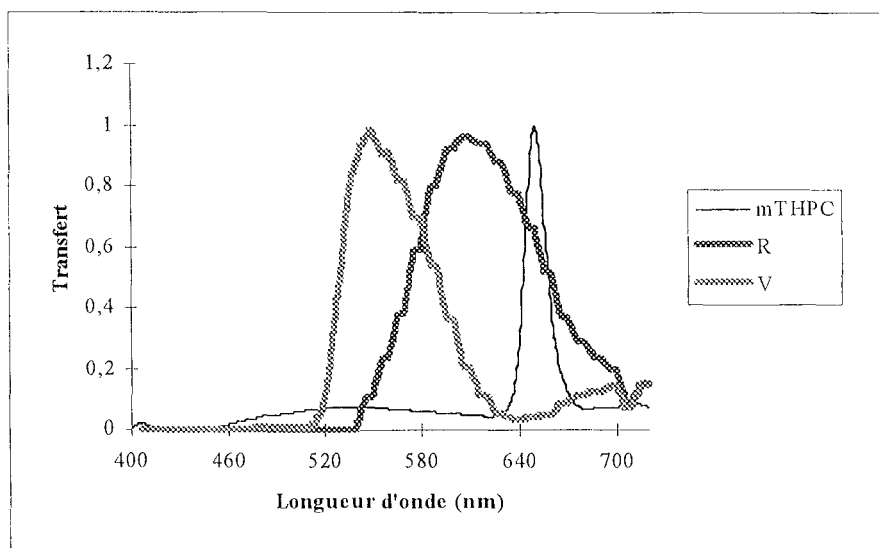


Figure 4.3.2.2: Superposition du spectre d'émission de fluorescence de la mTHPC aux réponses RV du système d'acquisition d'images

La multiplication du spectre de fluorescence de chaque fantôme de cette série avec les réponses RV puis l'intégration de chaque paire de spectres ainsi obtenus, nous conduit aux réponses spectrales RV. Ces dernières sont multipliées par une constante d'échelle égale à $\text{Max}(I_v, I_r) / \text{Max}(S_v, S_r)$. Il résulte les réponses spectrales (S_r et S_v) modulées par le système d'acquisition d'images (figure 4.3.2.3).

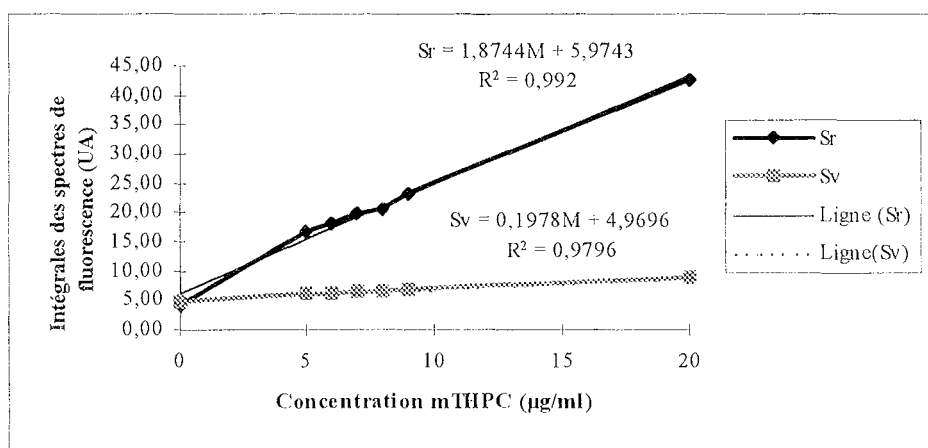


Figure 4.3.2.3 : Intégrales des spectres RV en fonction de la concentration de la mTHPC

(avec : $I = 100 \mu\text{g/ml}$; $RM = 20 \mu\text{g/ml}$; $\lambda = 410 \text{ nm}$ $P = 15 \text{ mW/cm}^2$)

La réponse rouge est linéairement croissante ($S_r = 1.87M + 6$ avec $R^2 = 0.992$) avec une pente 1.6 fois plus grande que celle obtenue en imagerie. La réponse verte S_v est pratiquement constante comme pour les résultats de l'imagerie ($S_v = 0.198M + 4.97$ avec $R^2 = 0.98$).

4.3.3. Etude en fonction de la fluorescence induite par la PpIX

Les réponses rouge et verte (I_v et I_r) de la caméra pour une série de fantômes dont la variable est la concentration de la protoporphyrine IX (PpIX) est donnée en figure 4.3.3.1. La superposition du spectre de fluorescence de l'un des fantômes de cette série avec les réponses RV du dispositif d'imagerie est donnée dans la 4.3.3.2. Les réponses spectrales S_r et S_v modulées par le système d'imagerie sont données dans la figure 4.3.3.3.

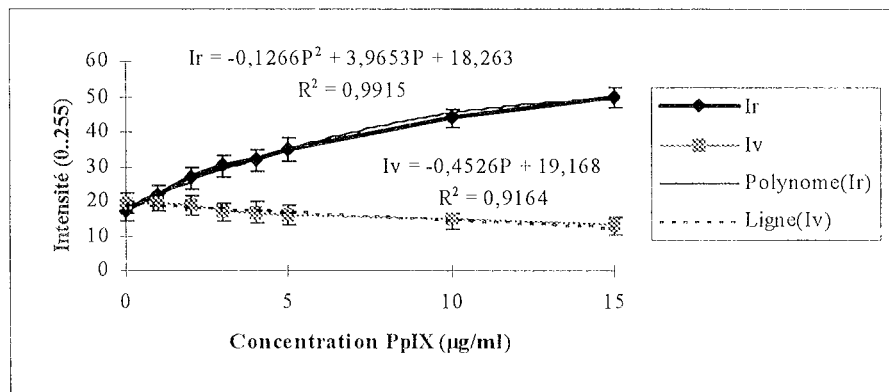


Figure 4.3.3.1: Réponse de la caméra en fonction de la variation de la concentration de PpIX

(avec : $RM = 20 \mu\text{g/ml}$; $I = 100 \mu\text{g/ml}$; $\lambda = 410 \text{ nm}$ $P = 15 \text{ mW/cm}^2$)

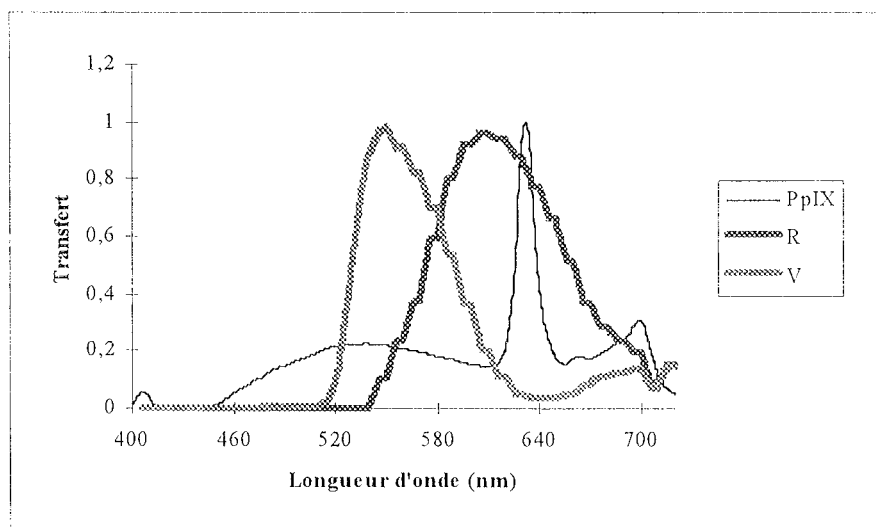


Figure 4.3.3.2: Superposition du spectre d'émission de fluorescence de la PpIX aux réponses RV du système d'acquisition d'images

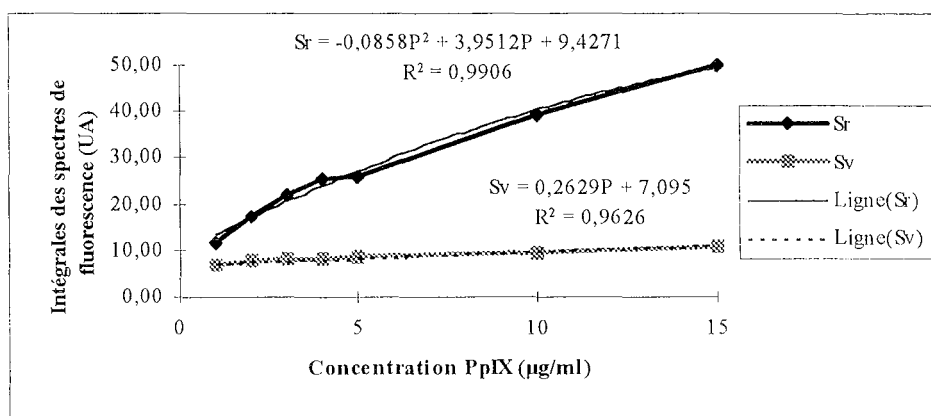


Figure 4.3.3.3 : Intégrales des spectres RV en fonction de la concentration de la PpIX

(I = 100 µg/ml; RM = 20 µg/ml; $\lambda = 410$ nm)

Nous remarquons que la réponse en imagerie $I_r(P)$ suit une loi polynomiale du deuxième degré avec une faible pente en P^2 ($I_r = -0.126P^2 + 3.96P + 18.26$ avec $R^2=0.991$) ce qui signifie que la réponse est presque linéaire. $S_r(P)$ obtenue à partir de l'analyse spectrale, suit la même loi ($S_r = -0.086P^2 + 3.95P + 9.42$ avec $R^2=0.991$) avec des pentes légèrement plus faibles. Les réponses vertes $I_v(P)$ et $S_v(P)$ sont pratiquement constantes ($I_v = 0.453P + 19.17$ avec $R^2=0.916$; $S_v = 0.263P + 7.09$ avec $R^2=0.963$) ce qui signifie que la variation de la concentration de la PpIX a un effet négligeable sur l'intensité de vert de l'image de fluorescence. Cependant cet effet est plus important que celui de la mTHPC dont le pic maximal d'émission est décalé vers les plus grandes longueur d'onde en comparaison avec la PpIX.

La PpIX est par conséquent un photosensibilisant qui répond au critère énoncé dans la partie III et qui nous permet de le mesurer au cours d'un diagnostic après suppression de l'auto fluorescence.

4.3.4. Etude en fonction de la fluorescence induite par l'HpD

La réponse rouge en imagerie est linéairement croissante ($I_r = 3.28H + 33.5$ avec $R^2=0.95$) et la réponse verte est linéairement décroissante ($I_v = -0.731H + 16.6$ avec $R^2=0.938$) avec une pente proche de -1 (figure 4.3.4.1).

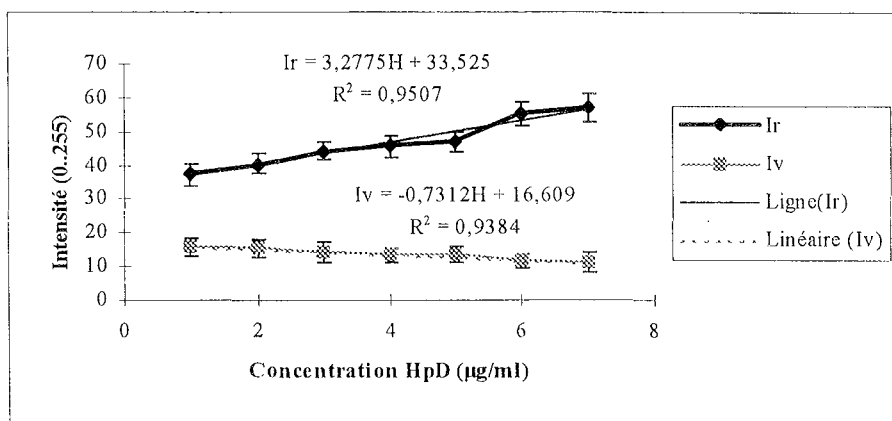


Figure 4.3.4.1 : Réponse de la caméra en fonction de la variation de la concentration de l'HpD

(RM = 20 µg/ml ; I = 100 µg/ml ; $\lambda = 410$ nm P= 15 mW/cm²)

La superposition du spectre d'émission de fluorescence de l'HpD avec les réponses RV du système d'imagerie est donnée dans la figure 4.3.4.2.

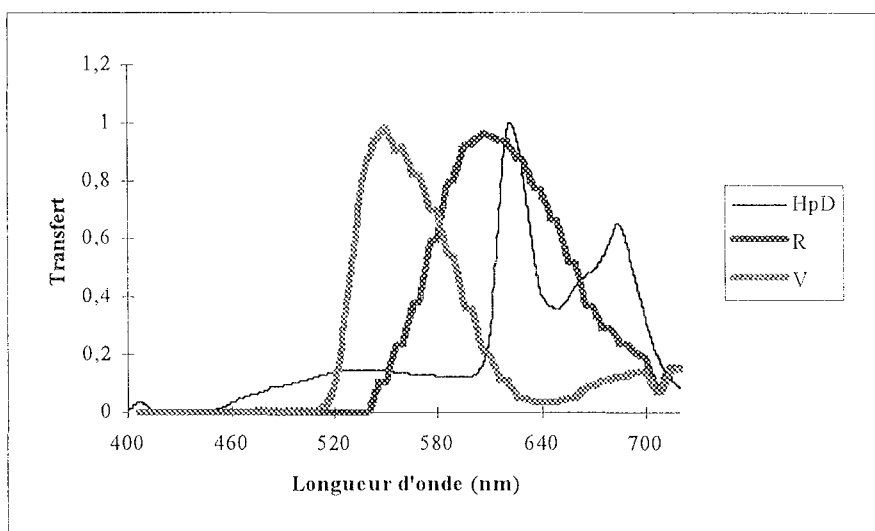


Figure 4.3.4.2 : Superposition du spectre d'émission de fluorescence de l'HpD aux réponses RV du système d'acquisition d'images

Le spectre de chaque fantôme de cette série est multiplié par les réponses RV. Les spectres RV résultants sont intégrés puis mis à l'échelle du dispositif d'imagerie (facteur multiplicateur égale à $\text{Max}(I_v, I_r) / \text{Max}(S_v, S_r)$).

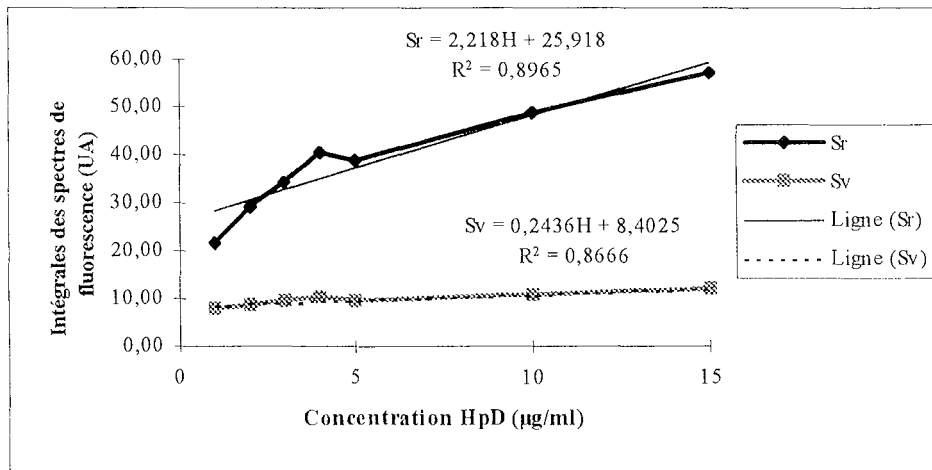


Figure 4.3.4.3 : Intégrales des spectres RV en fonction de la concentration de l'HpD

($I = 100 \mu\text{g/ml}$; $RM = 20 \mu\text{g/ml}$; $\lambda = 410 \text{ nm}$)

Les valeurs ainsi obtenues représentent la variation de la réponse spectrale modulée par le système d'imagerie en fonction de la concentration de l'HpD (figure 4.3.4.3). Ces réponses (Sv et Sr) sont données par les équations suivantes :

$$Sr = 2,22H + 25,9 \text{ avec } R^2=0,896$$

$$Sv = 0,243H + 8,4 \text{ avec } R^2=0,867$$

La pente de $Sr(H)$ est 1.5 fois plus faible que celle de $Ir(H)$. La réponse spectrale verte ($Sv(H)$) est croissante avec une pente voisine de zéro alors que la réponse en imagerie est décroissante avec une pente voisine de -1. Nous proposons l'explication suivante pour cette diminution d'intensité : la fluorescence dans le vert n'est pas due à l'HpD mais à une fluorescence ou à une lumière de fond toujours présente (L'intensité correspondant à une concentration nulle de fluorophore ou de photosensibilisant n'est pas nulle) ; l'HpD absorbe cette lumière ou en d'autres termes diminue la capacité de diffusion du fantôme. De ce fait, plus la concentration de l'HpD augmente plus la lumière de fond diminue. Il en va de même pour l'intensité correspondante. La différence par rapport à l'analyse spectrale s'explique par la distance du capteur du spectrofluorimètre au site. En effet la fibre réceptrice du spectrofluorimètre est placée au contact du fantôme ce qui rend la mesure indépendante de la diffusion à l'extérieur du fantôme. De ce fait la fluorescence de fond est pratiquement constante.

4.3.5. Récapitulatif

Le tableau 4.3.5.1 récapitule les résultats obtenus après l'analyse en imagerie directe (intensité) et l'analyse spectrale modulée par le système d'imagerie en faisant varier l'intensité du signal de fluorescence (autofluorescence ou fluorescence induite).

Toutes les réponses (spectrales ou en imagerie) sont linéaires ou polynomiales avec une faible pente pour le coefficient du deuxième degré. La fluorescéine émet principalement dans la composante verte de l'image mais également dans la composante rouge. L'HpD la PpIX et la mTHPC émettent principalement dans la composante rouge de l'image RVB.

Variable ($\mu\text{g/ml}$)	Réponse en imagerie	Réponses spectrale modulée par le dispositif d'imagerie
Fluorescéine	$I_V = -0.3F^2 + 12.8F + 32.7$ $I_R = -0.18F^2 + 7.72F + 13.8$	$S_V = -0.166F^2 + 10.75F + 10.5$ $S_R = -0.08F^2 + 5.22F + 8.58$
HpD	$I_R = 3.28H + 33.5$ $I_V = -0.731H + 16.6$	$S_R = 2.22H + 25.9$ $S_V = 0.243H + 8.4$
PpIX	$I_R = -0.126P^2 + 3.96P + 18.26$ $I_V = 0.453P + 19.17$	$S_R = -0.086P^2 + 3.95P + 9.42$ $S_V = 0.263P + 7.09$
mTHPC	$I_R = 1.18M + 18.96$ $I_V = -0.27M + 19.99$	$S_R = 1.87M + 6$ $S_V = 0.198M + 4.97$

Tableau 4.3.5.1 : Réponse en imagerie et réponse spectrale modulée par le système d'imagerie en fonction de la variation de la concentration de la fluorescéine, l'HpD, la PpIX et la mTHPC.

5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié la sensibilité du système d'imagerie et son pouvoir à détecter un signal de fluorescence donné, en passant par les réponses RVB du dispositif d'imagerie. Ce qui nous a conduit à fixer une limite inférieure pour l'irradiance (10 mW/cm^2) connaissant la sensibilité en lux de la caméra (13 lux).

Nous avons également fait une étude statistique du bruit généré par le module d'acquisition. Nous avons constaté qu'il ne dépend pas de la puissance du faisceau et qu'il est pratiquement constant avec une intensité voisine de 17. Ce qui représente le seuil minimal du signal dans les images de fluorescence. Ces données sont importantes compte tenu des conditions limites de mesure (faible puissance et faible sensibilité).

Nous avons ensuite choisi des composants pouvant simuler les tissus humains sains et pathologiques, à la base de trois caractéristiques optiques : la fluorescence, l'absorption et la diffusion.

Nous avons étudié les réponses RV du module d'acquisition en fonction de la variation de chaque paramètre optique. Cette étude a également été réalisée à partir des réponses spectrales modulées par le système d'imagerie.

Le système est pratiquement invariable en fonction de la variation de la diffusion (par les intralipides) mais l'absence totale de la diffusion a pour effet la diminution de l'intensité du signal de fluorescence mesuré.

Les réponses RV en fonction de la variation de l'absorption (rouge de Méthyl) sont décroissantes répondant à une équation logarithmique de la forme $\frac{K_{F_diff}}{\log_{10}(1 + RM) + 1}$, la constante K_{F_diff} dépend de la concentration du composé fluorescent et de la présence ou de l'absence de composé diffusant..

Les réponses R ou V en fonction de la variation des concentrations de certains photosensibilisants (Fluorescéine, mTHPC, HpD et PpIX) répondent à l'équation générale du deuxième degré : $I = aF^2 + bF + K_{abs_diff}$, le coefficient a est faible (réponse linéaire) et K_{abs_diff} est une constante qui dépend de l'absorption et de la diffusion du milieu. Compte tenu de la réponse en fonction de l'absorption, K_{abs_diff} pourrait répondre à l'équation :

$$\frac{K_{diff}}{\log_{10}(1 + RM) + 1}, \text{ où } K_{diff} \text{ dépend de la présence ou de l'absence d'une source diffusante. ;}$$

En conclusion, les réponses du système aux trois phénomènes optiques sont dépendantes les unes des autres. Celles que nous avons données (4.3.1. 4.3.2 et 4.3.5.) sont déterminées en fixant à chaque fois les deux autres paramètres. Nous pourrions exprimer les constantes de chaque réponse en fonction de la variation des autres paramètres, en faisant un plus grand nombre de mesures, mais les résultats obtenus ne seront pas valables *in-vivo* car il faudrait par exemple connaître au moins l'absorption et la diffusion des tissus pour mesurer la fluorescence (encore faudrait-il qu'il n'y ait qu'une seule source fluorescente vis à vis de la caméra).

Cependant, ces réponses seront utilisées pour connaître la précision des algorithmes globaux de traitement d'images. En effet, les algorithmes nous fournissent dans le cas d'un choix quantitatif, une intensité moyenne pour chaque classe (tissu sain ou tumeur) qu'il faut

corrélés à une grandeur physique. Connaissant la réponse du dispositif d'imagerie en fonction de la variation de la concentration des photosensibilisants, nous pouvons retrouver la concentration initiale pour une intensité donnée si on fixe les deux autres paramètres optiques.

Les réponses de l'analyse spectrale modulée par le système d'imagerie varient dans le même sens que celles obtenues à partir de l'analyse en imagerie, avec des coefficients légèrement différents compte tenu de la différence des conditions de mesures et de la sensibilité des deux méthodes.

CHAPITRE 2 : RESULTATS DU TRAITEMENT D'IMAGES

1. Introduction

Dans ce chapitre nous allons présenter les résultats du traitement d'images sur des fantômes et sur des modèles biologiques. Nous montrerons les résultats des algorithmes de restauration, de rehaussement de contraste ou de contours et des algorithmes de segmentation implémentés. Ce qui nous permettra de confirmer le choix des trois algorithmes qui feront partie des algorithmes globaux. Dans cette première étape nous manipulons uniquement des images de fluorescence. Compte tenu de la faible dynamique de ces images, nous effectuons une expansion dynamique ou fenêtrage (voir partie III, 2.2.4) et c'est l'image qui en résulte qui sera considérée comme image originale pour les algorithmes de restauration, de rehaussement de contraste ou de contour et de segmentation. Ce changement d'échelle n'améliore pas la qualité de l'image mais nous permet simplement de la voir (figure 1.1).

Dans la deuxième étape qui consiste à appliquer l'un des algorithmes globaux (Globa ou Globi), nous utilisons comme image source l'image couleur RVB dont la moitié gauche est l'image en lumière blanche et la moitié droite est l'image de fluorescence. L'expansion dynamique ne fera pas partie de ces deux algorithmes mais pourrait être utilisée pour permettre une impression (ou une visualisation) correcte des images si celles-ci sont jugées trop sombres (figure 1.2).

Pour des raisons d'espace de stockage, nous n'utilisons pas l'image entière (640x572) mais seulement une région d'intérêt de l'image de fluorescence (pour le test des algorithmes de restauration de rehaussement de contraste et de segmentation) ou des régions d'intérêts symétriques de l'image en lumière blanche et de fluorescence (dans le cas du test des algorithmes globaux). Cette simplification a une conséquence sur la durée d'exécution des algorithmes (cas des algorithmes basés sur une approche locale). De ce fait, la comparaison en durée d'exécution se fait pour des images de même dimension.

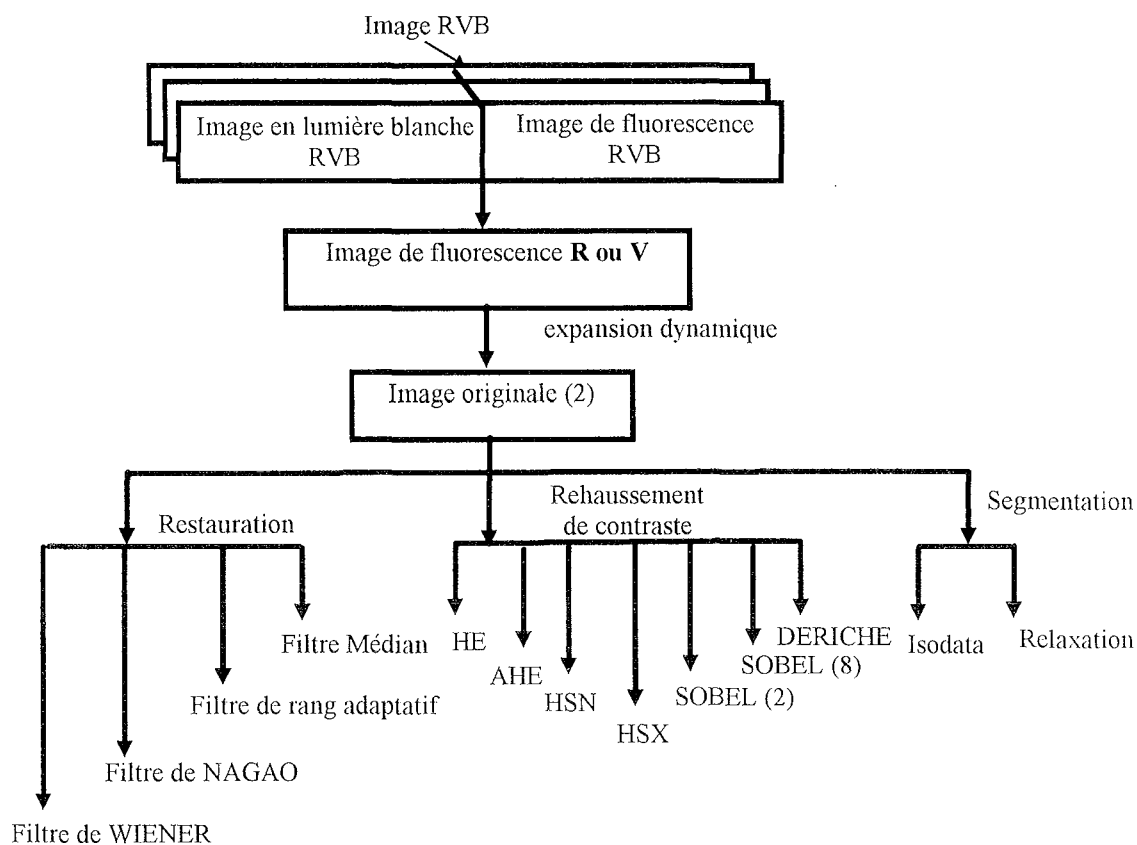


Figure 1.1 : Représentation schématique des images sources des algorithmes de restauration de rehaussement de contraste ou de contours et de segmentation (HE : Histogram Equalisation, AHE Adaptative Histogram Equalisation, HSN : Histogram Shifting /Minimum ; HSX : Histogram Shifting /Maximum)

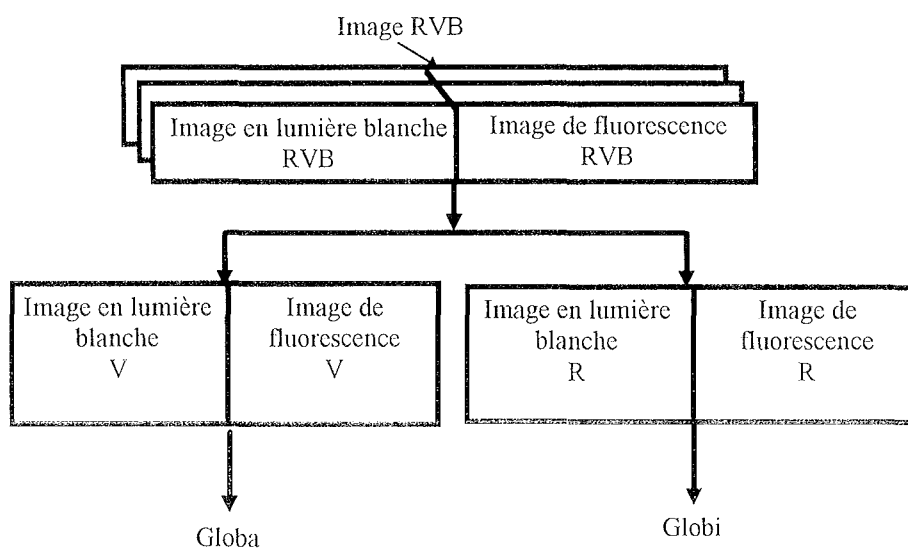


Figure 1.2 : Représentation schématique des images sources des algorithmes Globaux de traitement d'images : Globa (autofluorescence) et Globi (fluorescence induite)

2. Résultats sur les fantômes

2.1. Introduction

Nous avons reproduit une image d'autofluorescence simulant une tumeur entourée d'un tissu sain en utilisant deux fantômes F1 (composée de 1 $\mu\text{g/ml}$ de fluorescéine) et F5 (composée de 5 $\mu\text{g/ml}$ de fluorescéine) ayant les mêmes concentrations en rouge de méthyl (absorption) et en intralipides (diffusion). F1 et F5 simulent respectivement la tumeur et le tissu sain. Le site global est nommé F1F5.

Pour simuler une image de diagnostic par fluorescence induite, nous avons construit une image à base de mTHPC et de la même manière que F1F5. Il s'agit de M10M3 qui comporte un fantôme central M10 simulant la tumeur (composé de 10 $\mu\text{g/ml}$ de mTHPC) et un fantôme périphérique M3 simulant le tissu sain (composé de 3 $\mu\text{g/ml}$ de mTHPC).

La composante verte de l'image de fluorescence de F1F5 et la composante rouge de l'image de fluorescence de M10M3 sont utilisées pour le test de l'efficacité des algorithmes de restauration de rehaussement de contraste ou de contours et de segmentation, après avoir effectué une expansion dynamique.

En ce qui concerne le test des algorithmes globaux :

- Globa sera testé avec les composantes vertes des images en lumière blanche et de fluorescence de F1F5 et également des images virtuelles et semi-virtuelles à base de fantômes différenciés par leur concentration en fluorescéine;
 - Globi sera testé avec les composantes rouges des images en lumière blanche et de fluorescence de M10M3 et également des images semi-virtuelles à base de fantômes composés de différentes concentrations de photosensibilisants (mTHPC ou HpD ou PpIX);
- Les images semi-virtuelles sont basées sur des mesures avec le cystoscope, tandis que les images de F1F5 et M10M3 sont prises avec l'objectif standard.

2.2. Résultats des algorithmes de restauration de rehaussement de contraste et de segmentation

2.2.1. Résultats obtenus avec les algorithmes de restauration

Nous avons appliqué les quatre algorithmes de restauration (le filtre Médian, le filtre de NAGAO, le filtre de rang adaptatif de taille 5 et le filtre de WIENER) sur la composante verte de l'image de fluorescence de F1F5 après expansion dynamique. Les résultats obtenus sont donnés dans la figure 2.2.1.1. Ces algorithmes ont également été appliqués sur la

composante rouge de l'image de fluorescence de M10M3 après expansion dynamique (figure 2.2.1.2).

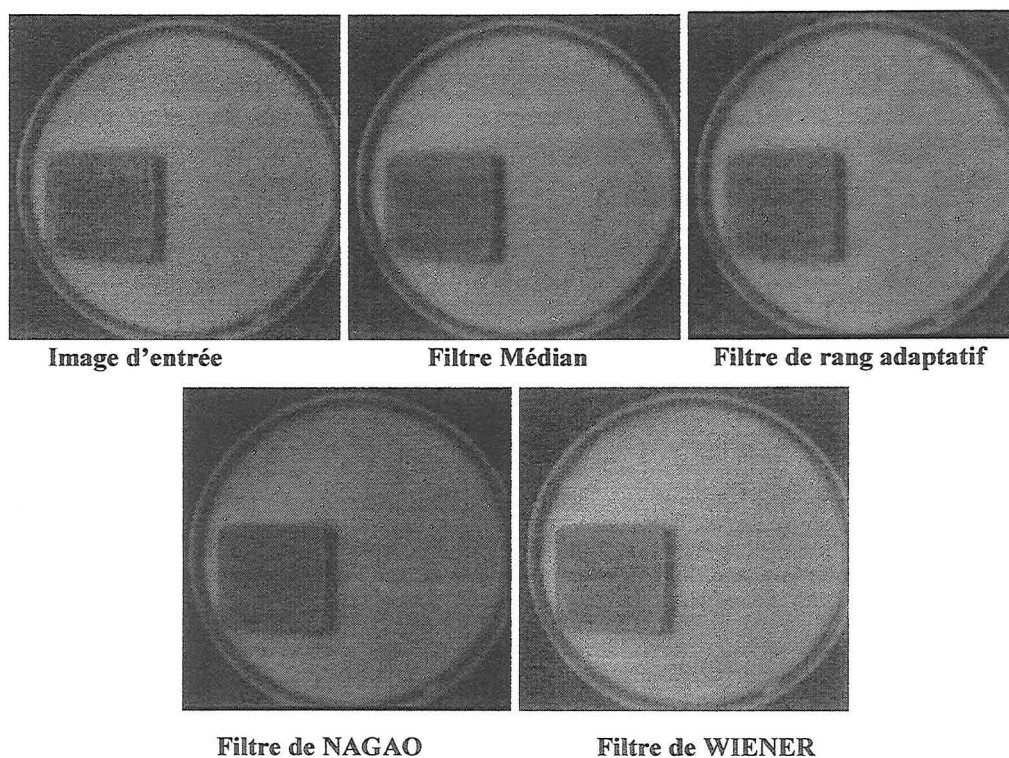


Figure 2.2.1.1: Images du fantôme F1F5 avant et après application du filtre Médian du filtre de rang adaptatif de taille 5, du filtre de NAGAO et du filtre de WIENER

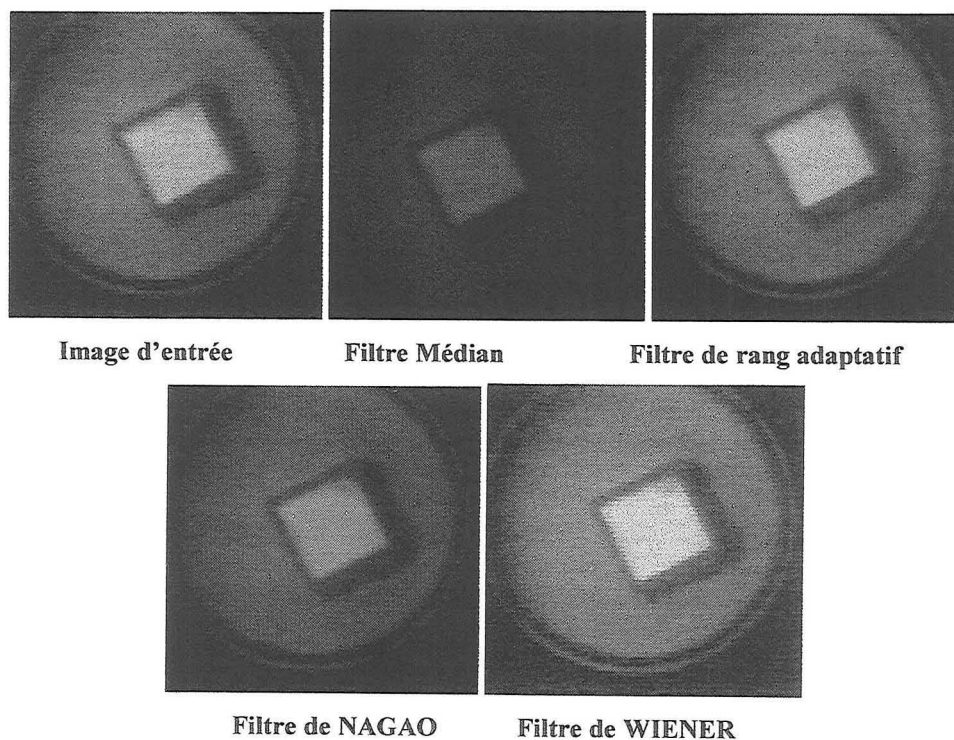


Figure 2.2.1.2: Images du fantôme M10M3 avant et après application du filtre Médian du filtre de rang adaptatif de taille 5, du filtre de NAGAO et du filtre de WIENER

D'après ces deux dernières figures nous pouvons dire que le filtre de WIENER semble rehausser le bruit dans l'image. D'après la figure 2.2.1.1, Le filtre de rang adaptatif et le filtre Médian donnent des résultats équivalents ; le filtre de NAGAO leur est comparable du point de vue qualité de lissage avec préservation des contours mais provoque une perte dans la dynamique de l'image. D'après la figure 2.2.1.2, le filtre de rang adaptatif provoque l'apparition d'une impulsion négative (point noir). Sa qualité de filtrage est comparable à celle du filtre de NAGAO. Le filtre Médian provoque une perte dans la dynamique de l'image mais ses performances de filtrage sont comparables à celles du filtre de NAGAO. Donc il n'y a pas beaucoup de différences entre le filtre de rang adaptatif, le filtre Médian et le filtre de NAGAO.

Cependant les deux filtres de rang (Médian et filtre de rang adaptatif) ne sont pas basés sur le calcul d'une moyenne locale ce qui nous paraît intéressant pour restituer correctement l'information de départ dans les zones frontalières. Comme le filtre de rang adaptatif peut créer des impulsions parasites, c'est le filtre Médian qui paraît le plus intéressant.

Les comparaisons sont également effectuées en termes de rapport signal sur bruit (partie III, 2.1.5) et sont donnés dans le tableau 2.2.1.1 pour F1F5 et M10M3.

Nous constatons que le filtre de NAGAO produit le meilleur rapport S/B. Le filtre de rang adaptatif est en deuxième position suivi avec un faible écart du filtre Médian. Le filtre de WIENER a un faible rapport identique à celui de l'image originale.

S/B	Entrée	Médian	WIENER	NAGAO	Rang
F1F5	2,01	3,47	2,01	4,31	3,56
M10M3	5,02	9,77	5,02	12,71	10,89

Tableau 2.2.1.1 : Rapport signal sur bruit avant et après l'application du filtre Médian, du filtre de NAGAO, du filtre de rang adaptatif et du filtre de WIENER pour les fantômes F1F5 et M10M3

C'est le filtre Médian qui a la plus faible durée d'exécution (tableau 2.2.1.2)

Images	NAGAO	Rang adaptatif (5)	WIENER	Médian
F1F5 (256x256)	69,2 ms	8,7 ms	18,01 ms	0,27 ms
M10M3 (256x256)	70,3 ms	30,1 ms	18,1 ms	0,27 ms

Tableau 2.2.1.2 : Durée d'exécution sur le micro-processeur Pentium 75 MHz du filtre Médian, du filtre de NAGAO, du filtre de rang adaptatif et du filtre de WIENER de l'image F1F5 et M10M3

En conclusion le filtre de NAGAO et le filtre Médian apportent une qualité visuelle comparable. Le rapport signal sur bruit avec le filtre Médian est moindre que celui du filtre

de NAGAO, mais sa durée d'exécution est plus courte. Par conséquent le filtre Médian est le plus intéressant.

2.2.2. Résultats obtenus avec les algorithmes de rehaussement de contour ou de contraste

Nous avons déjà présenté les résultats (partie III, 2.2.4) de l'amélioration de contraste obtenu avec les algorithmes suivants : HE (Histogram Equalisation), AHE (Adaptative Histogram Equalisation), HSN (Histogram Shifting avec un décalage vers les niveau sombres), HSX (Histogram Shifting avec un décalage vers les niveaux clairs), S2 (SOBEL à deux directions), S8 (SOBEL à 8 directions) et D (DERICHE). Le classement par ordre décroissant (du plus fort au plus faible contraste) en fonction du contraste obtenu est le suivant : S8, HSX, HSN, HE, S2, D, AHE. En ce qui concerne les durées d'exécution le classement par ordre croissant est comme suit : AHE, HE, HSN, HSX, D, S2 et S8.

Les résultats de l'application de ces algorithmes sur l'image F1F5 et M10M3 sont respectivement donnés dans la figure 2.2.2.1 et 2.2.2.2.

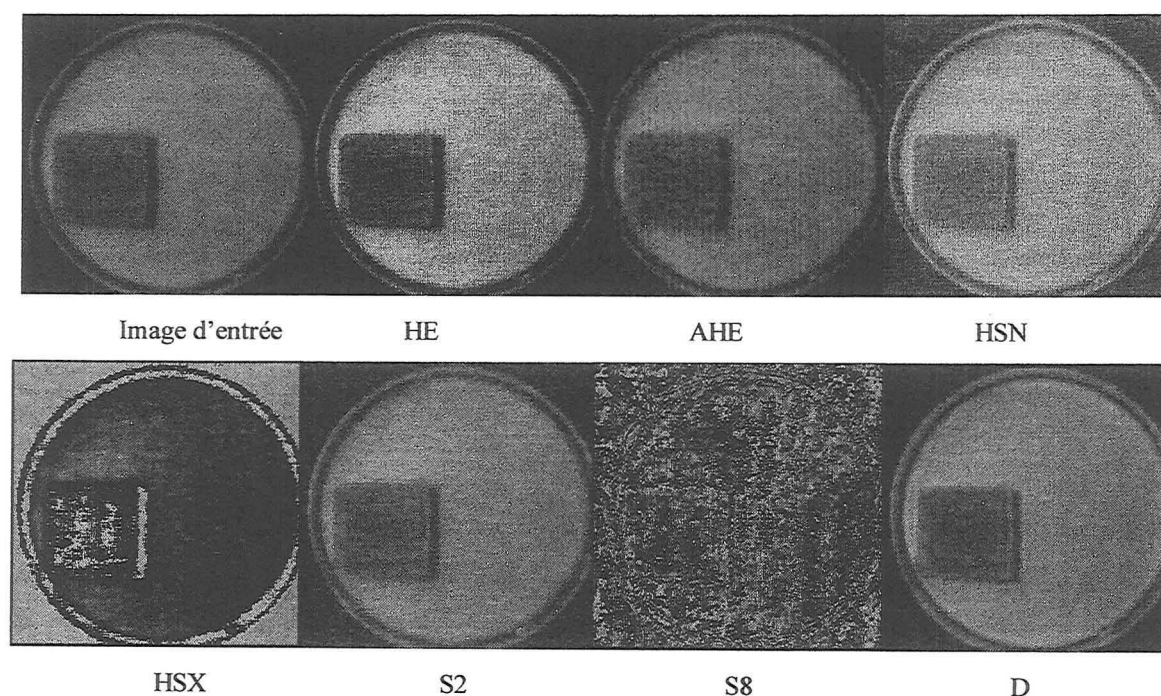


Figure 2.2.2.1 : Résultats du rehaussement de contraste sur le fantôme F1F5 avant et après application des algorithmes de rehaussement de contraste (HE (Histogram Equalisation), AHE (Adaptative Histogram Equalisation), HSN (Histogram Shifting/Minimum, HSX(Histogram Shifting/Maximum), S2 (SOBEL à 2 directions), S8 (SOBEL à 8 directions) et D (Deriche)

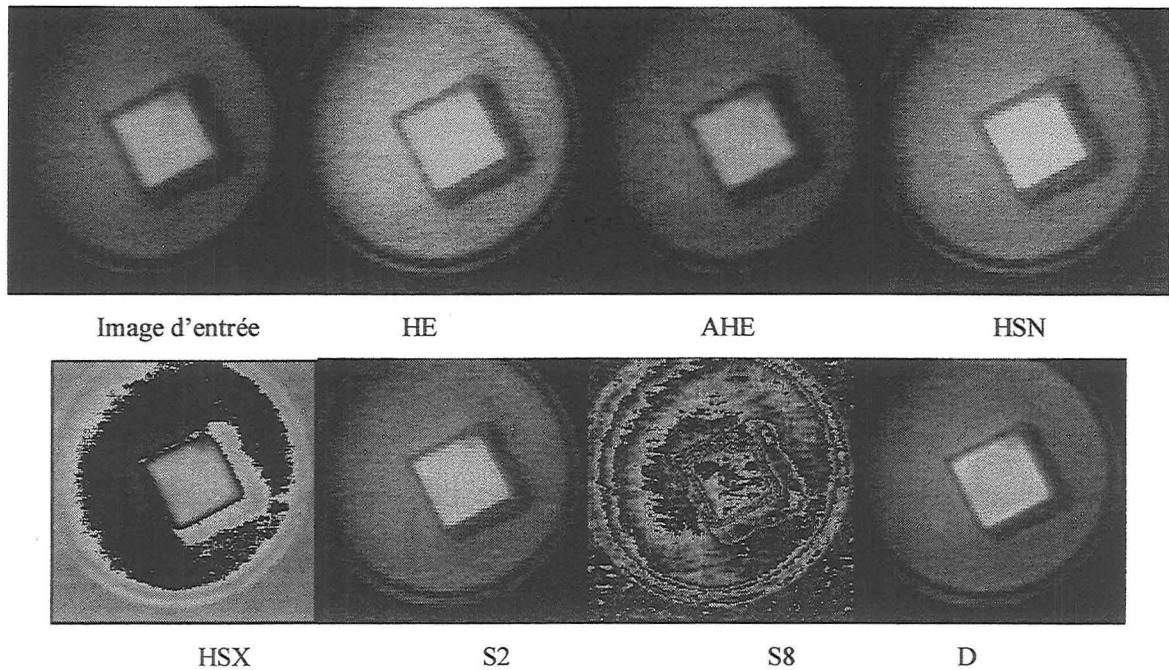


Figure 2.2.2.2. : Résultats du rehaussement de contraste sur le fantôme M10M3 avant et après application de HE (Histogram Equalisation), AHE (Adaptative Histogram Equalisation), HSN (Histogram Shifting/Minimum, HSX(Histogram Shifting/Maximum), S2 (SOBEL à 2 directions), S8 (SOBEL à 8 directions) et D (DERICHE)

Nous pouvons déjà éliminer S8 qui est sensible aux faibles gradients (dans toutes les directions qui, de ce fait, crée de faux contours.

HE a un effet global d'égalisation ce qui n'est pas forcément orienté vers les régions où le contraste devrait s'opérer. Nous constatons que ce contraste est important entre le fond et le fantôme périphérique et pas entre les deux fantômes. De bons résultats sont obtenus avec HSN et D.

AHE donne un contraste comparable à celui obtenu avec D et HSN. Cependant, nous trouvons dans l'image résultante, un maillage correspondant à l'opération d'interpolation bilinéaire.

Le contraste introduit par HE, AHE, HSN, HSX, S2, S8 et D est représenté à la figure 2.2.2.3 en comparaison avec celui de l'image de départ (après fenêtrage). Il est calculé pour chaque image résultante sur une ligne profil dont la position et la dimension sont constantes pour un fantôme donné. Le contraste est défini comme la différence entre l'intensité minimale et maximale dans la ligne profil.

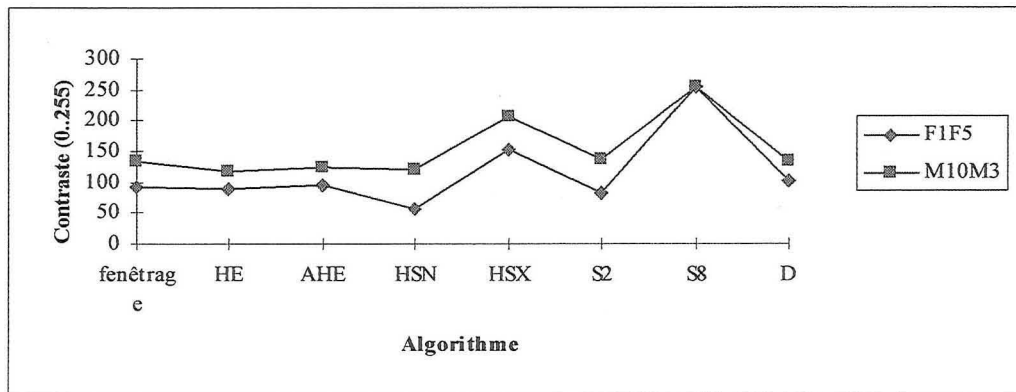
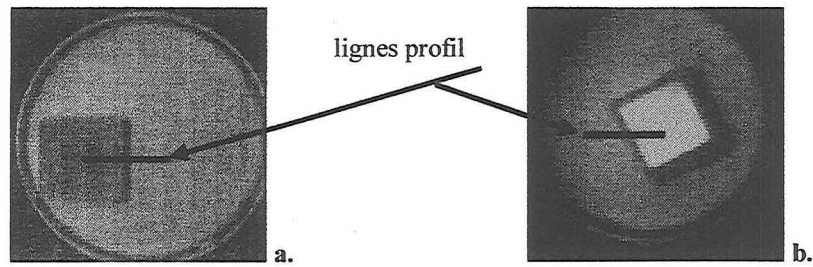


Figure 2.2.2.3. : Contraste introduit par les algorithmes de rehaussement de contraste et de contour pour les fantômes F1F5 et M10M3 (256x256 pixels)

(a. position de la ligne profil sur F1F5 et b. position de la ligne profil sur M10M3)

S8 donne le meilleur contraste suivi de HSX, les autres algorithmes ont des résultats comparables. Puisque S8 est un mauvais algorithme du point de vue qualité visuelle, c'est HSX qui est considéré comme étant le meilleur algorithme.

Nous avons comparé les autres algorithmes intéressants (AHE, HSN, D, S2) avec HSX en considérant les histogrammes effectués sur des régions d'intérêt des images résultant de l'application de ces algorithmes sur l'image F1F5 (figure 2.2.2.4).

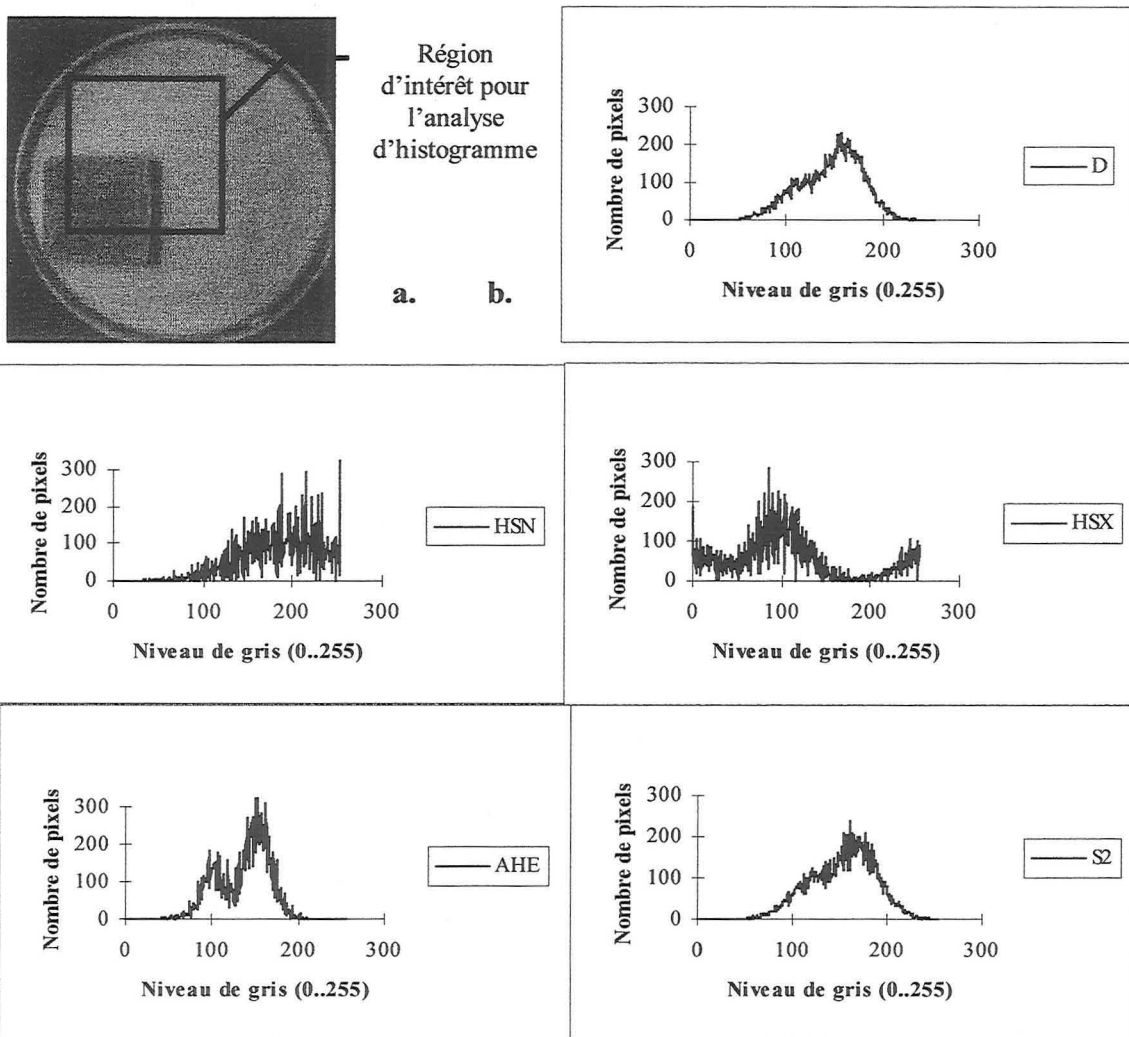


Figure 2.2.2.4 : Histogrammes des images obtenues après D, HSN, HSX, AHE et S2 sur F1F5

(a. position de la région d'intérêt sur une image résultat, b. figures des histogrammes)

Dans cette figure nous avons également indiqué la position de la zone d'intérêt dans l'image (figure 2.2.2.4 a.). Cette zone comprend deux régions : le fantôme simulant la tumeur (FT) et celui simulant le tissu sain (FS). Pour étudier les effets produit par ces algorithmes nous considérons :

- le bruit qui se traduit par le lissage de l'histogramme (plus l'histogramme est lisse moins il y a de bruit),
- l'homogénéité dans chaque région (FT ou FS) qui se traduit par des pics plus ou moins importants dans l'histogramme,
- la séparation entre les deux régions qui se traduit par l'écart entre les pics de l'histogramme.

D présente l'histogramme le moins bruité, il est suivi de S2 et de AHE, puis de façon équivalente de HSN, HSX.

L'homogénéité est maximale avec AHE, suivi de D, S2, HSX, et HSN. La différence entre D, S2 et HSX est négligeable.

Donc HSX produit une meilleure séparation entre FT et FS mais avec une moindre homogénéité que celle produite par AHE et un lissage moins important que celui obtenu avec D.

HSX semble bien indiqué tant du point de vue qualité visuelle, que de la valeur du contraste mesuré sur une ligne profil séparant FT et FS ou de l'analyse de l'histogramme (si on accorde plus d'importance à la séparation entre classes qu'au lissage ou à l'homogénéité). Le rehaussement de contraste ne se fait pas uniquement entre FT et FS mais également vis à vis de la cuve qui contient le fantôme central. Cet effet secondaire ne devrait pas exister sur des images *in-vivo* qui ne contiennent pas de corps étrangers. En plus le rehaussement serait probablement meilleur à la suite d'un prétraitement (lissage...).

Les durées d'exécution de ces algorithmes pour les deux fantômes sont représentées par la figure 2.2.2.5. Nous constatons que les valeurs de ces durées d'exécution pour AHE, HSN, HSX et S2 sont minimales et proches les unes des autres.

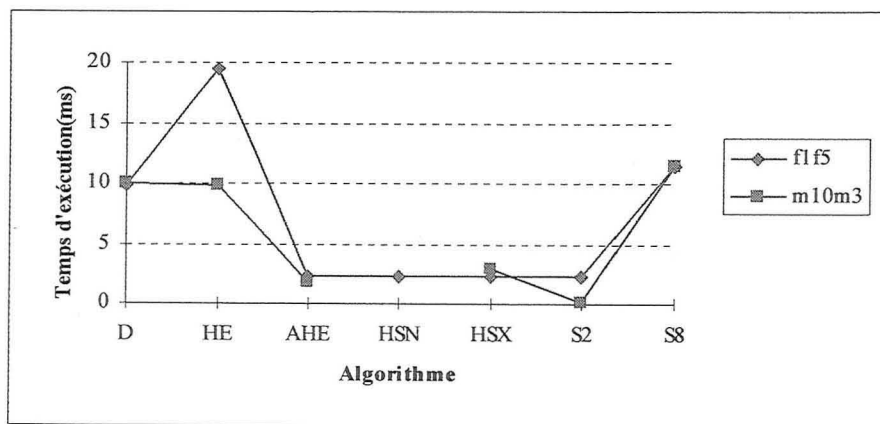


Figure 2.2.2.5 : Durée d'exécution des algorithmes de rehaussement de contraste et de contour pour les fantômes F1F5 et M10M3 (256x256 pixels)

2.2.3. Résultats obtenus avec les deux algorithmes de seuillage : ISODATA et la relaxation

ISODATA est un algorithme de seuillage global, il est en moyenne 37.2 fois plus rapide que la méthode de relaxation qui permet une segmentation dynamique par point. Nous l'avons retenu comme méthode de segmentation mais nous avons également étudié l'algorithme de relaxation.

ISODATA admet pour données le nombre de classes, alors que le deuxième algorithme demande en plus, les estimations des intensités moyennes de chaque classe. Nous avons choisi d'appliquer les mêmes moyennes initiales que ISODATA (partie III, 2.3.5.).

Pour comparer ces deux algorithmes nous avons construit des images virtuelles composées de trois classes homogènes ayant des intensités distinctes. La tumeur est simulée par un disque plein entouré d'un anneau simulant le tissu sain. Le reste de l'image constitue le bruit de fond dont l'intensité a été fixée à 17 (Partie IV, chapitre 1). L'intérêt de ce modèle est la connaissance précise des informations quantitatives de l'image avant la segmentation, ce qui rend possible leurs comparaisons avec les résultats fournis en sortie des deux algorithmes.

Nous pouvons varier le diamètre de la tumeur ainsi que la différence d'intensité entre tumeur et tissu sain pour connaître la résolution spatiale et lumineuse de ces deux algorithmes. Un exemple de ce modèle d'application est donné dans la figure 2.2.3.1 avec les résultats obtenus avec ISODATA et l'algorithme de relaxation.

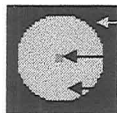

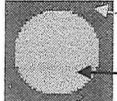
	Images	Intensité	Surface (%)		
Image d'entrée		Fond Tumeur Tissu sain	0 191 255	50,43 0,56 49	
	ISODATA		Fond Tumeur Tissu sain	0 191 254	50,43 0,56 49
		Relaxation		Fond Tissu sain	128 255

Figure 2.2.3.1 : Application de ISODATA et de l'algorithme de relaxation sur une image virtuelle
(l'image entière correspond à S=100%)

Dans cet exemple, la tumeur est simulée par un disque de rayon 1(pixel) ayant une intensité (191) plus faible que celle du tissu sain (255). ISODATA retrouve les trois régions avec

presque les mêmes paramètres quantitatifs que l'image de départ (surface et intensité) ; l'intensité de la zone correspondant au tissu sain est retrouvé égal à 254 au lieu de 255. Rappelons que les intensités attribuées par l'algorithme de seuillage par relaxation à chaque classe, n'ont aucun lien avec les moyennes locales (elles sont toujours prises dans le triplet (0,128,255) pour avoir un bon contraste). Dans cet exemple, l'algorithme de relaxation ne trouve pas la zone simulant la tumeur.

Un deuxième modèle semi-virtuel a également été conçu pour s'approcher des conditions réelles et pour comparer les informations quantitatives avant et après application des algorithmes de seuillage. Les données de la zone centrale simulant la tumeur sont extraites d'une région d'intérêt de l'image de fluorescence d'un fantôme. De même la zone simulant le tissu sain est extraite d'une image de fluorescence d'un autre fantôme obtenu dans les mêmes conditions que le premier (puissance d'excitation, longueur d'onde) mais avec une concentration différente de fluorophore. Le bruit de fond est également extrait d'une région de bruit de l'une des images de fluorescence. Nous connaissons la moyenne arithmétique et la taille de chaque région. Ces données seront comparées à celles fournies par les deux algorithmes. Les résultats obtenus avec ce modèle sont donnés dans les figures 2.2.3.2 (fantômes à base de fluorescéine) et 2.2.3.3 (fantôme à base de PpIX).

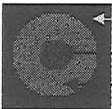

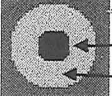
	Images	Intensité	Surface (%)		
Image d'entrée		Fond Tumeur Tissu sain	16.2±3.1 95.1±2.3 152.4±2.1	50,43 6.81 42.75	
	ISODATA		Fond Tumeur Tissu sain	16 95 153	50,43 6.81 42.75
		Relaxation		Fond Tumeur Tissu sain	128 0 255

Figure 2.2.3.2 : Application de ISODATA et de l'algorithme de relaxation sur une image semi-virtuelle de fantômes à base de fluorescéine

	Images	Intensité	Surface (%)
Image d'entrée	Fond	16.2±3.1	50,43
	Tumeur	43.8±2.6	6.81
	Tissu sain	21.8±2.8	42.75
ISODATA	Fond	11	25.56
	Tumeur	42	7.8
	Tissu sain	20	66.62
Relaxation	Fond	128	16
	Tumeur-	0	84
	Tissu sain		

Figure 2.2.3.3 : Application de ISODATA et de l'algorithme de relaxation sur une image semi-virtuelle de fantômes à base de PpIX

Dans le premier exemple, les deux algorithmes retrouvent correctement les trois classes. Dans le deuxième exemple où l'image d'entrée est de mauvaise qualité (Les intensités de la région fond se croisent avec ceux de la région tissu sain / figure 2.2.3.3 image d'entrée), ISODATA parvient à détecter la zone centrale et la zone périphérique avec de faibles écarts par rapport à l'image d'entrée. Ce n'est pas le cas de l'algorithme de relaxation qui ne retrouve pas la zone centrale.

Nous considérons à nouveau les fantômes F1F5 et M10M3 dont les résultats de la segmentation sont respectivement présentés sur les figures 2.2.3.4 et 2.2.3.5.

La classification de F1 et F5 est médiocre avec ISODATA et avec l'algorithme de relaxation (figure 2.2.3.4). Ce résultat est prévisible pour ISODATA car l'histogramme de l'image d'entrée comporte deux classes, alors que nous avons cherché trois classes. Le deuxième algorithme n'apporte rien de plus par rapport à ISODATA. Cependant, là où ISODATA donne de bons résultats (figure 2.2.3.5), l'algorithme de relaxation échoue. En effet il détecte deux classes seulement : M10 avec une partie de M3 et le fond avec une grande partie de M3. Le succès de ISODATA avec cet exemple s'explique par la trimodalité de l'histogramme de l'image d'entrée.

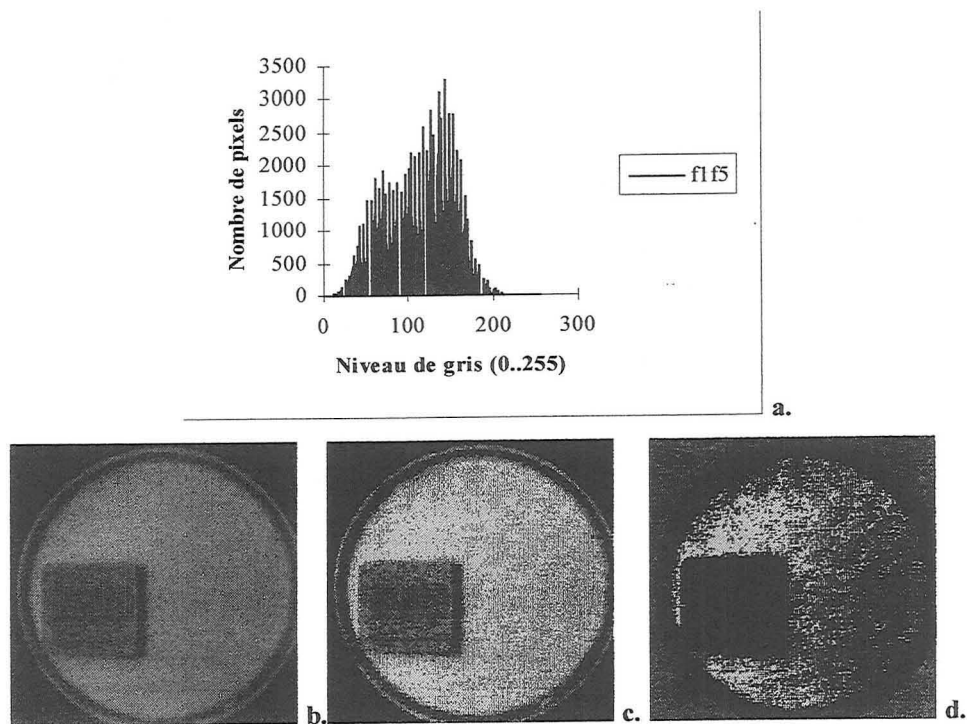


Figure 2.2.3.4 : Résultats de l'application de ISODATA (c.) et de l'algorithme de relaxation (d.) sur l'image de fluorescence de F1F5 (b.) dont l'histogramme de départ est donnée en (a.)

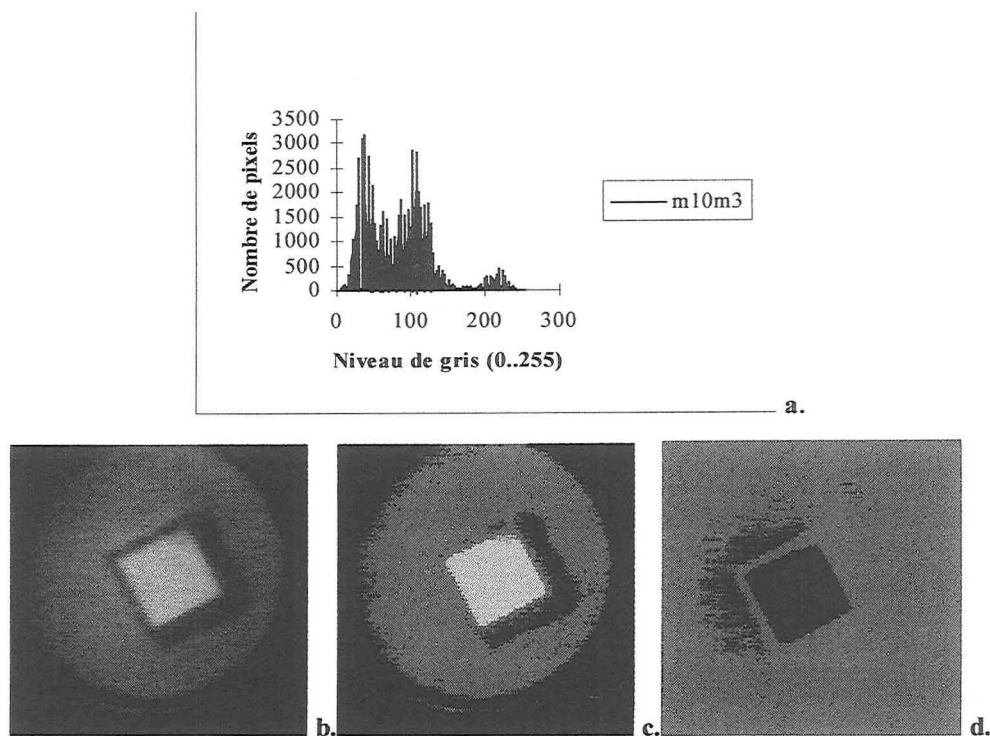


Figure 2.2.3.5: Résultats de l'application de ISODATA (c.) et de l'algorithme de relaxation (d.) sur l'image de fluorescence de M10M3 (b.) dont l'histogramme de départ est donnée en (a.)

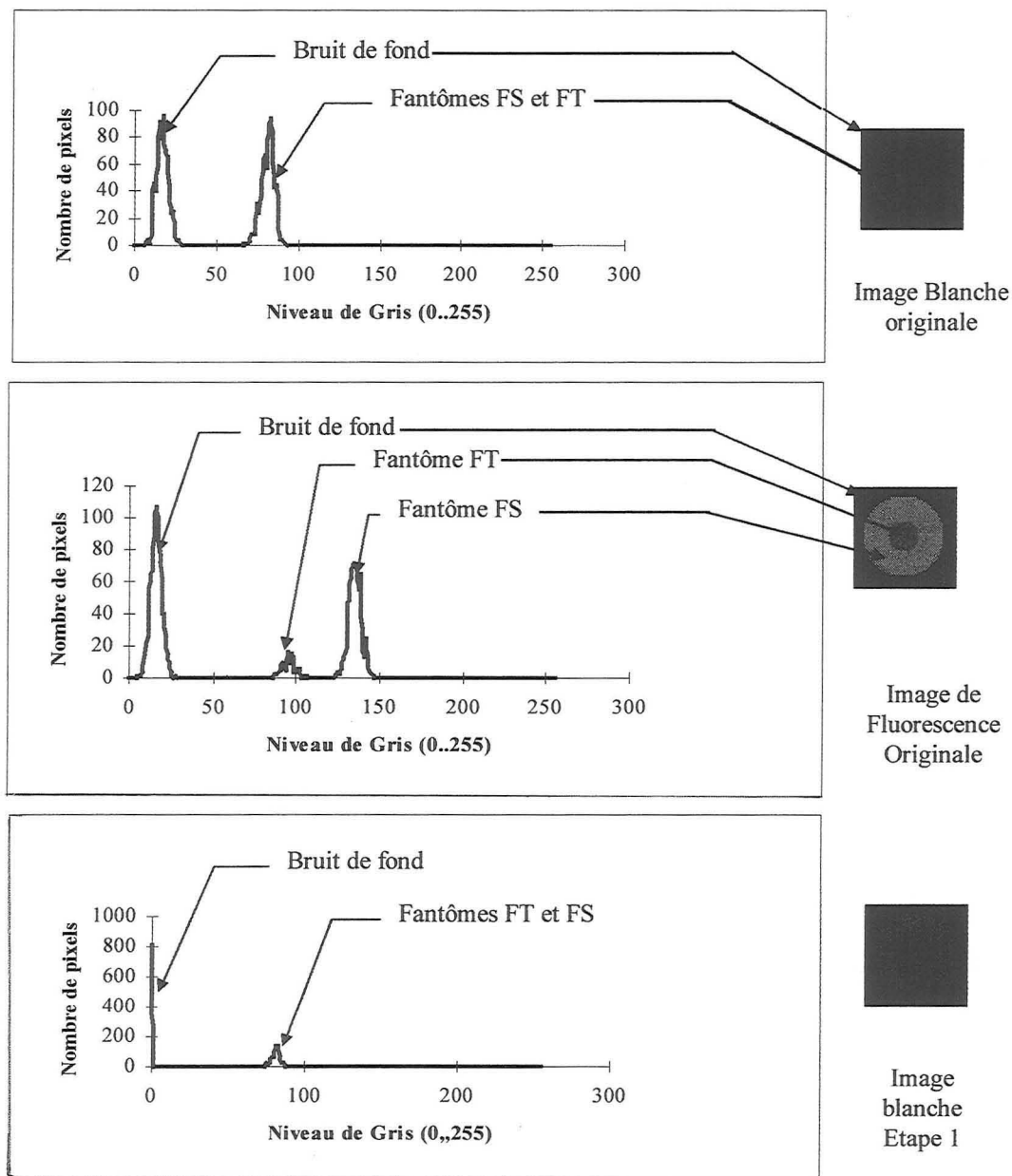
En conclusion ISODATA est meilleur que l'algorithme de relaxation avec ce modèle.

2.3. Résultats obtenus avec les algorithmes globaux de traitement d'images

Autofluorescence

Exemple 1

Les résultats de l'application de Globa sur une image semi-virtuelle RVB ainsi que les étapes intermédiaires sont donnés dans la figure 2.3.1.



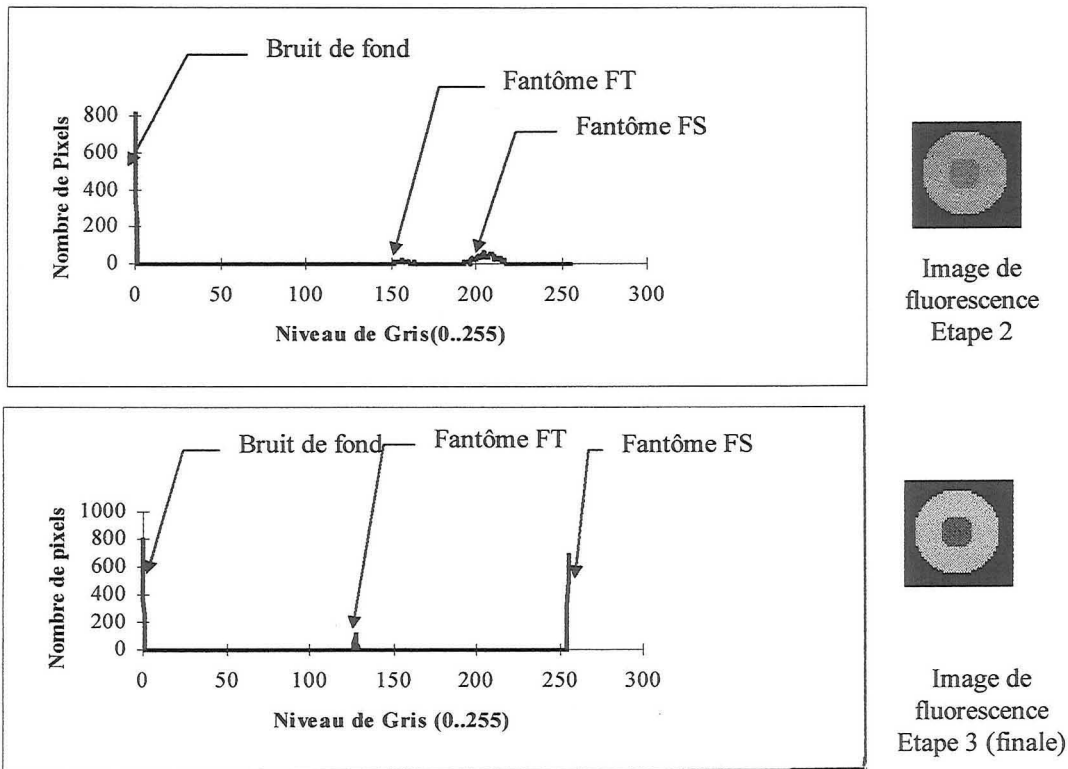


Figure 2.3.1. : Application de Globa sur un fantôme semi-virtuel à base de fluorescéine
(FT : fantôme central simulant la tumeur; FS : fantôme périphérique simulant le tissu sain)

Dans cette figure nous présentons :

- l'image en lumière blanche caractérisée par deux classes (non homogènes) le bruit de fond d'une part et les deux fantômes simulant respectivement la tumeur et le tissu sain d'autre part (*FT* et *FS*),
- l'image de fluorescence caractérisée par trois classes : le bruit de fond, le fantôme *FT* et le fantôme *FS*,
- le résultat de la première étape de Globa qui consiste à binariser l'image en lumière blanche puis restitue l'information qui n'a pas été classée avec le bruit,
- le résultat de la deuxième étape qui consiste à corriger l'image de fluorescence par rapport à l'irrégularité de la puissance d'excitation en la divisant par l'image de fluorescence,
- le résultat final (étape 3) où l'image de fluorescence est segmentée en trois classes : le bruit de fond, le fantôme *FT* et le fantôme *FS*.

Comme nous pouvons le voir à travers les histogrammes de la figure 2.3.1, la première opération a permis de distinguer le fond et de lui attribuer une intensité nulle ; la deuxième étape a permis de classer le bruit de fond tout en corrigeant l'image de fluorescence. A la dernière étape l'historgramme contient trois intensités : 0, 128 et 255 attribuées

respectivement au bruit de fond, à *FT* et *FS*. Ces valeurs sont constantes et ne sont données que pour l’affichage. Les intensités moyennes de chaque zone sont calculées à partir des centres de masses fournis par ISODATA et des paramètres d’échelle sauvegardés pendant le traitement. Le tableau 2.3.1 présente ces résultats en comparaison avec les valeurs initiales.

	<i>Intensité initiale</i>	<i>Intensité calculée</i>	<i>Taille initiale</i>	<i>Taille calculée</i>
FS	134,3±2,9	131	6.81%	6.81%
FT	95,1±2,3	99	42.75%	42.75%

Tableau 2.3.1 : Résultats quantitatifs de Globa pour le fantôme semi-virtuel de la figure 2.3.1

Nous notons que la différence des intensités de *FT* et *FS* avant et après l’application de Globa n’est pas significative, compte tenu de la fluctuation de chaque zone dans l’image de fluorescence et de la fluctuation dans l’image en lumière blanche (intensité moyenne de *FT* = $75.8 \pm 4,6$ et intensité moyenne de *FS* = $81.8 \pm 4,2$ dans l’image en lumière blanche, soit un écart moyen de 4 niveaux de vert) qui entre en jeux lors de la correction de l’image de fluorescence (étape 2).

Les tailles calculées de *FT* et *FS* sont égales à celles des tailles de départ.

Les erreurs d’estimation de l’intensité moyenne de chaque classe dépendent du choix de l’algorithme de restauration. Elles sont nulles (à 1 degré près pour les intensités/erreur de calcul) pour les images non filtrées mais le filtrage est important sauf pour les images non bruitées (images virtuelles).

Ces erreurs sont plus importantes avec le filtre de NAGAO qu’avec le filtre Médian (appliqué dans ce cas) et ceci pour les raisons suivantes :

- le filtre de NAGAO attribue au pixel central du masque une moyenne locale (celle qui a la plus faible variance) de sorte que les pixels de frontière se retrouvent avec une intensité intermédiaire entre deux classes. Donc les valeurs moyennes calculées pour chaque classe seront affectées par ce filtrage. Il en est de même pour les tailles calculées car ces pixels peuvent se retrouver dans une classe différente de la classe de départ, en fonction de leurs nouvelles valeurs. Les erreurs seront d’autant plus grandes que la taille du masque est grande.
- le filtre Médian (comme le filtre de rang adaptatif) attribue au pixel central du masque l’intensité médiane dans son voisinage. Les pixels appartenant à un frontière peuvent

basculer d'une classe à l'autre mais leurs intensité sera celle de l'une des deux classes. De ce fait les intensités calculées seront meilleurs qu'avec NAGAO.

Or, nous avons vu que pour certaines images (figures 2.2.1.1 et 2.2.1.2), le filtre de NAGAO a un meilleur rapport signal sur bruit que le filtre Médian. Il y a donc un compromis entre restauration et restitution des données de départ. Le filtre Médian est donc à nouveau préféré même s'il donne parfois une restauration de moindre qualité que celle de NAGAO.

Pour retrouver les concentrations de départ de chaque fantôme nous utilisons la réponse de la composante verte du système d'acquisition $G_v(F)$ (partie IV, chapitre 1)

$$G_v = -0.3F^2 + 12.8F + 32.7$$

Les intensités respectives de 99 et 131 fournies par Globa nous conduisent alors aux concentrations respectives de 6.1 $\mu\text{g/ml}$ et 10.04 $\mu\text{g/ml}$ de fluorescéine pour *FT* et *FS*. Les valeurs initiales étaient respectivement de 5 $\mu\text{g/ml}$ et de 10 $\mu\text{g/ml}$: l'erreur est minime si on prend en considération les erreurs de mesure.

Exemple 2

Pour vérifier la fiabilité de détection de Globa nous avons choisi un exemple ayant des conditions extrêmes : les deux classes (tumeur et tissu sain) ont seulement 1 niveau de vert ou de rouge de différence, et la zone tumorale est très petite (rayon de 1 pixel, soit 3 pixels en tout). Nous avons choisi une taille minimale de 3 pixels pour la tumeur car en dessous de cette dimension, ces pixels seront supprimés par le filtre de rang.

L'application de Globa sur cette image virtuelle est donnée dans la figure 2.3.2.

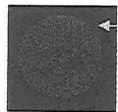
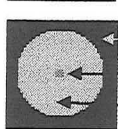
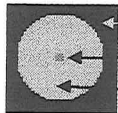

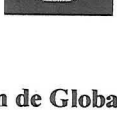

	Images	Intensité	Surface (%)
Image en lumière blanche	 ← Fond	17	50,43
	 ← Tumeur et Tissu sain	100	49,57
Image de fluorescence	 ← Fond	17	50,43
	 ← Tumeur	20	0,56
	 ← Tissu sain	21	49
Résultat	 ← Tumeur ← Tissu sain	19 21	0,31 49,25

Figure 2.3.2 : Application de Globa avec un choix quantitatif sur une image virtuelle de 40x40 pixels

La région simulant la tumeur est retrouvée avec une erreur d'intensité de 1 (19 au lieu de 20) et une erreur de taille de -0.25% ce qui correspond à 4 pixels en moins qui ont été classifiés avec le tissu sain au lieu d'être classifiés avec la tumeur (image de 40x40 pixels). Ces pixels appartiennent à la frontière tissu sain/tumeur, et plus particulièrement aux coins de la tumeur ; leur mauvaise classification est due au filtre médian, qui compte tenu des pixels de voisinage, a changé leurs valeurs. L'erreur maximale est majorée par le nombre de pixels du périmètre d'une zone donnée (dans ce cas 4 pixels avec une limite supérieur de 8 pixels) mais elle n'atteint pas cette limite car elle dépend aussi de la forme du périmètre. Le tissu sain est retrouvé avec la même intensité de départ et avec une taille supérieure de 0.25% ce qui correspond aux 4 pixels de plus provenant de la tumeur. Donc l'erreur de classification affecte certains pixels appartenant aux régions frontières et est due au filtre de rang qui basculera ces pixels d'une classe à l'autre en fonction de leur voisinage.

Exemple 3

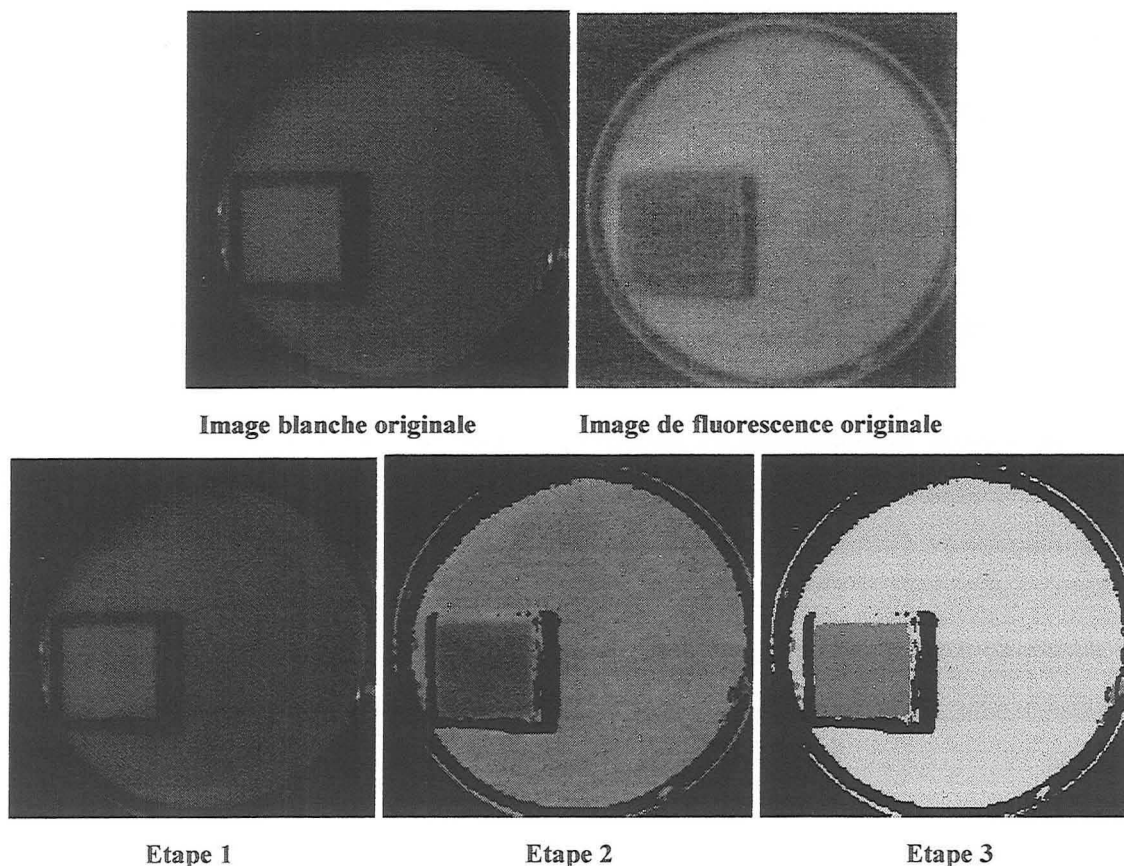


Figure 2.3.3 : Application de Globa sur les composantes vertes des images de fluorescence et en lumière blanche de F1F5 avec un choix quantitatif ($P=15 \text{ mW/cm}^2$ $\lambda = 410 \text{ nm}$)

Considérons à nouveau l'image réelle F1F5 (prise avec un objectif standard). Le résultat de l'application de Globa avec un choix quantitatif (avec les images d'entrée et les trois étapes de traitement) est donné dans la figure 2.3.3.

Nous constatons que les classifications du fantôme central et du fantôme périphérique sont assez bonnes. Cependant une partie du bord de la cuve est classifiée avec le fantôme central. Ceci est la conséquence de la binarisation de l'image blanche. En effet cette opération aurait dû classer toute la cuve avec le fond mais cela n'a pas été le cas, car la partie supérieure était éclairée plus que les autres et a été classée par conséquent, comme zone utile. Rappelons que l'application de ISODATA seul sur F1F5 (figure 2.2.3.4) n'était pas aussi bonne, ce qui souligne l'intérêt des étapes qui précèdent la segmentation dans l'algorithme global.

Les paramètres quantitatifs fournis par GLOBA ont une taille relative de 6.82 % et une intensité moyenne de 21 pour le fantôme central. Les valeurs respectives attribuées au fantôme périphérique sont de 39.63 % et 37. Ce qui correspond à un rapport d'intensité de 1.76. Le rapport d'intensité est obtenu à partir des spectres de fluorescences qui sont multipliés par la réponse verte du système d'imagerie, puis intégrés. Il est égal à 1.74 : les deux mesures sont comparables.

Nous ne pouvons pas remonter jusqu'à la concentration en fluorescéine de chaque fantôme comme ce fût la cas pour l'exemple précédent car les réponses du dispositif d'imagerie en fonction de la concentration de la fluorescéine ont été mesurées dans des conditions différentes de celles de l'image F1F5 (valeur de la concentration de rouge de méthyl prise dans la zone non linéaire du système d'imagerie $> 35\mu\text{g/ml}$ (voir chapitre 1); utilisation de l'objectif standard au lieu du cystoscope).

Il faut trouver des équations de transfert plus générales qui tiennent compte à la fois de la variation de la fluorescence et de l'absorption.

Le résultat de Globa sur F1F5 avec un choix qualitatif est donné dans la figure 2.3.4. Le rehaussement entre F1 et F5 est très important (contraste de 255) avec une inversion des intensités (F1 était plus sombre que F5 avant le rehaussement). L'algorithme de rehaussement de contraste adopté (HSX : décalage d'histogramme vers les grandes intensités) a également permis la détection de contour (double contour) des deux cuves contenant les deux fantômes.

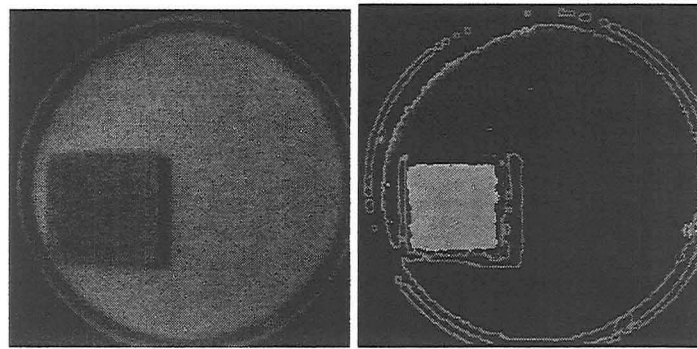


Image de fluorescence après expansion dynamique

Image rehaussée

Figure 2.3.4 : Application de Globa sur les composantes vertes des images de fluorescence et en lumière blanche de F1F5 avec un choix qualitatif ($P=15 \text{ mW/cm}^2$ $\lambda = 410 \text{ nm}$)

Exemple 4

Nous avons également considéré un autre fantôme à base de fluorescéine avec des concentrations plus importantes de telle sorte que sa fluorescence soit détectée par le cystoscope. Le modèle est nommé CF5F25 et contient deux fantômes : l'un ayant une concentration de $5 \mu\text{g/ml}$ simule la tumeur et l'autre simule le tissu sain avec une concentration de $25 \mu\text{g/ml}$.

Le résultat de l'application de Globa sur les composantes vertes de CF5F25 sont donnés dans la figure 2.3.5.

A la première étape la binarisation de l'image blanche est presque parfaite avec une classification des cuves dans la zone du bruit. Remarquons ensuite le faible contraste entre les deux fantômes (étape 2). Cependant la classification est assez bonne avec une zone d'erreur au niveau des bords du fantôme central (CF5). Cette mauvaise classification est un effet secondaire du filtrage de l'image en lumière blanche puis de la correction de l'image de fluorescence par rapport à l'image blanche. En effet au voisinage de la petite cuve (intensité faible comparée au fantôme CF5) certains pixels se sont retrouvés avec une intensité plus faible après le filtrage à cause d'une tendance majoritaire vers les intensités plus sombres de leurs voisins. Lorsque nous divisons l'image de fluorescence par l'image en lumière blanche, les pixels correspondant à ces derniers dans l'image de fluorescence auront des intensités plus élevées que celles appartenant au fantôme CF5 et qui ne sont pas au voisinage de la petite cuve. Cette mauvaise classification peut être supprimée avec un deuxième filtrage de rang. Les pixels seront alors soit dans le fond (petite cuve) soit dans CF5.

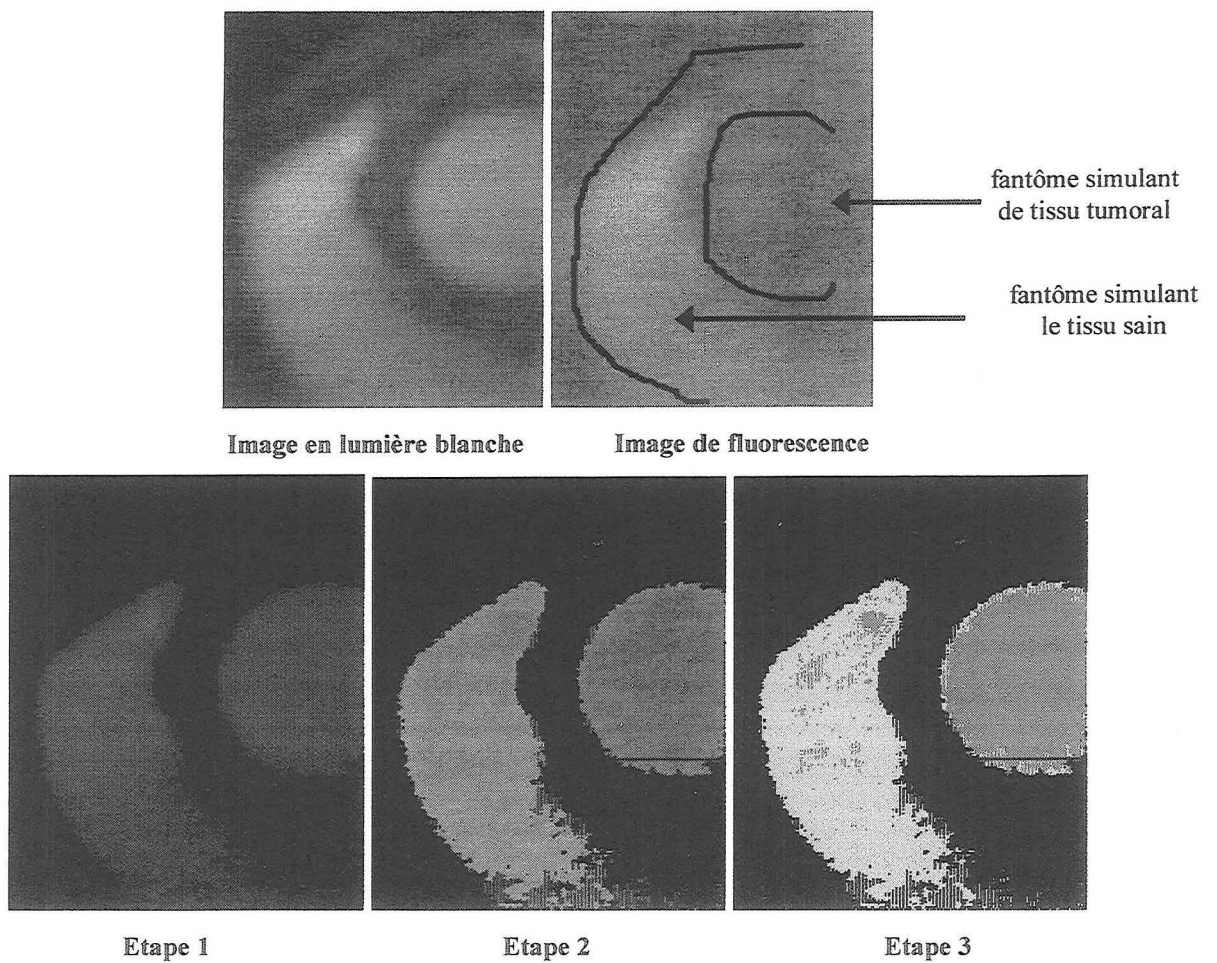


Figure 2.3.5. : Application de Globa sur l'image de fluorescence et en lumière blanche de CF5F25 avec un choix quantitatif ($p = 15 \text{ mW/cm}^2$; $\lambda = 410 \text{ nm}$)

L'application de Globa avec un choix qualitatif sur CF5F25 est donnée dans la figure 2.3.6.

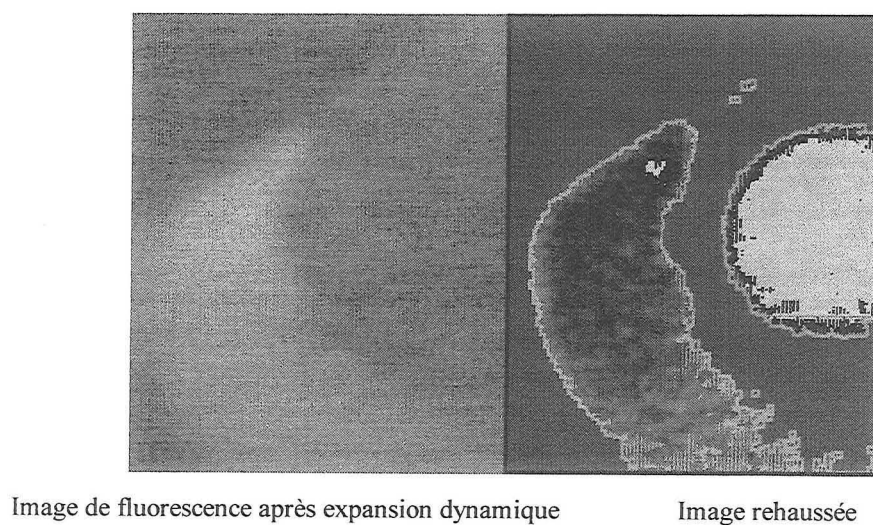


Figure 2.3.6 : Application de Globa sur CF5F25 avec un choix qualitatif

Le rehaussement de contraste est important entre les deux fantômes est leur distinction est améliorée en comparaison avec l'image de départ.

Fluorescence induite

Rappelons que l'une des variantes de Globi par rapport à Globa est l'utilisation des composantes rouges des images originales et la suppression de l'information d'autofluorescence avec un rapport déterminé au cours d'une analyse spectrale. Dans le cas d'un choix quantitatif, nous nous arrêterons aux trois étapes suivantes du traitement :

étape 1 : binarisation de la composante rouge de l'image en lumière blanche, puis restitution des données qui n'ont pas été classées avec le fond,

étape 2 : soustraction de l'autofluorescence puis correction de l'image de fluorescence rouge par rapport à l'image en lumière blanche,

étape 3 : segmentation de la composante rouge de l'image de fluorescence.

Dans le cas d'un choix qualitatif nous donnerons uniquement l'image de fluorescence rehaussée.

Exemple 1

Le résultat de l'application de Globi avec un choix quantitatif sur une image semi-virtuelle de fantômes à base de PpIX est donné dans la figure 2.3.7. Ce fantôme est construit de la même manière que celui de la figure 2.3.1. Le rapport de correction (suppression de l'autofluorescence) est nul puisque les deux fantômes ne contiennent aucune fluorescence dans le vert (pas de fluorescéine).

Les résultats quantitatifs donnés par Globi pour ce modèle sont donnés par le tableau 2.3.2.

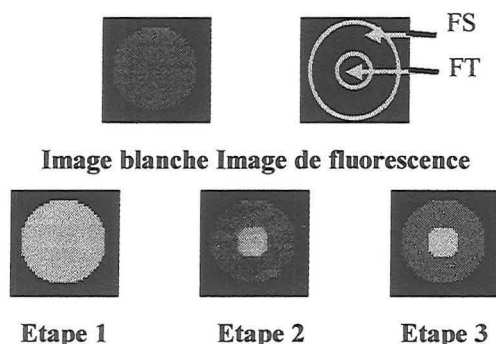


Figure 2.3.7 : Application de Globi sur les composantes rouges des images de fluorescence et en lumière blanche d'une image semi-virtuelle à base de PpIX (FS : fantôme simulant le tissu sain ; FT fantôme simulant la tumeur)

	<i>Intensité initial</i>	<i>Intensité calculée</i>	<i>Taille initiale</i>	<i>Taille calculée</i>
FT	43,8±2,8	43	6.81%	6,8%
FS	21,8±2,8	21	42.75%	42,7%

Tableau 2.3.2 : Résultats quantitatifs de Globi pour le fantôme semi-virtuel de la figure 2.3.4

Les intensités moyennes de chaque région sont retrouvées avec une précision de 1 niveau. Cette précision est meilleure que celle obtenue avec le fantôme semi-virtuel de la figure 2.3.1 en raison d'une plus faible fluctuation dans l'intensité moyenne de l'image en lumière blanche de cette dernière image (109 ± 6 et 112.7 ± 5.1 pour *FT* et *FS* respectivement). La taille de chaque région est retrouvée avec exactitude.

Pour connaître les concentrations en PpIX de chaque fantôme il suffit de résoudre l'équation définissant la réponse rouge du dispositif d'imagerie en fonction de la variation de la PpIX (partie IV, chapitre 1). Rappelons l'expression de cette réponse :

$$Gr = -0.126P^2 + 3.96P + 18.26$$

Les intensités respectives de 43 et 21 fournis par Globi nous conduisent alors aux concentrations respectives de 8.6 $\mu\text{g/ml}$ et 0.7 $\mu\text{g/ml}$ de PpIX pour *FT* et *FS*. Les valeurs initiales étaient respectivement de 10 $\mu\text{g/ml}$ et de 1 $\mu\text{g/ml}$. Les différences seront jugées significatives ou non selon l'intérêt de la précision recherchée.

Exemple 2

Les résultats de Globi sur le fantôme M10M3 composé de mTHPC sont donnés dans la figure 2.3.8. Ici encore le facteur R déterminé lors de l'analyse spectrale est nul car les deux fantômes n'ont pas de fluorescence dans le vert.

Dans cette figure, le fantôme central simulant la tumeur est bien classifié. Cependant, l'erreur de classification du bord de la cuve est à nouveau rencontrée. En plus certains pixels au voisinage de la grande cuve sont classés avec M10 au lieu d'être classés avec M3. Les raisons de cette mauvaise classification sont dues au filtrage de l'image en lumière blanche suivi de la division de l'image de fluorescence par l'image en lumière blanche, comme expliqué dans l'exemple 4 en autofluorescence.

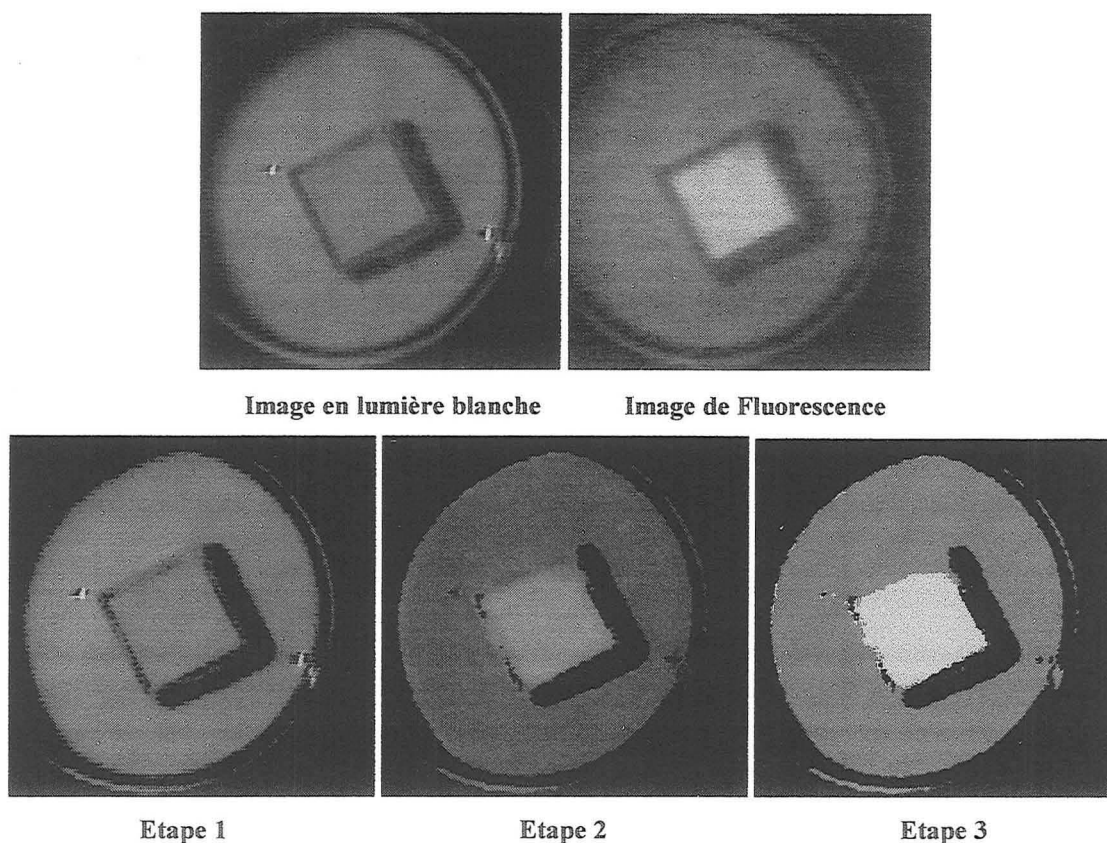


Figure 2.3.8 : Application de Globi sur les composantes rouges des images en lumière blanche et de fluorescence de M10M3 avec un choix quantitatif ($P= 15 \text{ mW/cm}^2$; $\lambda = 410 \text{ nm}$)

L'algorithme attribue au fantôme central une taille relative de 7.84 % et une intensité moyenne de 86, et pour le fantôme périphérique une taille de 43.8 % et une intensité moyenne de 47. Le rapport d'intensités M10/M3 est alors de 1.83, il est comparable avec celui obtenu à partir de l'analyse spectrale (2.16). Pour l'instant, nous ne pouvons pas, corréler ces chiffres aux concentrations de départ de chaque fantôme, car les réponses du système d'imagerie déterminée dans le chapitre 1 de cette partie ne sont pas appropriées pour cette application.

Le résultat de Globi sur M10M3 avec un choix qualitatif est donné dans la figure 2.3.9. Le rehaussement est important entre M3 et M10 en comparaison avec l'image de fluorescence de départ.

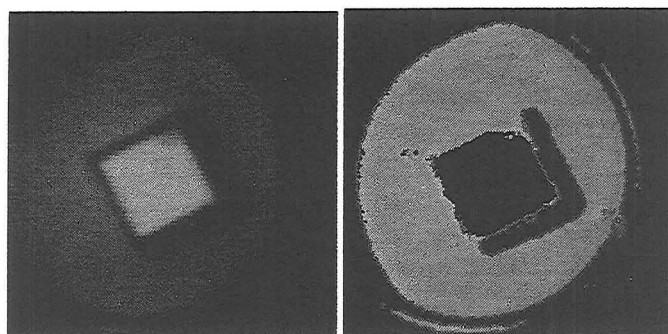


Image de fluorescence après expansion dynamique

Image rehaussée

Figure 2.3.9 : Application de Globi sur les composantes rouges des images en lumière blanche et de fluorescence de M10M3 avec un choix qualitatif ($P= 15 \text{ mW/cm}^2$; $\lambda = 410 \text{ nm}$)

En conclusion la plus petite région détectable par Globi/Globa est de 9 pixels et une différence de 1 niveau entre deux classes suffit pour les différencier, s'il n'y pas de fluctuation dans l'image (images virtuelles). Les intensités de chaque région nous permettent de retrouver avec une bonne précision les concentrations en photosensibilisant, connaissant les réponses du système d'imagerie au variations de l'intensité de fluorescence (images semi-virtuelles).

En ce qui concerne les images réelles GLOBI et GLOBA identifient avec une bonne précision les zones simulants la tumeur ou le tissu sain avec ou sans photosensibilisant, si nous faisons abstraction de la mauvaise classification du bord des cuves et des pixels appartenant à des zones frontières dont la classification peut être altérée par le filtrage et la correction de l'image.

3. Résultats sur les modèles animaux

3.1. Introduction

- Le premier modèle comporte deux souris hairless avec des tumeurs induites chimiquement[111] situées sur le dos et qui ont atteint un diamètre d'environ 5 mm au moment de la mesure. La première souris notée (*hm*) est injectée de 0.5 mg/kg de mTHPC et la deuxième souris (*hh*) est injectée de la même dose d'HpD. Les injections se font par voie intrapéritonéale (i.p.).
- Le deuxième modèle comporte deux souris nudes dont les tumeurs sont greffées sur le flan à partir des cellules tumorales humaines HT29. La première notée *n* n'a pas été photosensibilisée (autofluorescence). La deuxième notée *na* est injectée d'une dose de 250

- Le troisième modèle noté *ra* est une rate Fischer 344 dont la tumeur est greffée sur la vessie à partir des cellules tumorales AY-27. Elle est également injectée de 250 mg/kg d'ALA par voie (i.p.).

Les images sont prises à des instants donnés après l'injection de la drogue, le temps en heures est ajouté au nom de chaque modèle. Par exemple *hh48* correspond à la souris *hh*, 48 heures après l'injection de l'HpD.

Dans tous les cas la source d'excitation est le laser à Krypton (410 nm) avec une puissance de 15 mW/cm².

Comme précédemment, nous présentons les résultats des algorithmes de restauration, de rehaussement de contraste ou de contours et de segmentation sur certaines images de ces modèles avant de tester les algorithmes globaux (en autofluorescence et en fluorescence induite).

3.2. Application des algorithmes de restauration de rehaussement de contraste ou de contour et de segmentation sur les images de fluorescence des souris hairless

3.2.1 : Application des algorithmes de restauration

Le résultat de l'application du filtre Médian, du filtre de rang adaptatif de taille 5, du filtre de NAGAO et du filtre de WIENER sur les composantes verte de l'image d'autofluorescence de *hm* (*hm0*) et de *n* (*n0*) sont respectivement donnés dans les figure 3.2.1.1 et 3.2.1.3.

Une autre application de ces algorithmes sur la composante rouge de l'image de fluorescence de *hh48* (souris hairless 48 heures après l'injection de l'HpD) est donnée par la figure 3.2.1.2.

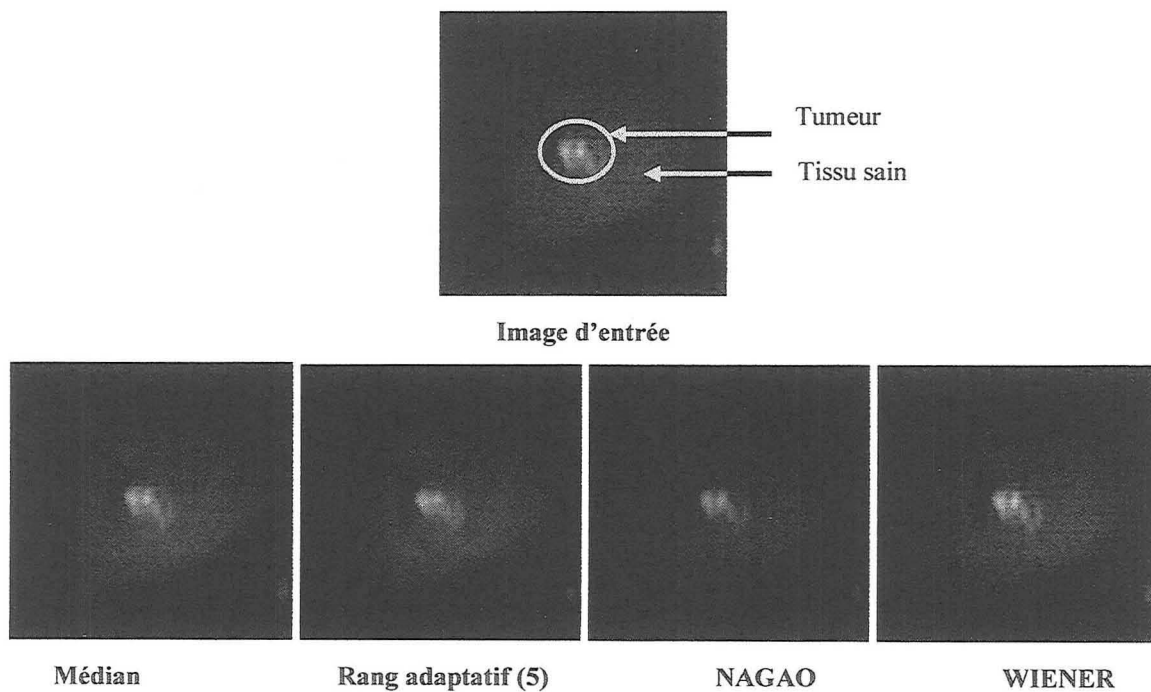


Figure 3.2.1.1 : Application des algorithmes de restauration sur l'image de fluorescence de *hm0* après expansion dynamique

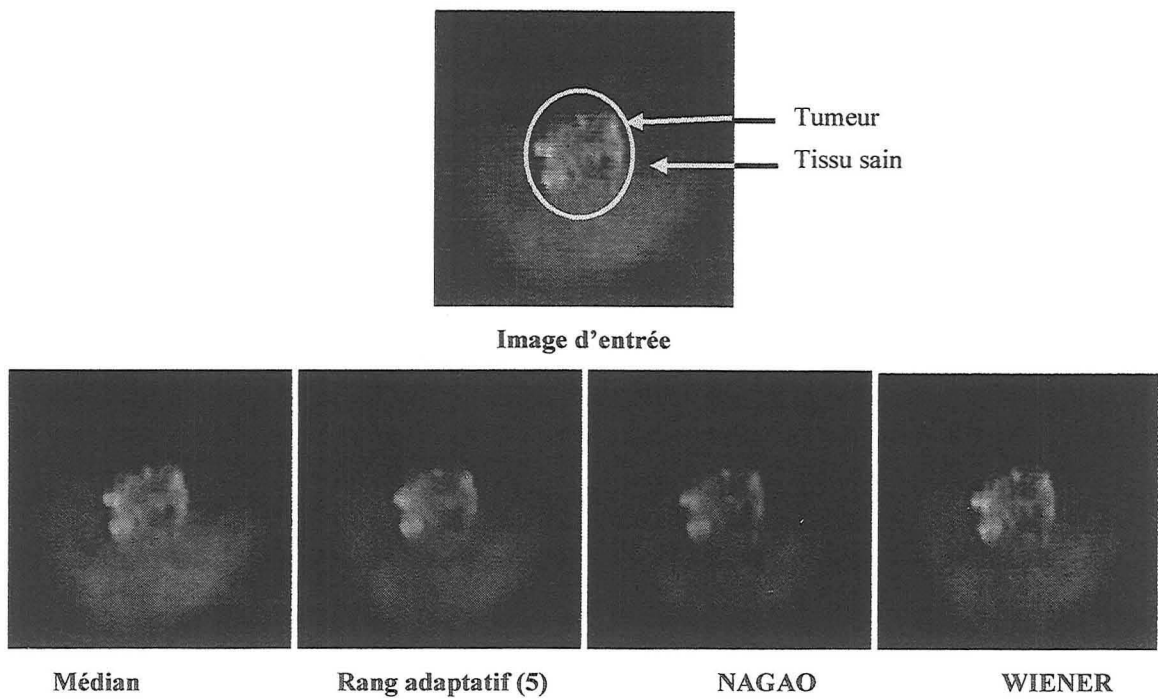


Figure 3.2.1.2 : Application des algorithmes de restauration sur l'image de fluorescence de hh48 après expansion dynamique

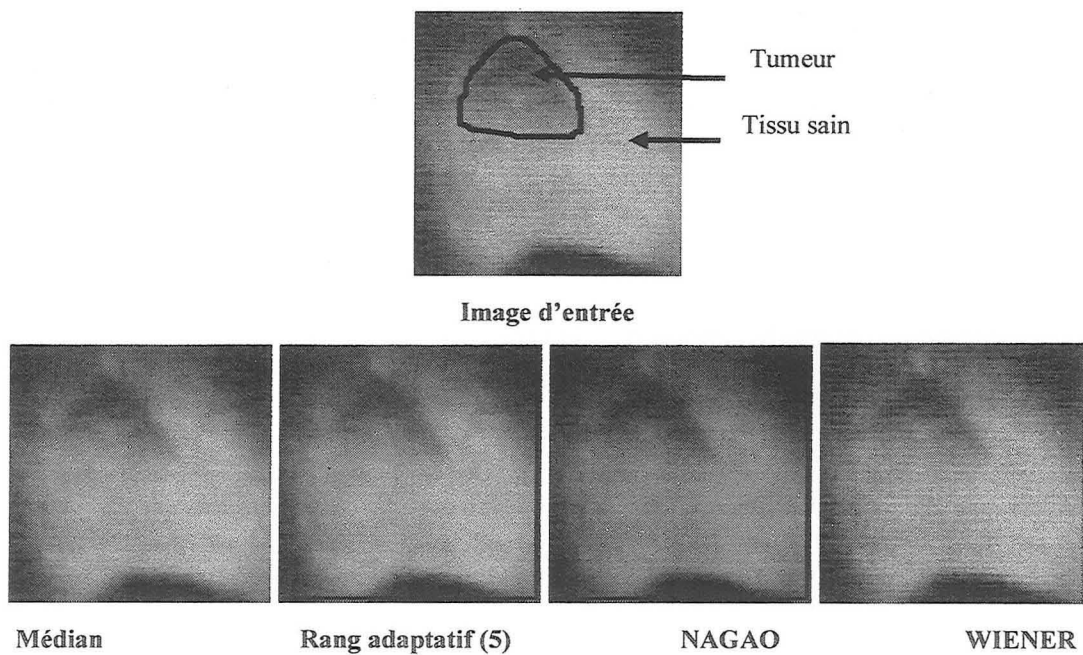


Figure 3.2.1.3 : Application des algorithmes de restauration sur l'image de fluorescence de n0 après expansion dynamique

D'après les figures 3.2.1.1, 3.2.1.2 et 3.2.1.3 nous pouvons dire qu'il n'y a pas de différences apparentes entre les résultats du filtre Médian, du filtre de NAGAO et du filtre de rang adaptatif, à l'exception de taches homogènes plus importantes avec le filtre de rang adaptatif et le filtre Médian.

Le filtre de WIENER n'apporte pas d'amélioration à l'image d'origine et le bruit de conversion PAL-RGB n'a pas été supprimé.

Nous avons également calculé le rapport signal sur bruit de *hm*, *hh48* et *n0* avant et après l'application des algorithmes de restauration (tableau 3.2.1.1). Le filtre de rang adaptatif donne un rapport S/B beaucoup plus faible que celui de l'image d'entrée. Le filtre de WIENER apporte un faible gain du rapport (S/B) pour *hh48* et un gain inférieur à 1 pour *hm0*. Le filtre Médian et le filtre de NAGAO améliorent considérablement ce rapport avec une meilleure performance pour le filtre Médian.

S/B	Entrée	Médian	Rang adaptatif (5)	NAGAO	WIENER
<i>hh48</i>	26,39	85,49	12,17	69,45	26,77
<i>hm0</i>	12,43	43,79	5,01	28,41	12,19
<i>n0</i>	17,43	41,47	17,09	16,93	18,84

Tableau 3.2.1.1 : Comparaison des rapports signal sur bruit de *hh48* et *hm0* et *n0* avant et après restauration

Rappelons que le filtre Médian est en moyenne 66 fois plus rapide que le filtre de NAGAO. En conclusion, c'est le filtre Médian qui semble le plus approprié pour le prétraitement de ces images de souris avec et sans photosensibilisant.

3.2.2 : Application des algorithmes de rehaussement de contraste ou de contour

Les résultats de l'application des algorithmes de rehaussement de contraste ou de contour sur les images de fluorescence de *hm0* (composante verte/autofluorescence), *hh48* (composante rouge/fluorescence induite par l'HpD) et *n0* (composante verte/autofluorescence) sont respectivement donnés par les figures 3.2.2.1, 3.2.2.2 et 3.2.2.3

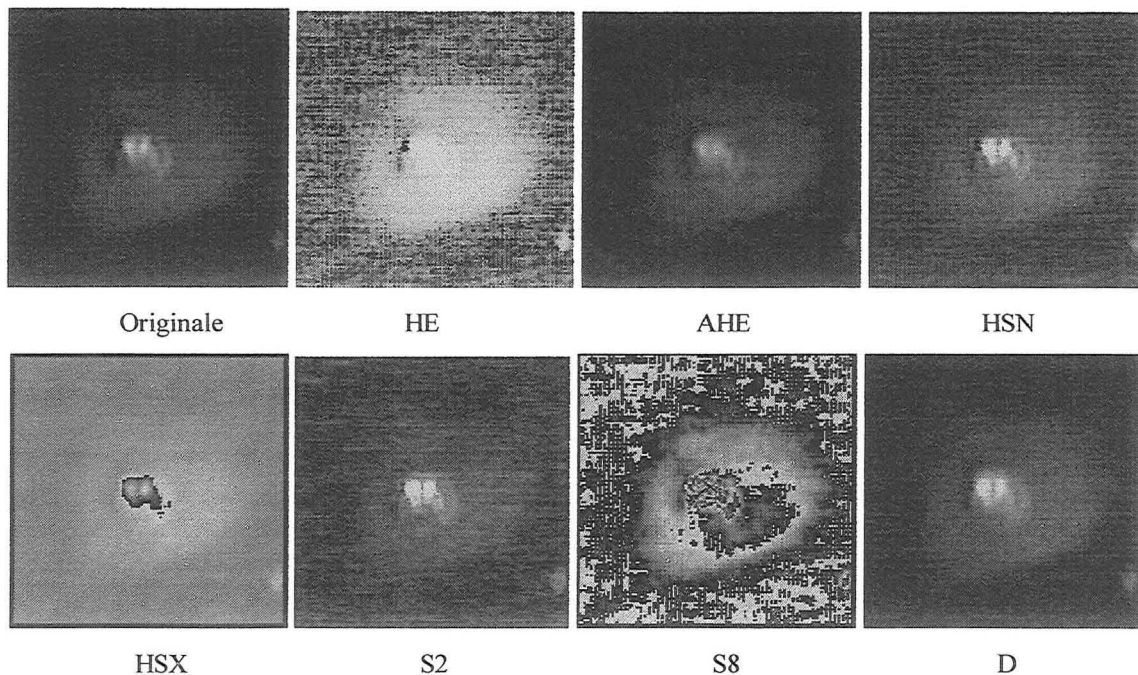


Figure 3.2.2.1 : Résultats du rehaussement de contraste sur *hmo* avant et après l'application de HE, AHE, HSN, HSX, S2, S8 et D (HE : Histogram Equalisation ; AHE Adapataitive Histogram Equalisation ; HSN Histogram Shifting /Minimum ; HSX : Histogram Shifting Maximum ; D : DERICHE)

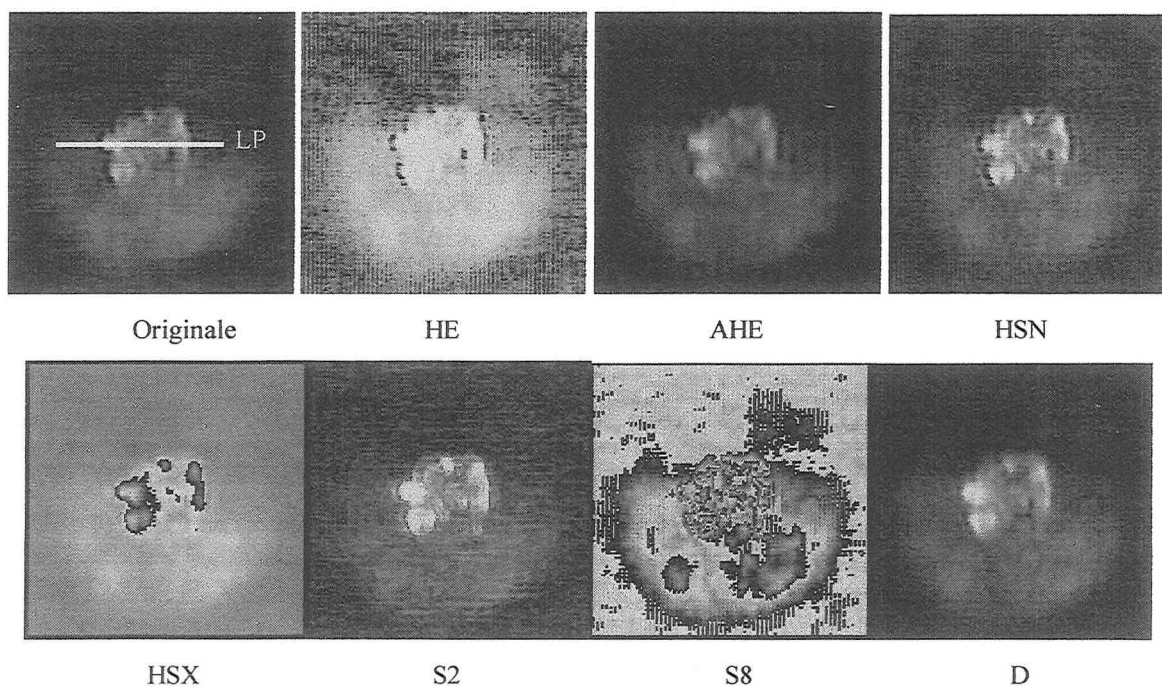


Figure 3.2.2.2 : Résultats du rehaussement de contraste sur *hh48* avant et après l'application de HE, AHE, HSN, HSX, S2, S8 et D (HE : Histogram Equalisation ; AHE Adapataitive Histogram Equalisation ; HSN Histogram Shifting /Minimum ; HSX : Histogram Shifting Maximum ; D : DERICHE ; LP : ligne profil)

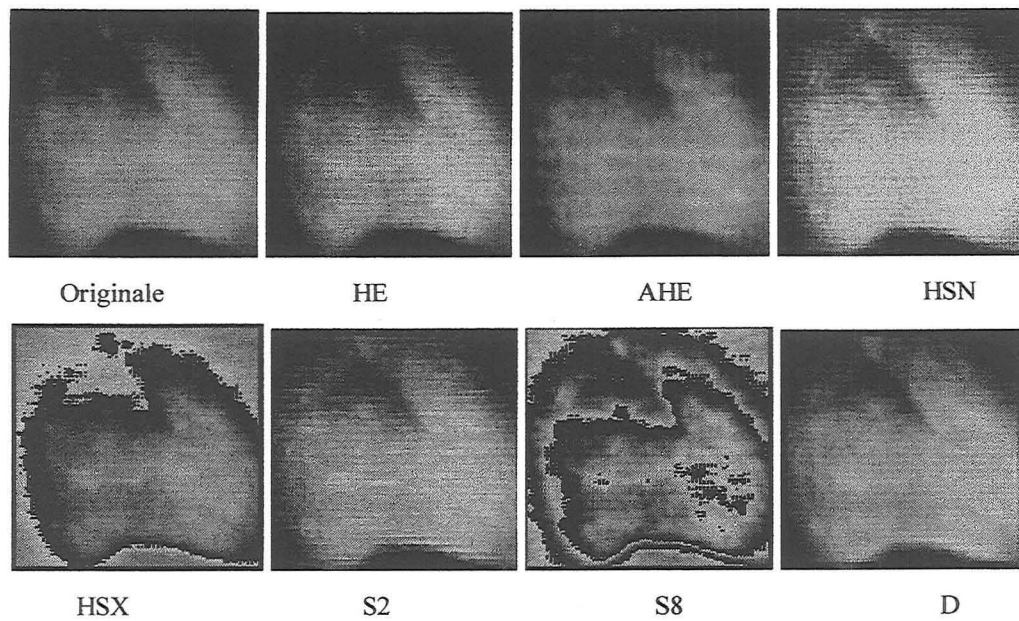


Figure 3.2.2.3. : Résultats du rehaussement de contraste sur *hh48* avant et après l'application de HE, AHE, HSN, HSX, S2, S8 et D (HE : Histogram Equalisation ; AHE Adapataitive Histogram Equalisation ; HSN Histogram Shifting /Minimum ; HSX : Histogram Shifting Maximum ; D : DERICHE)

Dans les figures 3.2.2.1, 3.2.2.2 HE ne donne pas le bon contraste au bon endroit (ce n'est pas le cas de la figure 3.2.2.3). S8 fournit un contraste important avec une création de faux contours et une importante sensibilité au bruit. HSN et S2 donnent des résultats similaires avec un léger rehaussement du bruit. D fournit un contraste voisin de ces deux derniers mais sans bruit. HSX donne le meilleur contraste. En effet, le rehaussement est important entre les régions ayant une différence dans l'intensité de la fluorescence : dans la figure 3.2.2.1 le rehaussement se fait sur la tumeur entre les zones à forte et faible autofluorescence ; dans la figure 3.2.2.2 le rehaussement se fait dans la tumeur entre les régions à forte et faible concentration en HpD ; dans la figure 3.2.2.3 le rehaussement se fait entre la tumeur et le tissu sain.

Pour comparer d'avantage les résultats de S2, D AHE, HSN et HSX, nous avons calculé le contraste pour *hh48* sur la ligne profil indiquée dans la figure 3.2.2.2. Ce traitement consiste à calculer la différence entre l'intensité maximale et minimale dans la ligne profil (avant et après l'application des algorithmes choisis). Le contraste de l'image originale est alors soustrait des valeurs trouvées (tableau 3.2.2.1)

Algorithme	S2	AHE	D	HSN	HSX
Contraste	-21	-12	-11	9	18

Tableau 3.2.2.1 : Valeurs de la différence de contraste avant et après l'application de S2 AHE D HSN et HSX sur la ligne profil de l'image de fluorescence de *hh48* (figure 3.2.2.2)

D'après ces calculs, le contraste est amélioré avec HSX et HSN mais il est diminué avec S2, D et AHE.

Le temps d'exécution relatif a également été relevé pour ces algorithmes (tableau 3.2.2.2.). Nous notons la rapidité de HSX (deuxième position).

	AHE	HSX	HSN	S2	HE	D	S8
emps relatif	0,127	0,185	0,187	0,214	0,469	0,909	1,000

Tableau 3.2.2.2 : Temps relatif moyen d'exécution des algorithmes de rehaussement de contraste et ou de contour sur les images *hm0* et *hh48* (la valeur maximale correspond à 2.8 ms sur un Pentium 75 MHz)

En conclusion HSX est le plus intéressant pour le rehaussement de contraste sur ce type d'images.

3.2.3. Résultats obtenus avec les algorithmes de seuillage

Les images obtenues après l'application de ISODATA et de l'algorithme de relaxation sur *hm0*, *hh48* et *n0* sont respectivement donnés dans les figures 3.2.3.1, 3.2.3.2 et 3.2.3.3.

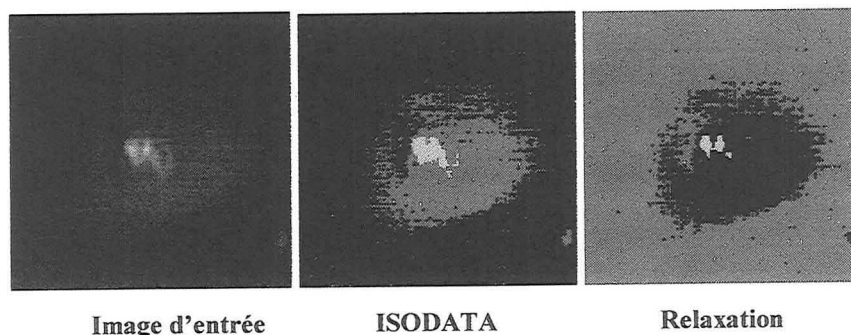


Figure 3.2.3.1 : Résultats de l'application de ISODATA et de l'algorithme de relaxation sur *hm0*

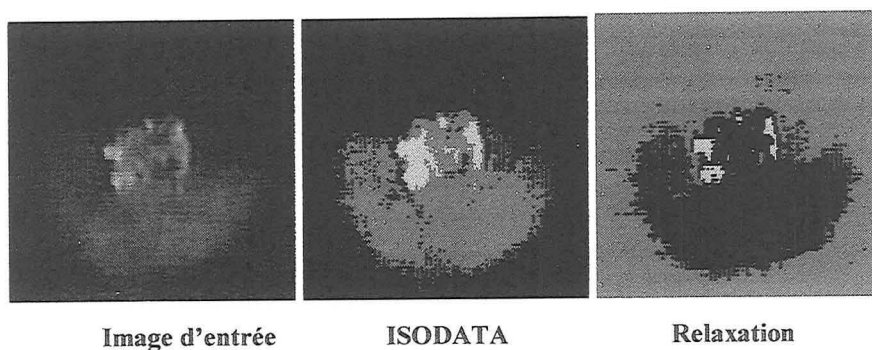


Figure 3.2.3.2: Résultats de l'application de ISODATA et de l'algorithme de relaxation sur *hh48*

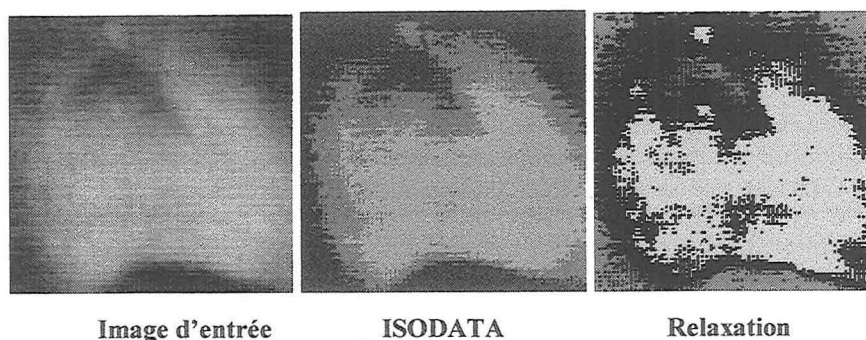


Figure 3.2.3.3: Résultats de l'application de ISODATA et de l'algorithme de relaxation sur l'image *n0*

D'après les figures 3.2.3.1 et 3.2.3.2, la segmentation est réussie par ISODATA et par l'algorithme de relaxation. Mais ce dernier algorithme retrouve les zones à plus forte fluorescence (autofluorescence ou fluorescence induite) avec plus de finesse (ce qui est sa principale qualité : le seuillage se fait de façon locale contrairement à ISODATA).

Dans la figure 3.2.3.3, les deux algorithmes donnent une mauvaise classification de la tumeur (avec le fond) et détectent deux classes dans le tissu sain à cause d'une différence de fluorescence que nous pouvons voir dans l'image d'entrée. Les deux classes de ISODATA

dans le tissu sain présentent une certaine continuité dans le plan contrairement à celles obtenues avec le deuxième algorithme (pixels isolés).

En conclusion et bien que l'algorithme de relaxation puisse apporter une meilleure précision dans la détection des petites régions, ISODATA semble bien adapté aux images de fluorescence des souris avec et sans photosensibilisant. La classification ne permet pas d'identifier la tumeur du tissu sain, mais les zones ayant un signal de fluorescence différent. Ces zones peuvent être localisées au niveau de la tumeur si sa fluorescence n'est pas homogène.

Nous nous sommes limités au cas de trois classes (fond, tumeur et tissu sain) mais il est possible d'augmenter ce nombre de façon à distinguer plus d'une région dans la tumeur et/ou dans le tissu sain.

3.3. Résultats obtenus avec les algorithmes globaux de traitement d'images

Dans les exemples précédents nous avons montré trois étapes de traitement des deux algorithmes Globaux. Dans ce qui suit, seul le résultat de la segmentation (étape 3) sera affiché dans le cas d'un choix quantitatif avec le résultat du choix qualitatif.

Nous considérons les paires d'images (fluorescence et lumière blanche) suivantes pour le test des deux algorithmes :

- composantes vertes de *hm0* pour tester Globa,
- composantes rouges de *hm48* (48 heures après injection de la mTHPC), de *hh48* (deux jours après l'injection de l'HpD) de *na3* (3 heures après l'injection de l'ALA) et *ra8* (8 heures après l'injection de l'ALA) pour tester Globi.

Autofluorescence (hm0)

Nous présentons d'abord les spectres d'autofluorescence du tissu sain et de la tumeur de *hm0* (*hm0_TS* et *hm0_TT*) superposés aux fonctions de transfert RV du module d'acquisition d'images (figure 3.3.1).

Remarquons en plus de la présence des pics de porphyrines endogènes (*hm0_TT*), que l'intensité du signal d'autofluorescence de la tumeur est plus grande que celle du tissu sain. Rappelons que les spectres de fluorescence sont le résultat de la moyenne de trois mesures ponctuelles. Il est donc probable que cette information n'est pas représentative de l'ensemble du site.

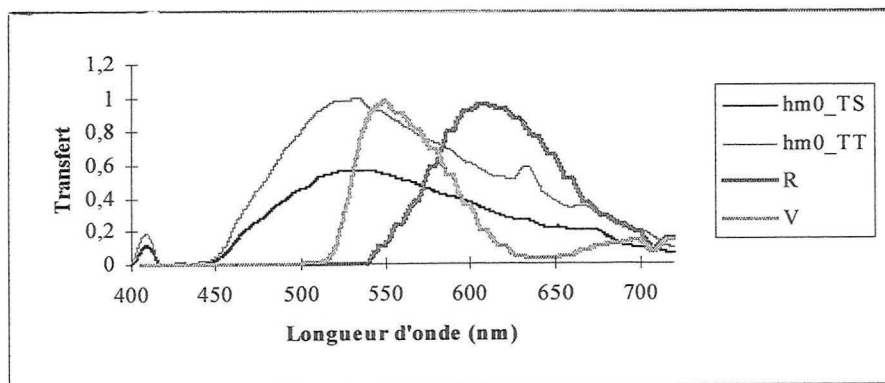


Figure 3.3.1. : Superposition des spectres d'autofluorescence de la tumeur et du tissu sain de la souris hairless (*hm*) qui sera injecté en mTHPC (hm0_TS : tissu sain avant injection de mTHPC ; hm0_TT : tissu tumoral avant injection de mTHPC)

Les résultats de l'application de Globa sur *hm0* avec un choix qualitatif et quantitatif sont donnés dans la figure 3.3.2.

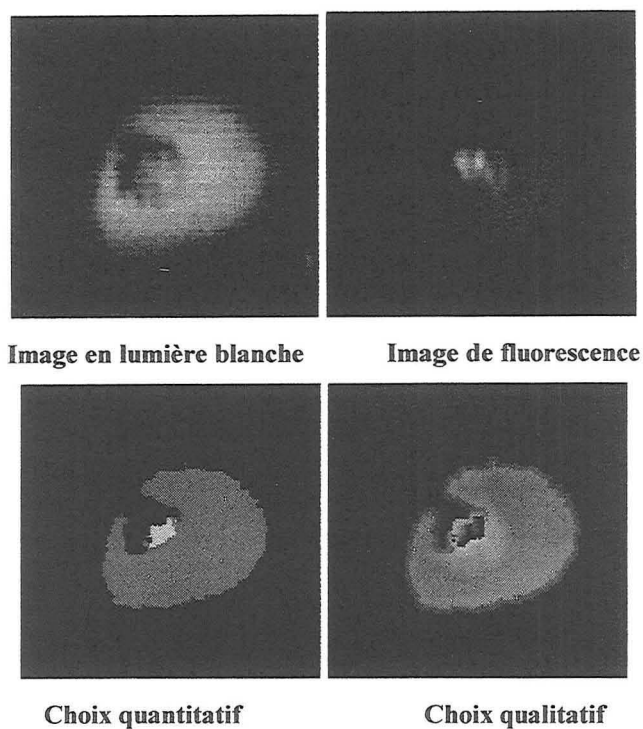


Figure 3.3.2 : Applications de Globa sur *hm0*

Dans l'image de fluorescence une partie de la tumeur a une forte fluorescence. Le reste de la tumeur a une intensité comparable à celle du tissu sain. De ce fait, les spectres d'autofluorescence ne sont pas représentatifs. Cette fluorescence ne peut pas être celle des porphyrines endogènes car elles ne sont pas transmises par la voie verte (figure 3.3.1). Il est probable que cette partie de la tumeur diffuse beaucoup plus la lumière que le tissu sain

(arrangement particulier des cellules) ce qui augmente le signal rétrodiffusé vers le capteur (caméra ou spectrofluorimètre).

L'application de Globa (choix qualitatif) nous a permis d'identifier cette zone avec une intensité de 95 et une taille relative de 0.58%. Le reste du site (tissu sain et la partie la moins fluorescente de la tumeur) est identifié avec une intensité moyenne de 34 et une taille de 17.6%. Le rapport d'intensité TT/TS est de 2.79. Nous ne pouvons pas corrélérer cette valeur avec le rapport des intégrales des spectres de fluorescence verts ($S_v(TT)/S_v(TS) = 1.69$) car il est peu probable que les trois mesures spectrales effectuées sur la tumeur étaient précisément relevées sur la zone à forte fluorescence.

Dans le cas du choix qualitatif HSX a permis un rehaussement de contraste dans la tumeur car c'est dans cette région qu'il y a une différence d'intensité de fluorescence.

Fluorescence induite

Exemple 1

Les spectres d'auto fluorescence de la tumeur et du tissu sain de la souris *hh* avant et 48 heures après l'injection de l'HpD (*hh0* et *hh48*) sont respectivement donnés par les figures 3.3.3 et 3.3.4.

Bien qu'il s'agisse de la même souris, nous remarquons que le signal d'auto fluorescence du tissu sain est plus important que celui de la tumeur dans la figure 3.3.3. La situation inverse est notée dans la figure 3.3.4.

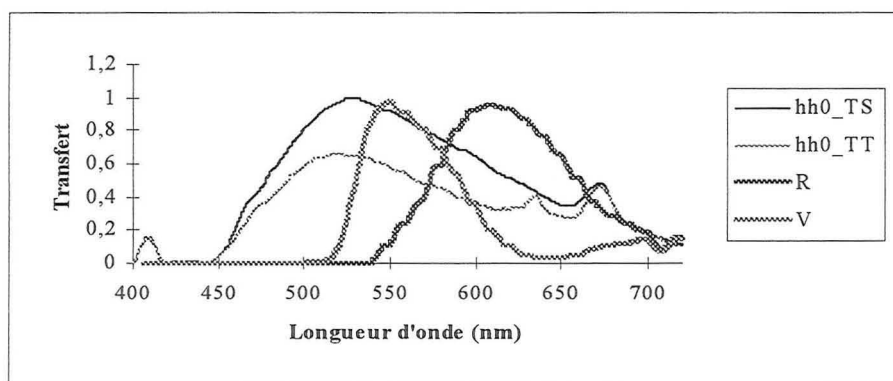


Figure 3.3.3. : Superposition des spectres d'auto fluorescence de la tumeur et du tissu sain de la souris hairless (*hh*) qui sera injecté en HpD (hh0_TS : tissu sain avant injection de l'HpD; hh0_TT : tissu tumoral avant injection de l'HpD)

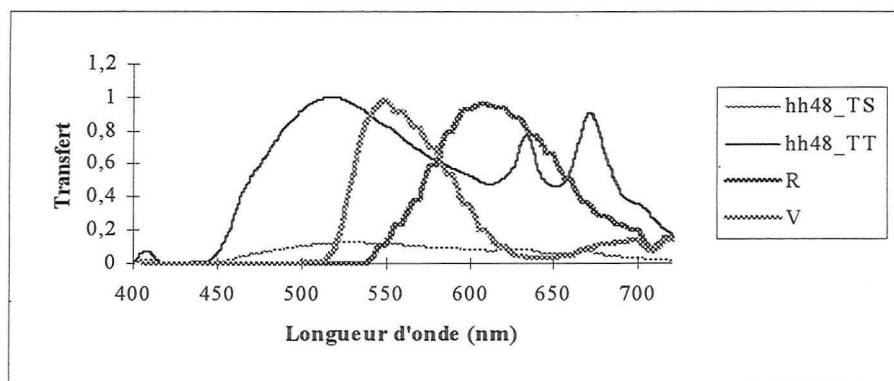


Figure 3.3.4. : Superposition des spectres d'émission de fluorescence de la tumeur et du tissu sain de la souris hairless (*hh*) 48 heures après l'injection de l'HpD (hh48_TS : tissu sain 48 heures après injection de l'HpD; hh48_TT : tissu tumoral 48 heures après injection de l'HpD)

Comme il est peu probable que le signal d'autofluorescence change en deux jours, nous supposons que c'est à nouveau les moyennes des spectres qui ne sont pas représentatives. Notons également (figure 3.3.4) que les pics de fluorescence de l'HpD sont faibles (même ordre de grandeur que l'autofluorescence). Si tel est le cas globalement, il sera nécessaire d'effectuer une soustraction du signal d'autofluorescence transmis par la composante rouge du système d'imagerie (Partie III, 3.1). Pour cela nous avons calculé le facteur correcteur en suivant les étapes suivantes :

- multiplication du spectre d'autofluorescence (tumeur et tissu sain) avec les fonctions de transfert RV
- calcul de l'intégrale des spectres RV de chaque site,
- le facteur correcteur R est le rapport de l'intégrale rouge sur l'intégrale verte.

Les valeurs obtenues diffèrent légèrement entre tumeur et tissu sain compte tenu d'une allure spectrale légèrement différente entre les deux sites (présence plus importante des porphyrines endogènes dans la tumeur (figure 3.3.3)). Le résultat moyen de ce rapport est de 0.976.

L'application de Globi sur *hh48* est donnée dans la figure 3.3.5. Dans cette figure nous montrons une application avec un choix qualitatif et deux applications avec un choix quantitatif : sans suppression de l'autofluorescence (en remplaçant *R* par zéro) et avec suppression de l'autofluorescence ($R=0.976$).

Lorsque le signal d'autofluorescence n'est pas supprimé, Globa détecte certaines parties à forte fluorescence dans la tumeur. Ces régions se superposent avec celles qu'on aperçoit dans l'image de fluorescence de départ. Si nous supprimons l'autofluorescence, une grande

partie de ces régions n'est plus détectée et d'autres régions dans le tissu sain le sont. Ce qui est en concordance avec les spectres des figures 3.3.3 et 3.3.4. En d'autres termes nous avons :

- certaines régions de la tumeur ont un signal d'autofluorescence plus important que celui du tissu sain (différence dans le spectres d'autofluorescence de 3.3.3 et 3.3.4 et suppression de certaines parties à forte fluorescence dans la tumeur lorsque l'autofluorescence est supprimée)
- Le signal de fluorescence induit par l'HpD est faible en comparaison avec l'autofluorescence (spectre de 3.3.4 et des régions non détectées avec $R=0$ le sont après suppression de l'autofluorescence).

Nous pouvons également dire que l'HpD n'a pas été préférentiellement retenu par la tumeur de *hh*, 48 heures après son injection.

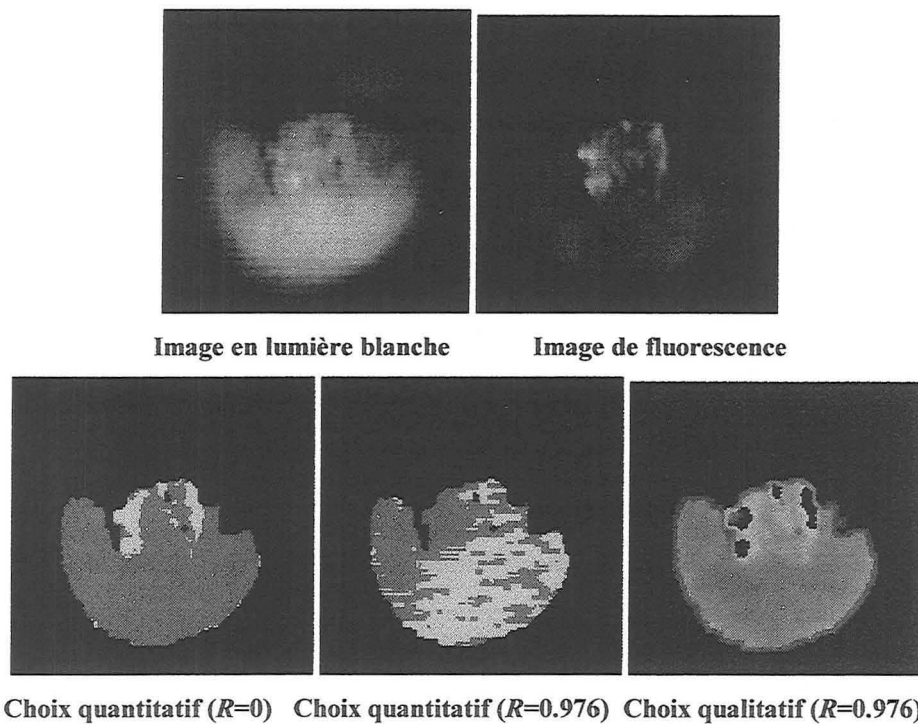


Figure 3.3.5 : Application de Globi sur *hh48*

Les paramètres quantitatifs fournis par Globi pour $R=0$ sont une intensité de 92 et une taille relative de 2.5 % pour la tumeur et une intensité de 49 et une taille relative de 23.7% pour le tissu sain (rapport d'intensité TT/TS de 1.88). Le rapport fourni par l'analyse spectrale est de 7.1

Dans le cas où l'autofluorescence est supprimée ($R=0.976$), l'intensité moyenne attribuée à la tumeur est de 9 avec une taille de 12.89% ; L'intensité attribuée au tissu sain est de 1 avec une taille relative de 13.36%. Ce qui correspond à un rapport TT/TS de 9.

La valeur fournie par l'analyse spectrale dans ce cas est de -145.6 (le signe - est dû à la variation du signal d'autofluorescence avant et 48 heures après l'injection). Il est possible de normaliser le spectre de chaque site par rapport au pic d'autofluorescence, mais la comparaison entre tumeur et tissu sain ne sera pas possible.

Nous voyons qu'il n'est pas facile de comparer les résultats obtenus en imagerie avec ceux obtenus à partir de l'analyse spectrale lorsque la distribution du photosensibilisant (ou plus généralement des sources fluorescentes) n'est pas homogène dans la tumeur et dans le tissu sain.

Dans le cas du choix qualitatif (figure 3.3.5), le rehaussement de contraste s'opère entre les régions à forte et faible fluorescence.

Exemple 2

Les spectres d'émission de fluorescence de la tumeur et du tissu sain de *hm* deux jours après l'injection de la mTHPC sont donnés dans la figure 3.3.6

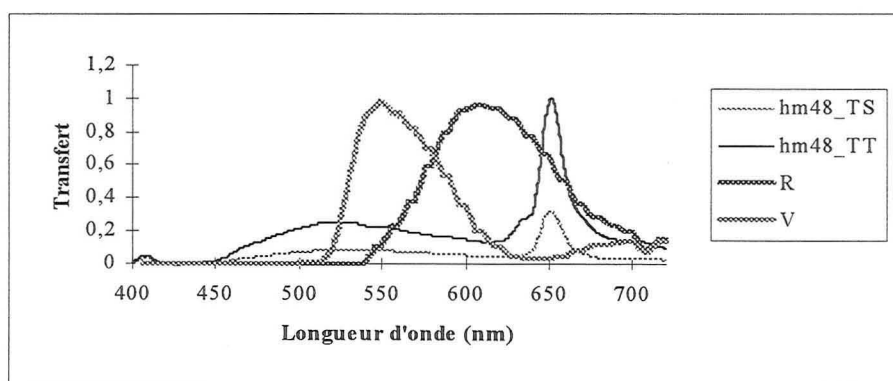


Figure 3.3.6. : Superposition des spectres d'émission de fluorescence de la tumeur et du tissu sain de la souris hairless (hm) 48 heures après l'injection de la mTHPC (hm48_TS : tissu sain ; hm48_TT : tissu tumoral)

D'après cette figure, les intensités d'autofluorescence et de fluorescence induite par la mTHPC de la tumeur sont plus importantes que celles du tissu sain. En plus le pic de la mTHPC est plus grand que celui de l'autofluorescence. Donc si ces mesures représentent les spectres moyens respectifs de la tumeur et du tissu sain, il ne sera pas nécessaire de supprimer le signal d'aufluorescence de la composante rouge. Nous considérerons les deux cas comme pour la souris hh (avec et sans suppressin de l'autofluorescence). Pour cela nous avons calculé le facteur ($R=0.954$) à partir des spectres d'autofluorescence de *hm* (figure 3.3.1).

L'application de Globi sur *hm48* avec deux choix quantitatifs et un choix qualitatif est donnée dans la figure 3.3.7.

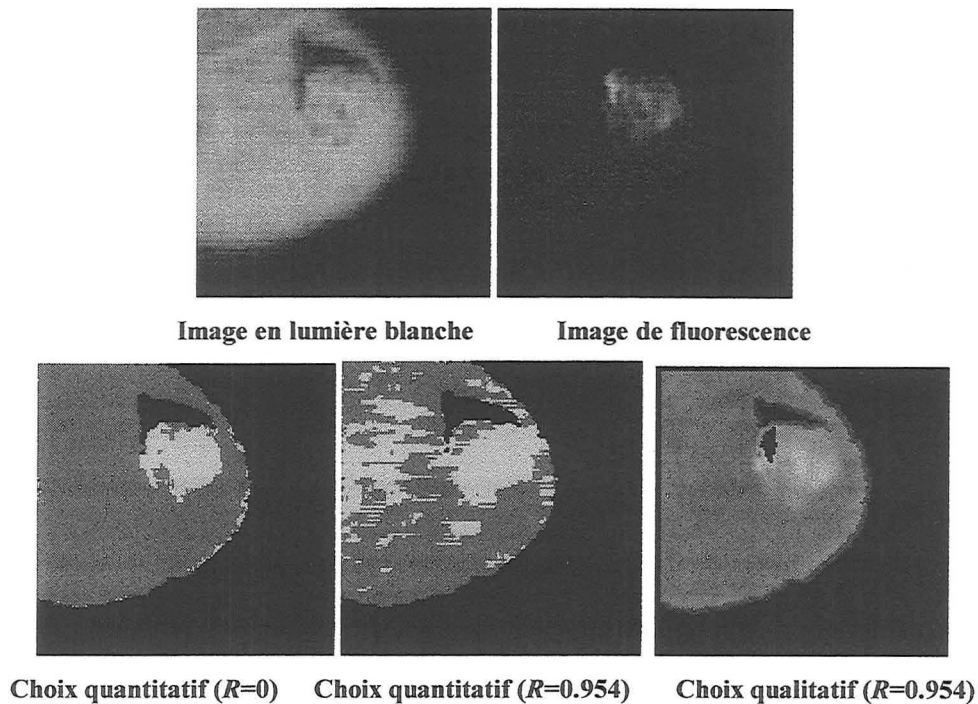


Figure 3.3.7 : Application de Globi sur *hm48*

Dans le cas d'un choix quantitatif, nous avons deux applications :

- sans suppression de l'autofluorescence ($R=0$)
- avec suppression de l'autofluorescence (facteur correcteur $R=0.954$)

Nous remarquons dans le premier cas que la segmentation a détecté correctement la tumeur (si on ne tient pas compte des pixels voisins de la limite du site illuminé qui sont classifiés incorrectement pour les raisons évoquées précédemment [exemple 4 autofluorescence]).

Les paramètres quantitatifs attribués à la tumeur sont une intensité moyenne de 58 et une taille relative de 5.38%. Ceux du tissu sain sont une intensité moyenne de 35 et une taille relative de 42.67%. Le rapport des intensités de fluorescence TT/TS est alors de 1.66.

Comme la tumeur avait effectivement un signal d'autofluorescence plus important que celui du tissu sain, ce gain est ajouté à la fluorescence de la mTHPC pour nous donner une bonne classification de la tumeur. Dans ce cas, le rapport des intensités tumeur/tissu sain, ne reflète pas le rapport de concentration de mTHPC. L'erreur sera d'autant plus grande que le signal d'autofluorescence est important.

Dans le cas où nous supprimons l'autofluorescence (figure 3.3.7, $R=0.954$), la tumeur est toujours détectée mais une partie du tissu sain l'est également. Ce qui signifie que la mTHPC n'était pas retenue exclusivement par la tumeur, 48 heures après son injection.

Globi attribue à la tumeur une intensité de 16 et une taille de 16.57%. Le tissu sain est identifié avec une intensité de 8 et une taille de 31.48%. Le rapport des intensités TT/TS est alors de 2.

Il est évident d'après la figure 3.3.7 que les paramètres attribués à la tumeur sont en réalité ceux d'une zone à plus forte fluorescence que le reste. Donc l'algorithme nous permet de suivre la localisation de la mTHPC dans les tissus examinés. Si nous souhaitons vérifier la position de la tumeur, il est toujours possible de faire un diagnostic en autofluorescence (application de Globa).

Dans le cas du choix qualitatif (figure 3.3.7) le rehaussement de contraste a été réalisé dans la tumeur entre les régions à forte et à faible fluorescence. Ce qui permet de mieux les distinguer (en comparaison avec l'image de fluorescence de départ).

Exemple 3 (*na*)

Les spectres d'autofluorescence et de fluorescence induite de la tumeur et du tissu sain de la souris nude *na* 3 heures après l'injection de l'ALA sont respectivement donnés par les figure 3.3.8 et 3.3.9. Nous remarquons que le signal d'autofluorescence est plus important dans le tissu sain que dans la tumeur dans la figure 3.3.8 alors que d'après la figure 3.3.9 les deux sites ont la même intensité du signal d'autofluorescence.

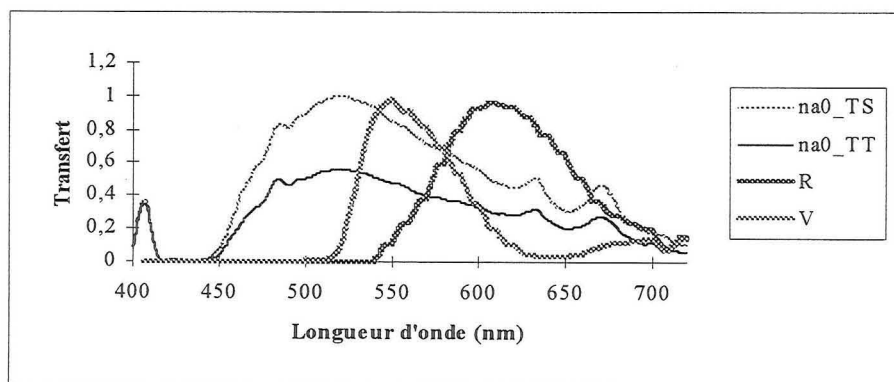


Figure 3.3.8. : Superposition des spectres d'autofluorescence de la tumeur et du tissu sain de la souris nude *na* (na0_TS : tissu sain; na0_TT : tissu tumoral)

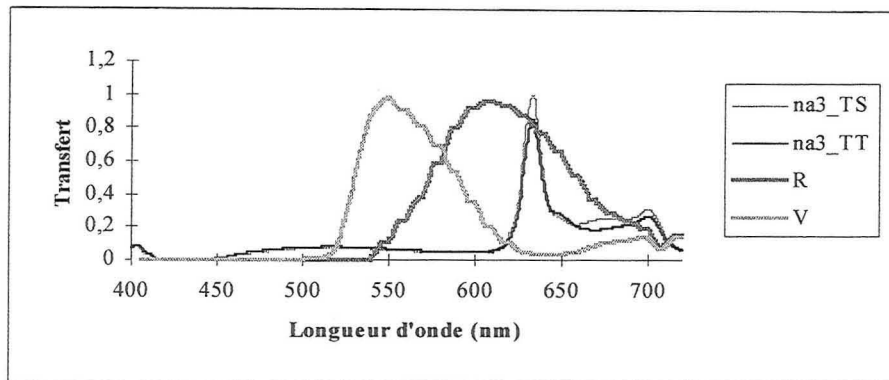


Figure 3.3.9. : Superposition des spectres de fluorescence de la tumeur et du tissu sain de la souris nude *na* 3 heures après l'injection de l'ALA (na3_TS : tissu sain; na3_TT : tissu tumoral)

L'intensité du signal de fluorescence de la PpIX (au delà de 600 nm) est très important devant celle de l'auto fluorescence. En plus, l'intensité de la fluorescence induite par la PpIX du tissu sain est légèrement plus importante que celle de la tumeur (figure 3.3.9).

A partir des spectres d'auto fluorescence de *na* et des réponses *RV* du système d'acquisition d'images, nous avons calculé le rapport de correction pour la suppression du signal d'auto fluorescence transmis par la composante rouge : $R=0.946$.

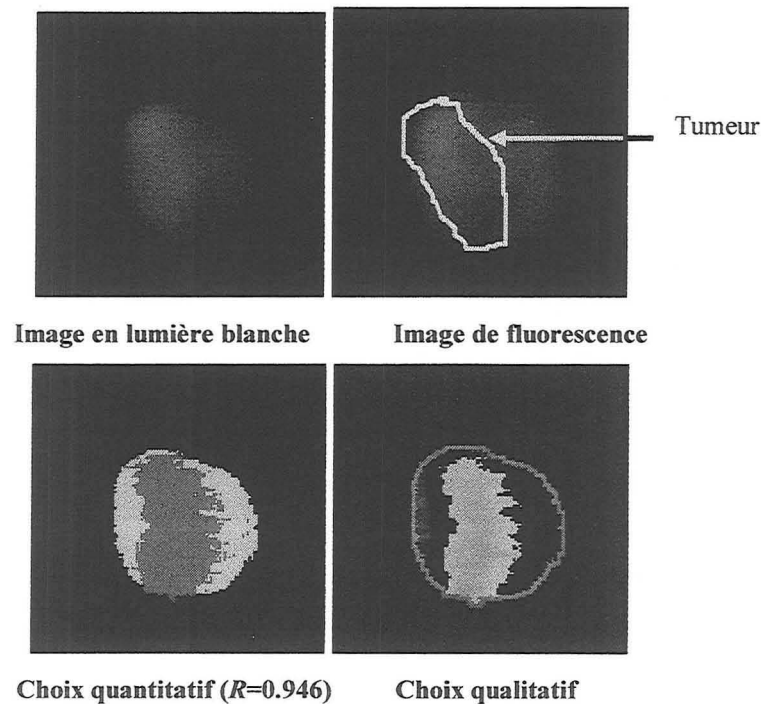


Figure 3.3.10 : Application de Globi sur les images en lumière blanche et de fluorescence de *na*, 3 heures après l'injection de l'ALA.

Les applications de Globi sur les images en lumière blanche et de fluorescence de *na* avec un choix quantitatif et qualitatif sont données dans la figure 3.3.10.

D'après cette figure la PpIX n'est pas préférentiellement retenue par la tumeur. Nous trouvons une région à faible fluorescence regroupant à la fois la tumeur et le tissu sain. Les paramètres quantitatifs fournis par Globi sont ; une première région avec une intensité moyenne de 83 et une taille de 8.7 % et une deuxième région avec une intensité moyenne de 61 et une taille de 11.4 % (ce qui correspond à un rapport de sélectivité de 1.3).

Exemple 4 (ra)

Les spectres d'auto fluorescence de la tumeur et du tiss sain vésicaux de la rate sont donnés dans la figure 3.3.11. Nous remarquons que l'intensité de fluorescence de la tumeur est légèrement plus faible que celle du tissu sain, et est caractérisée par la présence des porphyrines endogènes. Nous avons calculé à partir de ces spectres et des fonctions de transfert RV, la valeur moyenne du facteur correcteur pour la suppression de l'auto fluorescence ($R=1.1$).

Les spectres d'émission de fluorescence de la tumeur et du tissu vésical de la rate 8 heures après l'injection de l'ALA, sont représentés dans la figure 3.3.12 avec les fonctions de transfert RV du système d'acquisition. Nous voyons que la tumeur a une concentration plus importante de PpIX que le tissu sain. Après avoir multiplié ces spectres avec la fonction de transfert R (rouge) et intégré les deux spectres résultants, nous avons calculé le rapport de l'intégrale du spectre du tissu tumoral sur celui du tissu sain ($S_{TT}/S_{TS}=2.6$).

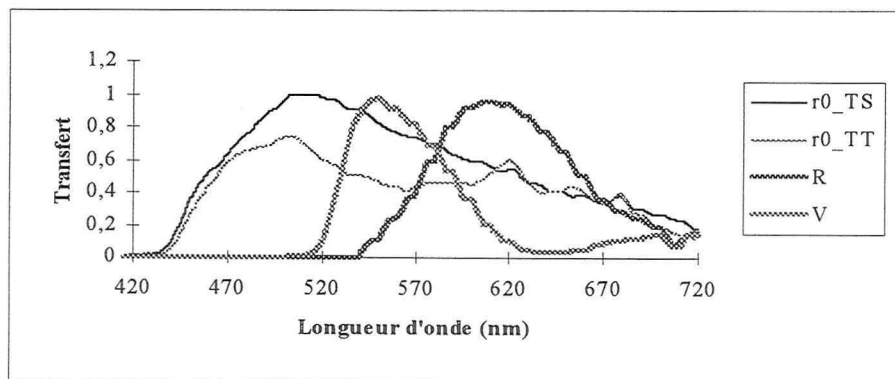


Figure 3.3.11. : Superposition des spectres d'auto fluorescence de la tumeur et du tissu sain de la rate *ra*
(ra0_TS : tissu sain; ra0_TT : tissu tumoral)

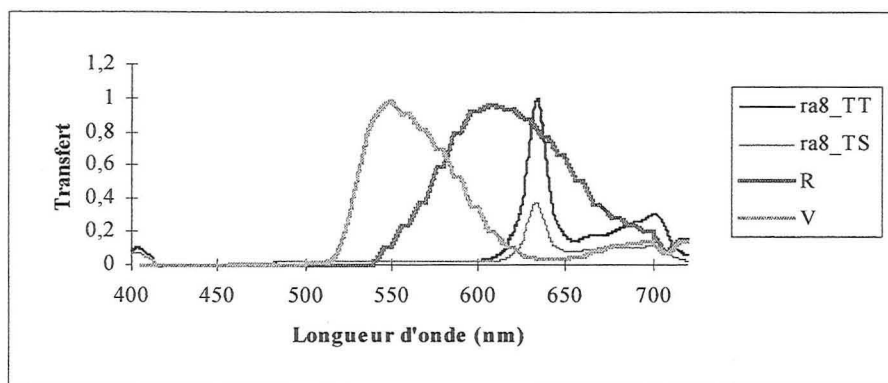


Figure 3.3.12. : Superposition des spectres de fluorescence de la tumeur et du tissu sain de la rate *ra* 8 heures après l'injection de l'ALA (ra8_TS : tissu sain; ra8_TT : tissu tumoral)

Les applications de Globi avec un choix quantitatif et qualitatif sur les images en lumière blanche et de fluorescence de *ra*, 8 heures après l'injection de l'ALA sont données dans la figure 3.3.13. Dans ce cas, la tumeur induit plus de PpIX que le tissu sain et l'algorithme permet de l'identifier avec une intensité moyenne de 28 et une taille relative de 10.23 %. Le tissu sain est identifié avec une intensité moyenne de 10 et une taille relative de 11.16 %. Le rapport d'intensité de la fluorescence induite entre tumeur et tissu sain est alors de 2.8. Cette valeur est proche de celle fournie à partir de l'analyse spectrale ($S_{TT}/S_{TS}=2.6$).

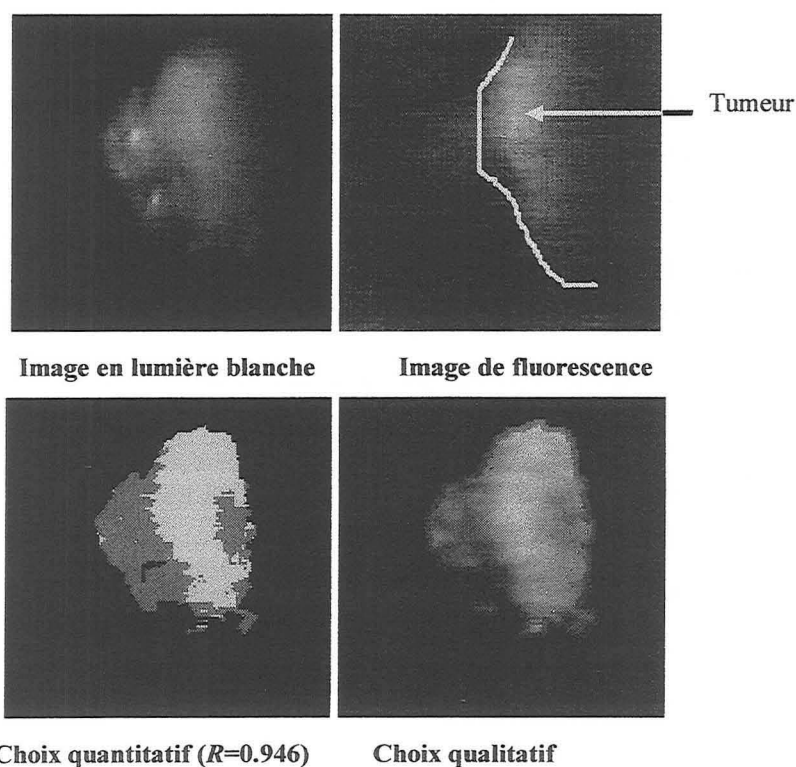


Figure 3.3.13 : Application de Globi sur les images en lumière blanche et de fluorescence de *ra*, 8 heures après l'injection de l'ALA.

Le succès de cette comparaison se comprend en voyant l'image de fluorescence d'entrée. En effet nous avons une homogénéité de la distribution du signal de fluorescence dans la tumeur et dans le tissu sain, et une bonne sélectivité de la drogue.

Dans le cas d'un choix qualitatif les contours de la zone fluorescente sont affichés en blanc. Il n'y a pas de rehaussement entre la tumeur et le tissu sain.

4. Application sur les lésions bénignes humaines

4.1. Introduction

Comme précédemment nous commençons par donner les résultats obtenus avec les algorithmes de traitement d'image conventionnels. Ensuite nous nous intéressons au test de Globa (cas du diagnostic par autofluorescence). Nous n'aurons pas l'opportunité de donner des exemples d'application de Globi puisque nous n'avons aucun modèle humain photosensibilisé.

Deux sites seront considérés pour l'application de Globa : une lésion du doigt et un naevus du bras. Un seul site fera l'objet d'applications pour les algorithmes de restauration, de rehaussement de contraste ou de contour et de segmentation.

4.2. Résultats obtenus avec les algorithmes de restauration de rehaussement de contraste ou de contour et de segmentation

4.2.1. Résultats obtenus avec les algorithmes de restauration

Les résultats de l'application du filtre Médian, du filtre de rang adaptatif de taille 5, du filtre de NAGAO et du filtre de WIENER sont donnés dans la figure 4.2.1.

D'après cette figure, il n'y a pas de différence entre le filtre Médian et le filtre de rang, à part une impulsion négative (point noir) produite par le filtre de rang 5 sur la partie supérieure de l'image. Le résultat du filtre de NAGAO semble s'approcher de celui des deux algorithmes précédents avec une diminution de la dynamique de l'image. Le filtre de WIENER ne semble pas modifier l'image de départ : le bruit est toujours présent.

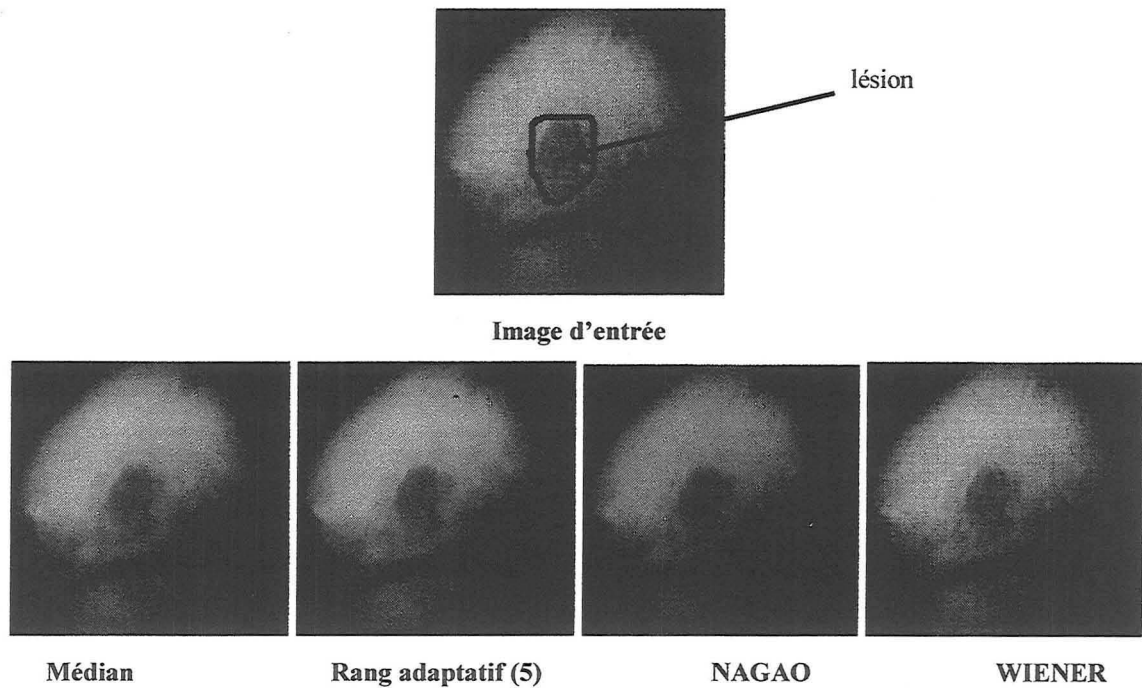


Figure 3.2.1.1 : Application des algorithmes de restauration sur l'image de fluorescence d'une lésion bénigne du doigt après expansion dynamique

Le rapport signal sur bruit a été calculé avant et après l'application de chaque algorithme (tableau 4.2.1.1). Le plus grand rapport est obtenu avec le filtre Médian. Le filtre de NAGAO est en deuxième position suivi du filtre de WIENER qui a le même rapport S/B que l'image de départ. Le filtre de rang adaptatif donne un rapport plus faible que celui de l'image d'entrée.

Algorithmes	Entrée	Médian	Rang adaptatif (5)	NAGAO	Wiener
S/B	36,69	80,74	21,89	42,09	36,69

Tableau 4.2.1.1 : Rapport signal sur bruit avant et après l'application des algorithmes de restauration sur la lésion du doigt

Le filtre Médian est à nouveau le plus intéressant.

4.2.2. Résultats obtenus avec les algorithmes de rehaussement de contours et de contraste

L'application des algorithmes de rehaussement de contraste ou de contour sur l'image de fluorescence de la lésion bénigne du doigt est donnée par la figure 4.2.2.1.

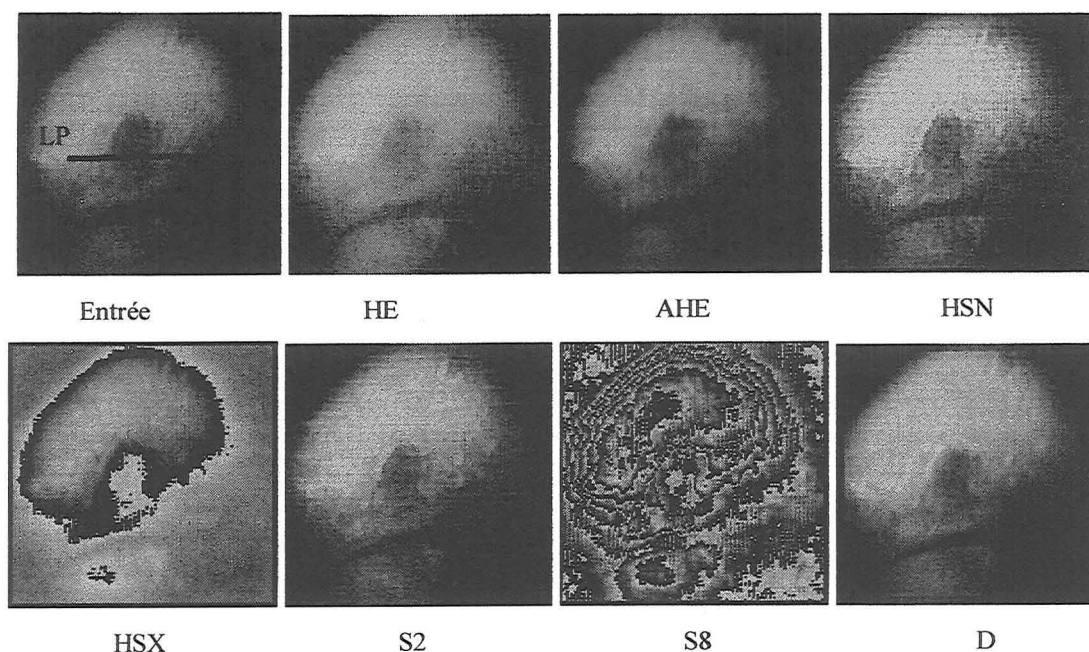


Figure 4.2.2.1 : Résultats du rehaussement de contraste sur une lésion bénigne du doigt
 (HE : Histogram Equalisation, AHE : Adaptative Histogram Equalisation, HSN : Histogram Shifting/Minimum, HSX :Histogram Shifting/Maximum, S2 : SOBEL à 2 directions, S8 : SOBEL à 8 directions, D : DERICHE, LP : LIGNE PROFIL)

Nous constatons que HSX apporte le plus grand contraste entre la lésion et la partie supérieure du doigt (ayant une excitation et une fluorescence maximale) et entre cette dernière et le fond. Le rehaussement produit par HE est global et ne permet pas de contraster la lésion par rapport au reste du tissu. AHE provoque un lissage qui produit un effet de flou. HSN et S2 rehaussent le signal et le bruit tout en préservant les contours. DERICHE produit un rehaussement apparemment équivalent à celui de HSN et S2 mais sans rehaussement du bruit (lissage). S8 crée de faux contours sur l'image (à cause de sa forte sensibilité au gradient des intensités dans toutes les directions).

Pour comparer le rehaussement produit par les deux algorithmes jugés visuellement les meilleurs (HSX et DERICHE), nous avons représenté dans la figure 4.2.2.2, la variation des intensités des deux images résultantes sur une ligne profil traversant la lésion. Cette ligne est montrée dans l'image originale de la figure 4.2.2.1.

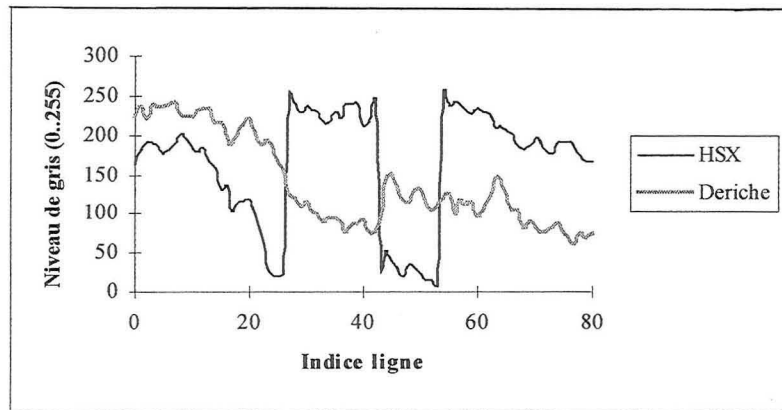


Figure 4.2.2.2 : Lignes profiles sur les images de la lésion du doigt après l'application de HSX (Histogram Shifting/Maximun) et du filtre de DERICHE.

Nous voyons que le rehaussement produit par HSX est meilleur que celui produit par DERICHE.

D'après ces résultats HSX est plus intéressant que les autres algorithmes de rehaussement de contraste et de contour.

4.2.3. Résultats obtenus avec les algorithmes de seuillage

Nous avons appliqué ISODATA et l'algorithme de seuillage par relaxation sur la lésion du doigt (figure 4.2.3.1), en utilisant les mêmes moyennes initiales pour les deux algorithmes (classes équidistantes).

D'après ces résultats, ISODATA distingue en plus du fond, deux classes dans la partie illuminée : la partie fortement illuminée donc à plus forte fluorescence et la lésion (illuminée de la même façon que la première région) avec le pourtour du doigt et la partie inférieure qui ne reçoivent pas suffisamment de lumière d'excitation. Donc l'algorithme a bien détecté les classes ayant une différence de fluorescence même si dans ce cas précis l'une des différences est due à un défaut d'illumination qui n'a pas été corrigé avant l'application de ISODATA.

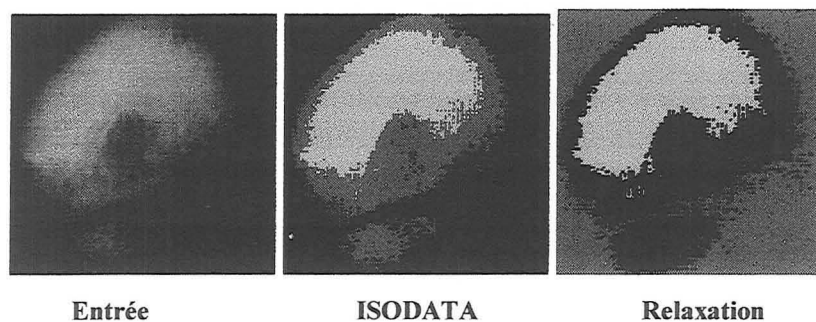


Figure 4.2.3.1 : Résultats de l'application des deux algorithmes de segmentation sur l'image de fluorescence de la lésion du doigt.

Le seuillage par relaxation n'apporte aucune amélioration par rapport à ISODATA (même classification). Compte tenu de la rapidité de ISODATA, nous pouvons dire à nouveau qu'il est préférable à l'algorithme de relaxation.

4.3. Résultats obtenus avec l'algorithme global de traitement d'images en autofluorescence (Globa)

Nous avons appliqué GLOBA sur les images de fluorescence et en lumière blanche de la lésion du doigt et d'un naevus du bras avec des choix quantitatifs et qualitatifs.

Dans le cas d'un choix quantitatif, nous présenterons à nouveau trois étapes de traitement :

- étape 1 : segmentation de l'image en lumière blanche,
- étape 2 : correction de l'image de fluorescence par rapport à l'illumination (division de l'image de fluorescence par l'image en lumière blanche),
- étape 3 : segmentation de l'image de fluorescence en trois classes.

Exemple 1

Le résultat de l'application de Globa avec un choix quantitatif pour la lésion du doigt est donné par la figure 4.3.1.

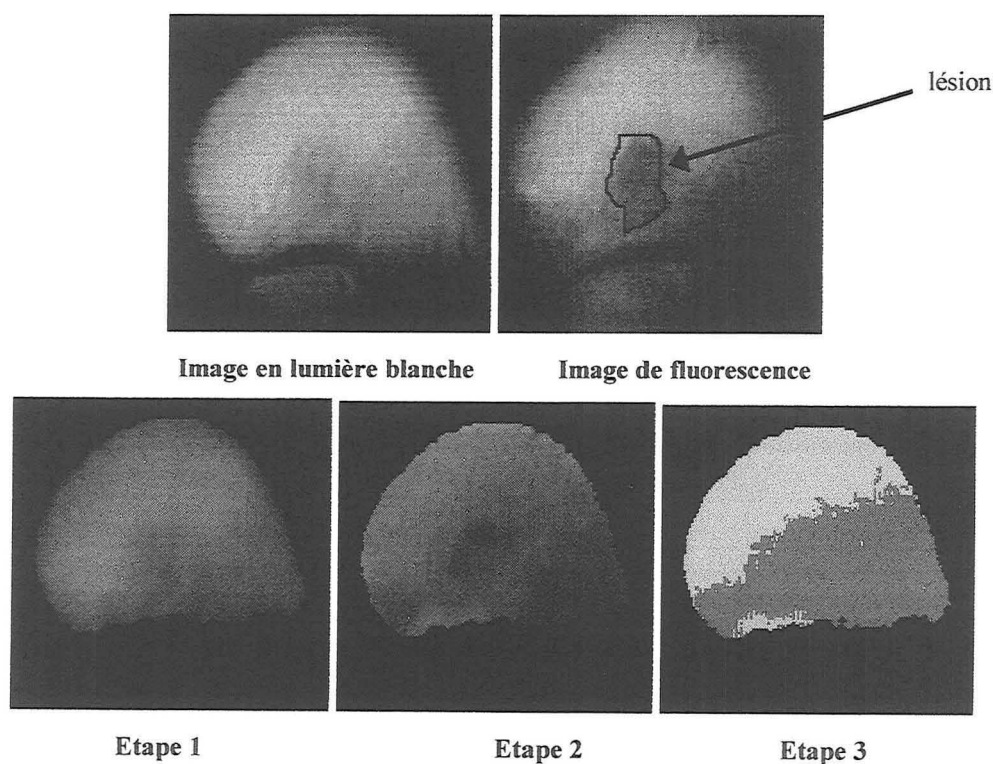


Figure 4.3.1 : Application de sur les images de fluorescence et en lumière blanche de la lésion du doigt avec un choix quantitatif.

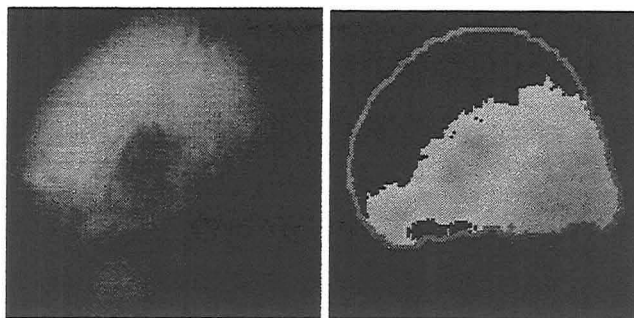


Image de fluorescence d'entrée après expansion dynamique Résultat de Globa (choix qualitatif)

Figure 4.3.2 : Application de Globa sur les images de fluorescence et en lumière blanche de la lésion du doigt avec un choix qualitatif.

A la première étape, une partie du doigt (trop sombre) a été classée avec le fond dans l'image en lumière blanche, ce qui s'est répercuté à la deuxième étape dans l'image de fluorescence.

A la deuxième étape, les parties latérales proches de la lésion auraient dues être rehaussées après division de l'image de fluorescence avec l'image en lumière blanche de façon à atteindre un niveau voisin de celui de la région supérieure du doigt. Ce qui n'a pas été le cas car l'atténuation du signal de réflexion ne varie pas de la même manière que le signal de fluorescence. La raison de cette différence est due au fait que nous travaillons dans une zone limite (faible excitation-faible sensibilité) de telle sorte que dès que l'excitation diminue légèrement, nous ne nous trouvons plus dans la zone linéaire de la réponse en puissance du dispositif d'imagerie.

Il en résulte une mauvaise classification des parties latérales du doigt avec la lésion.

Avec un choix qualitatif (figure 4.3.2) un rehaussement de contraste important se produit entre la lésion et les parties voisines peu fluorescentes, et la partie supérieure du doigt.

Exemple 2

L'application de Globa avec les images du naevus est donnée dans la figure 4.3.3 avec un choix quantitatif et dans la figure 4.3.4 avec un choix qualitatif.

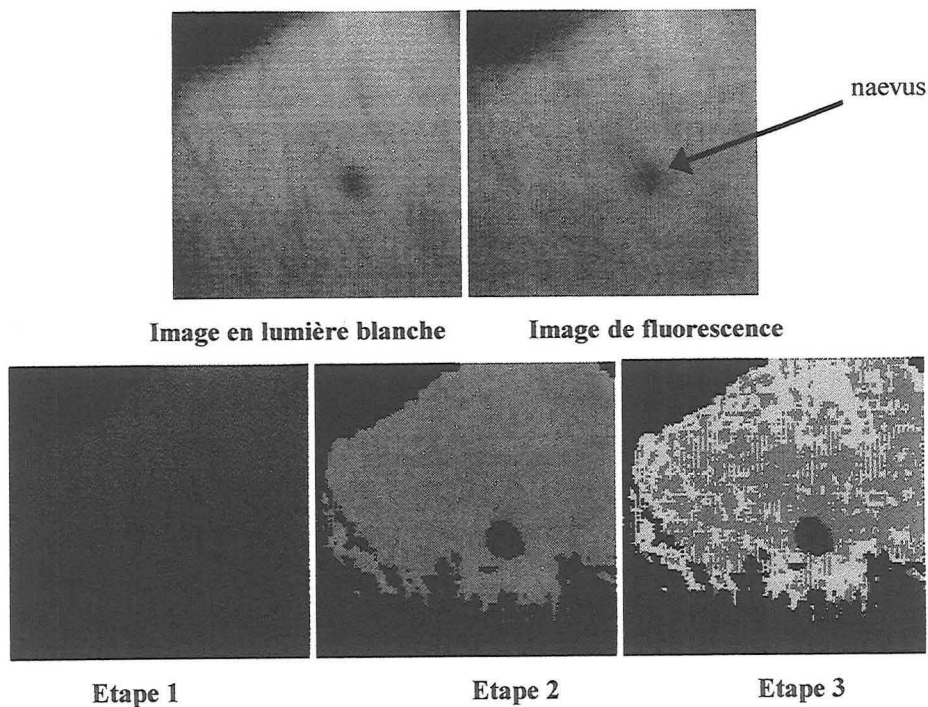


Figure 4.3.3 : Application de Globa sur les images de fluorescence et en lumière blanche d'un naevus du bras avec un choix quantitatif

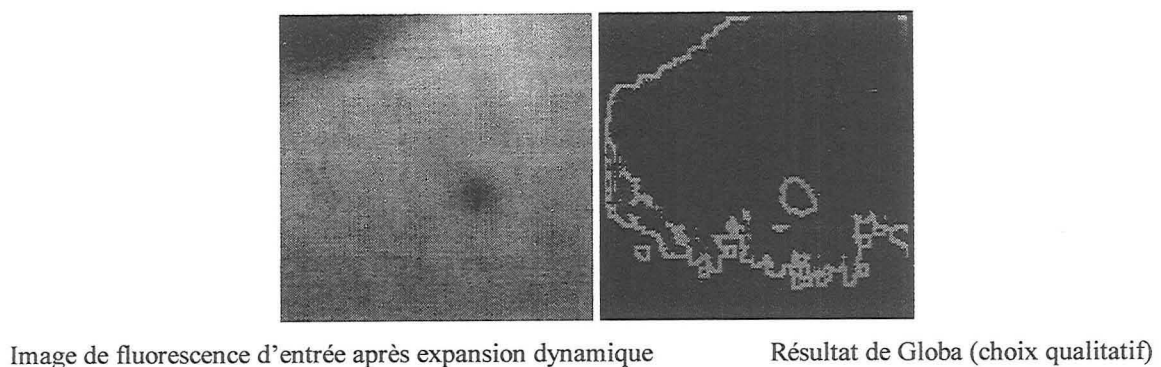


Figure 4.3.4 : Application de Globa sur les images de fluorescence et en lumière blanche d'un naevus du bras avec un choix qualitatif.

Dans la figure 4.3.3, le naevus est visible dans l'image en lumière blanche. Il l'est également dans l'image de fluorescence.

A la première étape de traitement le naevus est classé avec le fond car il est trop sombre. Remarquons qu'il devient plus gros. Ceci est dû au filtrage de l'image en lumière blanche (filtre Médian). Le naevus se retrouve à nouveau dans le fond dans l'image de fluorescence (intensité nulle). Dans l'étape de segmentation, l'algorithme cherche les deux classes restantes (tissu sain et tumeur) mais comme le naevus est déjà classé avec le fond, les deux classes seront quant même détectées dans le reste du tissu illuminé (l'algorithme est forcé de

trouver deux autres classes). Mais dans l'image résultante, il semble évident selon la texture des deux classes qu'il s'agit d'une aberration algorithmique.

Il existe des algorithmes de seuillage qui ne nécessitent pas la connaissance du nombre de classes. Ce qui nous permettra d'éviter ce genre de situations. C'est le cas de la méthode de BHATTACHARYA (partie III, 2.3.1.3). Cependant après l'avoir testée nous avons constaté qu'elle était trop sensible aux moindres variations de l'histogramme ce qui provoque une surestimation du nombre réel de classes.

Dans le cas de l'application de Globa avec un choix qualitatif (figure 4.3.4) l'algorithme (HSX) affiche le contour du tissu illuminé ainsi que le celui du neavus en blanc. Ce qui est prévisible compte tenu des propriétés de HSX (partie III, 2.2.2.6).

5. Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons appliqué les algorithmes de restauration, de rehaussement de contraste ou de contour et de segmentation sur des images de fantômes simulant les tissus sains et les tissus pathologiques. Certains algorithmes (segmentation) ont également été appliqués sur des images semi-virtuelles et virtuelles.

Nous avons constaté que le filtre Médian donne généralement les meilleurs résultats (rapport signal sur bruit, durée d'exécution et qualité visuelle). Dans certains cas, le filtre de NAGAO est meilleur mais sa durée d'exécution est la plus longue. Nous avons donc sélectionné le filtre Médian pour le filtrage de l'image en lumière blanche et de fluorescence. HSX (décalage d'histogramme vers les grandes intensités) est le meilleur algorithme de rehaussement de contraste car il produit un contraste maximal et local entre les régions à faible et forte fluorescence. En plus, sa durée d'exécution est faible (deuxième position parmi les autres algorithmes). Par conséquent, il est sélectionné pour le rehaussement de contraste dans les algorithmes globaux pour choix qualitatif.

La qualité de la segmentation par ISODATA est proche de celle de l'algorithme de relaxation. Nous avons vu deux cas où l'algorithme de relaxation détecte avec plus de finesse que ISODATA les régions de fortes fluorescence (souris *hh* et *hm*). Cependant dans certains cas, la relaxation échoue alors que ISODATA détecte correctement les classes recherchées. Comme par ailleurs, ISODATA est le plus rapide, c'est lui qui a été sélectionné pour la segmentation dans les algorithmes globaux.

Ces trois choix sont donc insérés dans les algorithmes globaux Globa (autofluorescence) et Globi (fluorescence induite).

L'application de Globa et de Globi sur des images virtuelles et semi-virtuelles de fantômes à base de photosensibilisant, nous a permis de connaître la sensibilité de ces algorithmes du point de vue taille minimale et gradient minimal d'intensité détectables. La précision des résultats quantitatifs a également été vérifiée, connaissant les paramètres quantitatifs des images de départ. Nous avons également pu retrouver les concentrations en photosensibilisant à partir des intensités fournies et les équations des réponses du système d'acquisition.

D'autres exemples sur des images réelles de fantômes à base de fluorescéine et de mTHPC ont également été donnés, prouvant un succès visuel des deux algorithmes mais sans corrélation avec des quantités de concentration des photosensibilisants.

Nous avons également présenté les résultats obtenus sur des images *in-vivo* de souris et d'une rate avec ou sans photosensibilisants (ALA, HpD, mTHPC). Les algorithmes globaux distinguent les zones à faible et forte fluorescence mais ces derniers ne correspondent pas forcément aux mesures spectrales ; en particulier si la fluorescence n'est pas homogène dans la tumeur et le tissu sain.

(Les mesures spectrales sont effectuées sur la tumeur et le tissu sain qu'on voit en lumière ambiante et non dans les régions à forte et faible fluorescence car nous ne les voyons pas. Il est donc plus intéressant de se laisser guider par les images de fluorescence pour positionner la sonde du spectrofluorimètre à des endroits représentatifs de l'ensemble des deux sites.)

Nous avons cependant rencontré un cas où les fluorescences de la tumeur et du tissu sain sont homogènes : le résultat fourni par l'analyse d'images est proche de celui obtenu à partir des spectres de fluorescence.

Nous avons également donné des exemples d'application sur des lésions humaines bénignes. Nous avons vu le cas où la lésion est classée avec le fond (neavus) car elle était visible en lumière blanche. Et l'algorithme (Globa) forcé à chercher deux autres classes donne une mauvaise segmentation du tissu sain (deux classes). Cette erreur peut être supprimée en choisissant un algorithme de segmentation qui ne demande pas une connaissance à priori du nombre de classes.

La deuxième application était également un échec à cause des conditions limites de mesure (excitation-sensibilité).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

L'imagerie de fluorescence est en train de devenir un outil diagnostique pour les tumeurs précoces. Cependant, la plupart des outils développés sont encore au stade expérimental et présentent encore certains obstacles pour être utilisés avec un endoscope.

Nous avons l'objectif de développer un système d'imagerie de fluorescence peu encombrant et adaptable à un outil endoscopique.

L'étude que nous avons réalisée peut être divisée en deux parties. La première partie concerne la mise au point d'une instrumentation à base de modules existants, ainsi que l'élaboration des programmes de contrôle et de commande des tâches à exécuter.

La deuxième partie porte sur le développement du logiciel qui pilote le système d'imagerie et qui doit s'adapter aux deux cas diagnostiques : avec et sans photosensibilisant.

Le système développé comprend une source de lumière blanche et une source LASER qui sont couplées et alternées par un module optique motorisé. A la sortie de ce module, une fibre optique permet d'illuminer le site examiné soit en lumière blanche soit avec le LASER. Il en résulte respectivement une image en lumière blanche et une image de fluorescence du site. L'acquisition par une caméra couleur et la visualisation de ces images après digitalisation, est synchronisée avec ces deux excitations. Le système global permet donc d'acquérir et de visualiser successivement, l'image de fluorescence et l'image en lumière blanche d'un même site sur le même écran. La fréquence d'acquisition n'est pas contraignante pour le traitement. En effet, au cours de l'examen des sites dynamiques (modèle murin et modèle humain), l'image en lumière blanche est superposable à l'image de fluorescence.

L'application *in-vivo* du dispositif d'imagerie est limitée aux sites externes et ceci pour les raisons suivantes :

- la faible sensibilité de la caméra (13 lx),
- pertes de puissance dans le module optique (entre la source LASER et la cible et entre la cible et le détecteur).

En effet pour compenser la faible sensibilité de la caméra nous avons essayé d'augmenter le signal de fluorescence en augmentant la puissance d'excitation. Nous avons donc travaillé dans les conditions optimales de puissance. Cependant les pertes de puissance dans le module optique limitent l'irradiance maximale en sortie de fibre à 20 mW/cm^2 (d'après la littérature nous pouvons aller jusqu'à 50 mW/cm^2 , sans provoquer de phénomènes de

photobleaching de la drogue). Par ailleurs l'utilisation d'un outil endoscopique atténue le signal de fluorescence reçu par le capteur ce qui a limité les applications endoscopiques aux fantômes. Ces pertes sont moins importantes avec un objectif standard que nous pouvons employer pour les sites directement accessibles.

Dans le deuxième volet de cette étude, nous avons mis au point deux algorithmes de traitement d'image adaptés au diagnostic par autofluorescence et par fluorescence induite. Dans ce deuxième cas diagnostique, nous avons considéré l'exemple de la mTHPC de l'HpD et de l'ALA. Le diagnostic peut se faire dans un but qualitatif ou quantitatif.

Ces programmes font appel à des algorithmes conventionnels de restauration, de rehaussement de contraste ou de contour et de segmentation.

Les algorithmes donnent de bons résultats et permettent d'identifier deux zones ayant une différence de fluorescence dont le seuil minimal est de 1 niveau de vert ou de rouge. La taille minimale d'une région est de 9 pixels. Les résultats obtenus en imagerie sont corrélés avec ceux obtenus à partir de l'analyse spectrale dans le cas où les sites à différencier sont caractérisés par un signal de fluorescence plus ou moins homogène.

Les algorithmes globaux échouent lorsqu'il n'y a pas de lésion et lorsque l'atténuation de la lumière d'excitation est trop importante (zone non linéaire de la réponse en puissance du dispositif d'imagerie).

PERSPECTIVES

Compte tenu des limites du système d'imagerie de fluorescence décrit ci-dessus, certaines perspectives sont envisagées sur plusieurs plans :

excitation-émission

Tout d'abord la puissance de la source d'excitation n'est pas suffisante pour générer un signal de fluorescence détectable par la caméra via le cystoscope. Ceci peut être résolu en remplaçant le LASER Krypton par une source plus puissante (figure 1) et/ou en remplaçant la caméra par une autre plus sensible. Dans le premier cas, nous pouvons observer la saturation du signal d'autofluorescence tout en restant en dessous ou dans les limites inférieures de la sensibilité de la caméra. Donc il est possible que cette solution n'apporte qu'une faible amélioration.

La deuxième solution est la meilleure à priori. Dans ce dernier cas, il est intéressant d'opter pour une caméra tri-CCD pour laquelle les filtres RVB seront individualisés et adaptés[150].

Ainsi le filtre de la composante bleue sera un passe-haut dont la fréquence de coupure est légèrement au dessus de celle du faisceau d'excitation de façon à pouvoir mesurer l'excitation rétro-diffusée (affaiblie). Ceci serait exploité à des fins de normalisation des mesures par rapport à l'excitation de façon à fournir des valeurs absolues.

Encombrement

Le LASER est une source encombrante qui limite les possibilités de déplacement du système d'imagerie. En effet, il faut toujours se placer à proximité de la source. Plus la distance est grande plus les pertes de puissances dans la fibre sont importantes. Il est donc préférable de remplacer le LASER par une source compacte.

Il peut s'agir, à titre d'exemple, d'une source Xénon 1000 Watt à filament court pour éviter qu'il y ait beaucoup de pertes lors de la focalisation sur la fibre optique. Une telle source permet d'obtenir une puissance beaucoup plus importante que celle fournie à l'entrée du module optique. Considérons à titre d'exemple celle proposée par la société Equipement Scientifiques (figure 1), pour laquelle la puissance émise à 400 nm est aux environs de 240 mW.

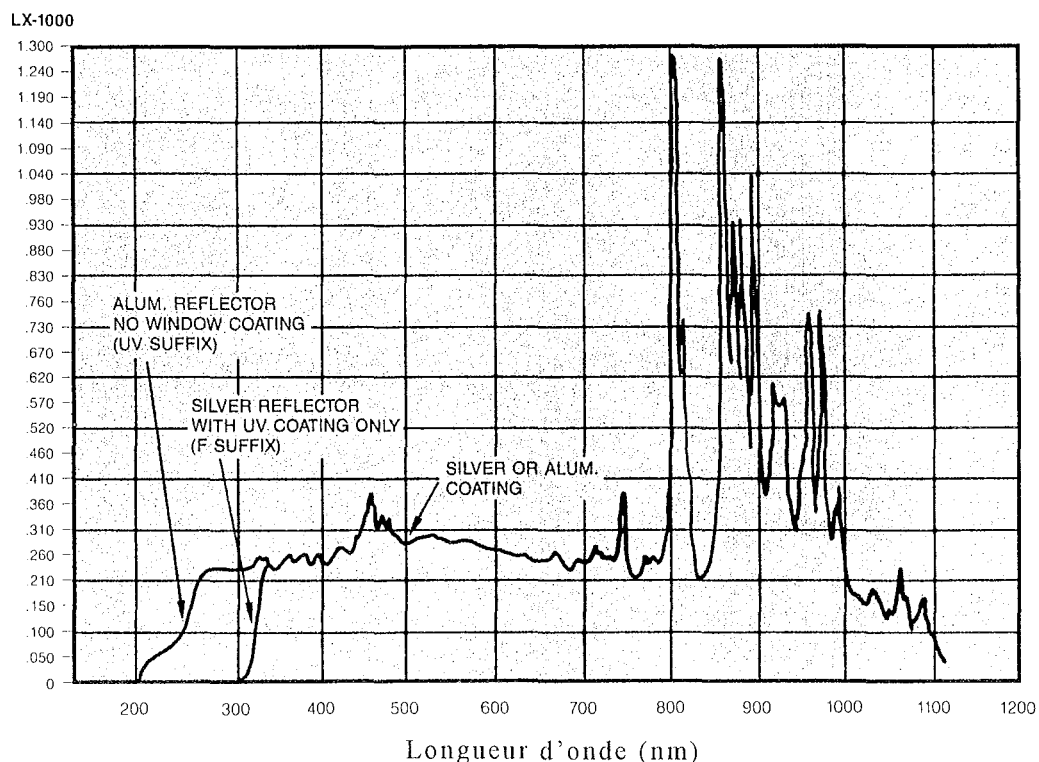


Figure 1 : Distribution spectrale de la lampe Xénon CERMAX- Société Equipement Scientifiques

La source de lumière peut également être pulsée (flash), ce qui permet d'avoir des énergies importantes en un court laps de temps. Cette solution est intéressante car elle permet d'éviter une longue exposition du site ce qui réduit le photoblanchiment.

Une telle source doit être associée à une caméra obturable, qui permet d'acquérir l'image pendant la durée du flash. Si en plus la caméra a un déclenchement ultra-rapide, l'imagerie de fluorescence pourra se faire dans les nanosecondes suivant l'excitation, ce qui permet une étude résolue dans le temps[67][36][47].

La longueur d'onde d'excitation sera facilement choisie par l'interposition de filtres. Il est même possible de sélectionner deux ou plusieurs longueurs d'onde distinctes et comparer les résultats obtenus respectivement avec chacune d'elles. Le choix des longueurs d'onde se fera en fonction des paramètres spectraux des fluorophores ou des composants absorbants (hémoglobine) et l'étude à plusieurs excitations permettra de les isoler et de les identifier.

Il nous paraît intéressant d'utiliser différentes puissances d'excitation, pour une longueur d'onde donnée, de façon à estimer la profondeur de la lésion. Nous avons mené dans ce cadre, une étude théorique préliminaire dont l'objectif est d'obtenir une image de fluorescence à trois dimensions. [annexe 3D]

Par ailleurs, une source unique de lumière blanche peut être exploitée à la fois pour induire la fluorescence avec un filtre passe-bas et pour illuminer le site avec un filtre atténuateur. Ce dernier filtre est nécessaire car cette puissance est trop importante pour l'éclairage standard. Les deux filtres seront alors placés dans une roue motorisée, laquelle sera disposée devant la source Xénon ou plus précisément devant le module de focalisation de la source Xénon. Pour doubler la vitesse de changement de l'excitation (passage de la lumière blanche atténuée à la lumière filtrée), nous pouvons fractionner le filtre atténuateur et le filtre passe-bas et alterner deux filtres (figure 2).

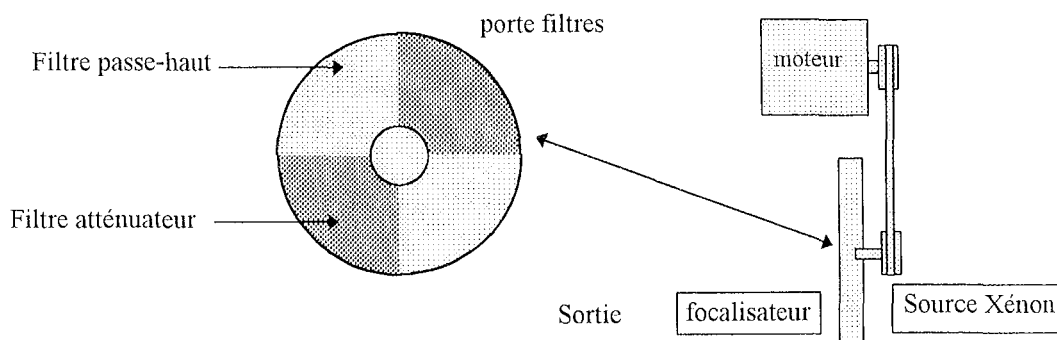


Figure 2 : Module optique

Fréquence d'acquisition et d'affichage

La fréquence d'acquisition et d'affichage est limitée d'une part par la caméra qui ne possède pas une entrée de déclenchement et d'autre part par la vitesse limitée du moteur pas à pas. En remplaçant la caméra par une autre possédant le signal de déclenchement, l'acquisition d'une image sera immédiate après le signal de commande. D'autre part, l'utilisation d'un obturateur électronique résoudra le problème de la lenteur d'entraînement mécanique.

Spectroscopie

Nous avons vu qu'il n'est pas toujours possible de corrélérer les résultats de l'analyse spectrale aux résultats de l'imagerie principalement à cause du choix aléatoire des points de mesures dans l'analyse spectrale. Cet inconvénient pourrait être éliminé en associant l'imagerie de fluorescence à la spectroscopie en temps réel.

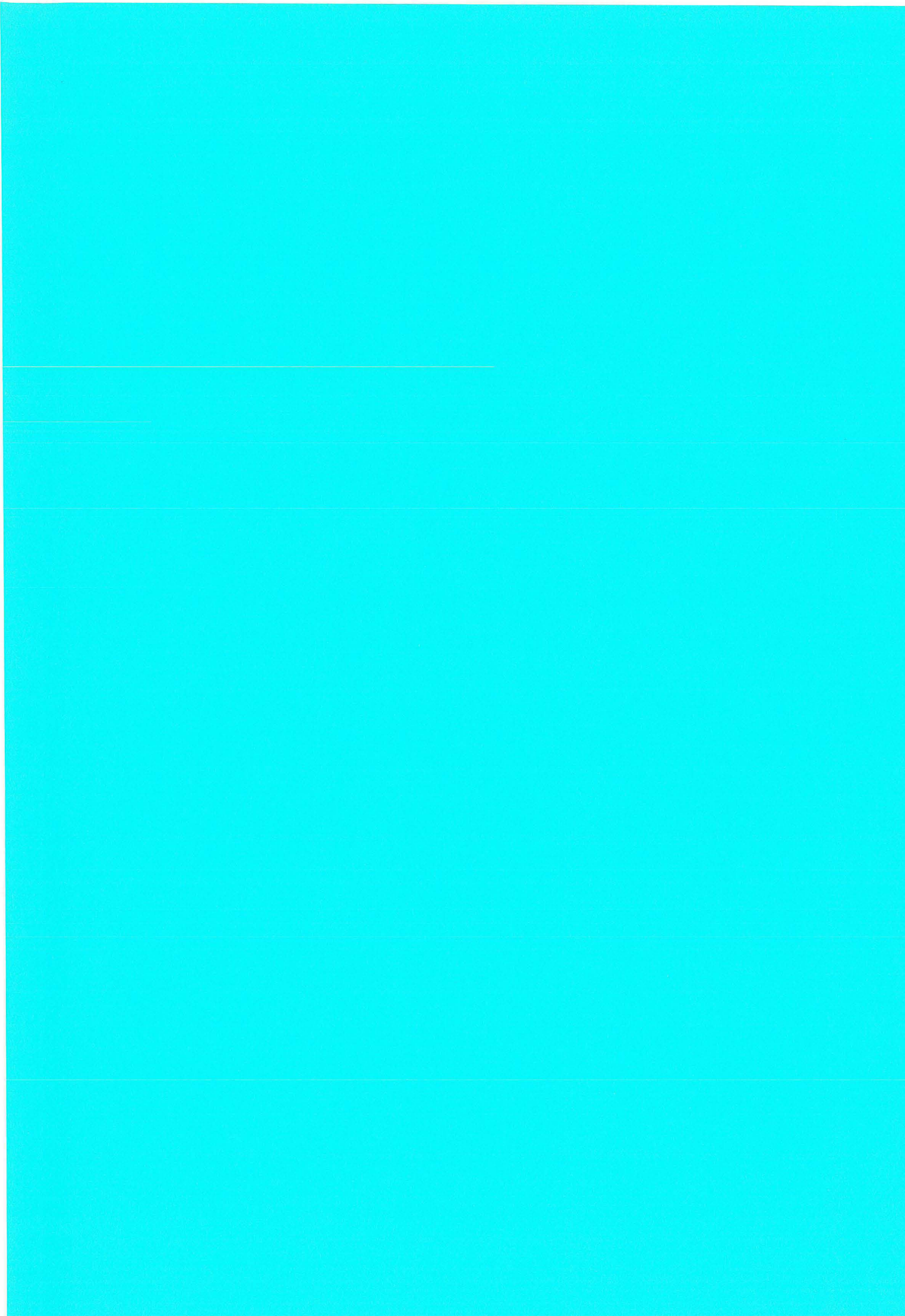
Le changement d'échelle des spectres de fluorescence basé sur la puissance rétrodiffusée influence la mesure pour une excitation à 410 nm car à cette longueur d'onde la différence d'absorption entre tissus sains et tissus pathologiques entre en jeu. Il nous paraît intéressant d'alterner deux excitations durant l'analyse spectrale, tout en intégrant les deux mesures sur un même spectre. La deuxième excitation aura une longueur d'onde qui ne se confondra pas avec l'une des longueurs d'onde d'absorption des tissus (Partie I chapitre 3, 2.2) mais avec une puissance si faible, que la fluorescence qui en résulte ne soit pas détectée par le spectrofluorimètre. Ainsi dans le spectre de fluorescence global, nous aurons deux pics d'excitation et un seul signal de fluorescence correspondant à l'un des pics. La normalisation se fera par rapport au pic neutre et l'étude de la variation de l'intensité du vrai pic d'excitation nous renseignera sur l'absorption du site.

Traitement d'images

En ce qui concerne la suppression du signal d'autofluorescence pour quantifier la drogue retenue par le site, nous avons remarqué que le facteur correcteur R/V était plus important dans la tumeur que dans le tissu sain. La différence étant principalement due à la présence des porphyrines endogènes dans la tumeur. Nous avons choisi d'utiliser une valeur moyenne pour la tumeur et le tissu sain, car ce traitement (soustraction) se fait avant l'identification des deux classes. Il est possible d'itérer ce processus : après la phase segmentation, refaire la suppression du signal d'autofluorescence avec des facteurs correcteurs différents (ceux obtenus lors de l'analyse spectrale); la segmentation résultante sera différente de la première; le processus se terminera lorsqu'il n'y aura pas de différence entre deux segmentations successives).

Nous avons vu que la segmentation par ISODATA donne de bons résultats mais elle demande la connaissance à priori du nombre de classes à chercher. Ce qui pose parfois un problème. Il semble important de trouver un bon algorithme de segmentation qui ne nécessite aucune connaissance à priori. La méthode de BHATTACHARYA[87] pourrait être exploitée mais après un prétraitement judicieux de l'histogramme (appliquer par exemple un filtre puis l'approche hybride[86] pour améliorer la séparabilité des classes dans l'histogramme).

Les applications que nous avons considérées sont principalement basées sur l'utilisation de l'objectif standard de la caméra. Dans le cas de l'utilisation d'un outil endoscopique, il est important de tenir compte des déformations géométriques introduites par l'angle d'ouverture important des lentilles de ces outils. Ces déformations se traduisent par la compression des pixels périphériques. Leur correction peut se faire par traitement d'images selon l'une des techniques proposées dans la littérature. Ces corrections sont particulièrement préconisées pour une mesure correcte de la taille des lésions qui joue un rôle important dans l'orientation vers le bon diagnostic et par conséquent, vers une meilleure approche thérapeutique.[142] [143] [144] [145] [146]



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] BRAICHOTTE, D., WAGNIERES, G., MURDY, A., FONTOLLIET, C., MONNIER, P., VAN DEN BERG, H. *A clinical comparison of pharmacokinetics of m-THPC and PhotofrinII as observed by light induced fluorescence*. Proceeding of Optical Biopsy. 1993, p. 62-73, SPIE.
- [2] BRAICHOTTE, D., SAVARY, J. F., GLANZMANN, T., WESTERMANN, P., FOLLI, S., WAGNIERES, G., MONNIER, P., VAN DEN BERG, H. *Clinical pharmacokinetic studies of tetra (meta-Hydroxyphenyl)Chlorin in squamous cell carcinoma by fluorescence spectroscopy at 2 wavelength*. Int. J. Cancer. 1995, vol. 63, p. 168-204.
- [3] BONNETT, R., WHITE, R. D., WINFIELD, U. J., BERENBAUM, M. C. *Hydroporphyrins of meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers*. Biochem. J., 1989, vol. 261, p. 277-280.
- [4] RICHTER, A., CERRUTI-SOLA, S., STERNBERG, E. D., DOLPHIN, D., LEVY, J. G. *Biodistribution of tritiated benzoporphyrin derivative (3H-BPD-MA), a new potent photosensitizer, in normal and tumor-bearing mice*. J. Photochem. Photobiol. 1990, vol B Biol. 5, p. 231-244.
- [5] EVRARD, S., APRAHAMIAN, M., MIEHE, J., DAMGE, C., SULTAN, R., MARESCAUX, J. *La thérapie photodynamique en chirurgie digestive oncologique*. La presse médicale, 1991, vol. 20 n°. 38, p.1892-1898.
- [6] PROFIO, A. E. *Review of fluorescence diagnosis using porphyrins*. SPIE Laser surgery : Characterization and therapeutics. 1988, vol. 907 p. 150-156.
- [7] MANYAK, M. J., RUSSO, A., SMITH, P. D., GLATSTEIN, E. *Photodynamic therapy*. Journal of clinical oncology, 1988, vol. 6, N° 2 p. 380-391.
- [8] BONNETT, R. *New photosensitizer for the photodynamic therapy of tumours*. SPIE, 1994, vol. 2078 p. 74-90.
- [9] KÖNIG, K., KIENLE, A., BOEHNCKE, W.H., KAUFMANN, R., RUCK, A., MEINER, T., STEINER, R. *Photodynamic tumor therapy and on-line fluorescence spectroscopy after ALA administration using 633-nm light as therapeutic and fluorescence excitation radiation*. Optical Engineering. 1994, vol. 33, N° 9, p.2945-2952.
- [10] 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 protoporphyrin IX fluorescence for basal cell carcinoma after topical application of 5-aminolevulinic acid : implications for photodynamic treatment*. Arch Dermatol. 1995, Res 287, p. 665-674.

- [11] BOYLES, R. W., DOLPHIN, D. *Structure and biodistribution relationship of photodynamic sensitizers*. Photochemistry and photobiology. 1996, vol. 64 (3), p. 469-485.
- [12] ANDERSSON-ENGELS, S., KLINTEBERG, C., SVANBERG, K., SVANBERG, S. *In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics*. Phy. Med. Biol. 1997, vol. 42, p. 815-824.
- [13] KRIEGMAIR, M., BAUMGARTNER, R., KNUECHEL, R., STEINBACH, P., EHSAN, A., LUMPER, W., HOSFSTÄDTER, F., HOFSTETTER, A. *Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid*. Urology. 1994, vol. 44, N°. 6, p. 836-841.
- [14] HE, X. Y., JACQUES, S. L., GOFSTEIN, G. *Effectiveness of photosensitive dye during uptake and redistribution*. SPIE, Optical methods for tumor treatment and detection. 1992, vol. 1645, p. 205-215.
- [15] BRAULT, D. *Molecular aspects in tumor photochemotherapy*. Lasers in medical science. 1988, vol. 3:41, p. 41-45.
- [16] ANDERSSON-ENGELS, S., WILSON, BC. *In vivo fluorescence in clinical oncology: fundamental and practical issues*. J Cell Pharmacol. 1992, vol. 3 p. 66-79.
- [17] 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. 1993, vol. 8 : 127-132.
- [18] SCHOMACKER, K. T., FRISOLI, J. K., COMPTON, C. 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. 1992, vol. 12, p. 63-78.
- [19] BEUTHAN, J., BOCHER, T., MINET, O., ROGGAN, A., SCMITT, I., WEBER, A., MÜLLER, G. *Investigations concerning the determination of NADH-concentrations using optical biopsy*. SPIE. 1994, vol. 2135, p.147-156.
- [20] RAMANUJAM, N., MITCHELL, M. M., MAHADEVAN, A., WARREN, S., THOMSEN, S., SILVA, E. *In vivo diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser-induced fluorescence*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1994, vol. 91, p. 10193-10197.
- [21] RAMANUJAM, N., MITCHELL, M. F., MAHADEVAN, A., THOMSEN, S., SILVA, E., RICHARDS-KORTUM, R. *Fluorescence spectroscopy : a diagnostic tool for cervical intraepithelial neoplasia (CIN)*. Gynecologic oncology. 1994, vol. 52, pp. 31-38.

- [22] RAVA, R. P., RICHARDS-KORTUM, R., FITZMAURICE, M., COTHREN, R., SIVAK, M., LEVIN, H., FELD, M. S. *Early detection of dysplasia in colon and bladder tissue using laser induced fluorescence*. SPIE Optical Methods for Tumor Treatment and Early Diagnosis : Mechanisms and techniques. 1991, vol. 1426 p.68-78.
- [23] DHINGRA, J. K., PERRAULT, D. F., MCMILLAN, K., REBEIZ, E. E., KABANI, S., ANOHARAN, ITZKAN, I., FELD, M. S., SHAPSHAY, S. M. *Early diagnosis of upper aerodigestive tract cancer by autofluorescence*. Arch. Otolaryngol Head Neck Surg. 1996, vol. 122, p. 1181-1186.
- [24] 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. 1994, vol. 82, p. 33-41.
- [25] ANIDJAR, M., CUSSENOT, O., BLAIS, J., BOURDON, O., AVRILLIER, S., ETTORI, D., VILLETTE, J.-M., FIET, J., TEILLAC, P., LE DUC, A. *Argon laser induced autofluorescence may distinguish between normal and tumor human urothelial cells : a microspectrofluorometric study*. The journal of urology. 1996, vol. 155, p. 1771-1774.
- [26] KOHEN, E., HIRSCHBERG, J. G., SANTUS, R. *Photobiology*. Academic Press, ISBN : 0-12-417755-7
- [27] PALPIC, B., JAGGI, B., PON, A., FENGLER, J., LAM, S. *Development of lung imaging fluorescence endoscope*. Annual International conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. 1990, vol. 12 N°. 1 p. 0196-0197.
- [28] PALPIC, B., LAM, S., HUNG, J., MACAULAY, C. *Detection and localisation of early lung cancer by imaging techniques*. Reprinted from CHEST. 1991, vol. 99, pp. 742-743.
- [29] LAM, S., MACAULAY, C., PALPIC, B. *Detection and localisation of early lung cancer by imaging techniques*. Reprinted from CHEST. 1993, vol. 103, p. 12S-14S.
- [30] LAM, S., MACAULAY, C., LERICHE, J. C., QU, J., KROSL, G., ZENG, H., KORBELIK, M., PALPIC, B. *Fluorescence Imaging of Pre-malignant and malignant tissues with and without photosensitizer*. SPIE Vol. 1881 Optical Methods for Tumor Treatment and Detection. 1993, p. 160-167.
- [31] LAM, S., MACAULAY, C., LERICHE, J., IKEDA, N., PALPIC, B. *Fluorescence imaging of early lung cancer*. SPIE. 1995, vol. 2324 p.2-8.
- [32] QU, J., MACAULAY, C., PALPIC, B. *Mechanism of ratio fluorescence imaging of diseased tissue*. SPIE. 1995, vol. 2387 p.71-79.

- [33] PATHAK, I., DAVIS, N. L., HSIANG, Y. N., QUENVILLE, N. F., PALPIC, B. *Detection of squamous neoplasia by fluorescence to tissue autofluorescence in hamster cheek-pouch model*. The American journal of surgery. 1995, vol. 170, p.423-426.
- [34] STERENBORG, H. J.C.M., MOTAMEDI, M., WAGNER, R. F., DUVIC, M., THOMSEN, S. *In vivo fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumors*. Lasers in medical sciences. 1994, vol. 9, p. 191-201.
- [35] YU. N., KONSTANTINOV, TEREENT'EV, M. .M., RYBACOVSKII, I. V. *In situ laser induite autofluorescence visualisation of wounds*. SPIE Cell and Biotissue Optics. 1994, vol. 2100, p. 124-128.
- [36] CUBEDDU, R., CANTI, G., TARONI, P., VALENTINI, G. *Time-gated fluorescence imaging for diagnosis of tumors in murine model*. Photochemistry and Photobiology. 1993, vol. 57 N°3, p. 480-485.
- [37] CUBEDDU, R., PIFFERI, A., TARONI, P., VALENTINI, G. *Tumor detection in mice by measurment of fluorescence decay time matrices*. Optics letters. 1995, vol. 20, N°. 24 p.2553-2555.
- [38] WANG, T., WANG, Y., FELD, M., VAN DAM, J., CRAWFORD, J., PREISINGER, E., HARRISON, G. R. *Laser-induced-fluorescence endoscopic imaging system for quantitative detection of colonic dysplasia*. CLEO'95 (CThS4, 5:45 pm).
- [39] SZMACINSKI, H., LAKOWICZ, J. R. *Fluorescence lifetime-based sensing and imaging*. Elsevier Science, Sensors and Actuators. 1995, B 29 p. 16-24.
- [40] ANDERSON-ENGELS, S., JOHANSSON, J., SVANBERG, K., SVANBERG, S. *Fluorescence imaging and point measurment of tissue : Applications to the demarcation of malignant tumors and atherosclerotic lesions from normal tissues*. Photochemistry and phoyobiology. 1991, vol. 53, No. 6, p. 807-814.
- [41] ANDERSON-ENGELS, S., JOHANSSON, J., SVANBERG, S. *Medical diagnostic system based on simultaneous multispectral fluorescence imaging*. Applied optics. 1994, vol. 33, N°. 34.
- [42] 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. 1990, B: Biology, 6 p. 189-196.
- [43] MONNIER, PH., SAVARY, M., FONTOLLIET, CH., WAGNIERS, G., CHATELAIN, A., CORNAZ, P., DEPEURSINGE, CH., VAN DEN BERGH, H. *Photodetection and photodynamic therapy of early squamous celle carcinomas of the*

- pharynx, oesophagus and tracheo-bronchial tree*. Lasers in medical science. 1990, vol 5 : 149-169.
- [45] MONTAN, S., SVANBERG, K., SVANBERG, S. *Multicolor imaging and contrast enhancement in cancer-tumor using laser -induced fluorescence in hematoporphyrin-derivative-bearing tissues*. Optics letters. 1985, vol. 10, N°. 2.
- [46] ANDERSON-ENGELS, S., BERG, R., SVANBERG, K., SVANBERG, S. *Multicolor fluorescence imaging in connection with photodynamic therapy of δ -amino levulinic acid (ALA) sensitised skin malignancies*. Bioimaging 3. 1995, p. 134-143.
- [44] 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 human breast and lung tissues*. SPIE. Applied optics. 1989, vol. 28, N°. 12.
- [47] CUBEDDU, R., TARONI, P., VALENTINI, G. *Use of time-gated fluorescence imaging for diagnosis in biomedicine*. News and views. 1991, p. 109-113.
- [48] CUBEDDU, R., CANTI, G., TARONI, P., VALENTINI, G. *Study of porphyrin fluorescence in tissue sample of tumor-bearing mice*. Journal of Photochemistry and Photobiology. 1995, B: Biology 29 p. 171-178.
- [49] WAGNIERES, G., DEPEURSINGE, Ch., MONNIER, Ph., SAVARY, M., CORNAZ, P., CHATELAIN, A., VAN DEN BERGH, H. *Photodetection of early cancer by laser induced fluorescence of a tumor-selective dye : apparatus design and realisation*. SPIE. 1990, vol. 1203, p. 43-52.
- [50] KOLBE, W. F., TURKO, B. T. *Recovery of low intensity CCD images from noise*. IEEE Transaction on nuclear science. 1989, vol. 36, N°. 1, p. 731-733.
- [51] MORGAN, C. G., MITCHELL, A. C., PEACOCK, N., MURRAY, J. G. *High frequency modulated light source for phase fluorometry and fluorescence lifetime measurement*. Rev. Sci. Instrum. 1995, vol. 66 N°. 1, p. 48-51.
- [52] BOURG-HECKLY, G. *Propagation de la lumière dans les tissus biologiques*. DIUE Lasers Médicaux. 1996.
- [53] PRAHL, S. A., WELCH, A. J. *Optical properties of normal human Aorta from 200 to 2200 nanometers*. American society for laser medicine and surgery, eighth meeting, p. 142
- [54] ZENG, H., MACAULAY, C., PALPIC, B., MCLEAN, D. I. *Monte carlo modeling of tissue autofluorescence measurement and imaging*. SPIE. 1994, vol. 2135, p. 94-104.
- [55] STAR, W. M. *Light dosimetry in vivo*. Phys. Med. Biol. 1997, vol. 42 p. 763-787.

- [56] QU, J., MACAULAY, C., LAM, S., PALPIC, B. *Laser induced fluorescence spectroscopy at endoscopy : tissue optics, Monte Carlo modeling, and in vivo measurements*. SPIE, optical engineering. 1995, vol. 34, N° 11.
- [57] LILGE, L., HAW, T., WILSON, B. C. *Miniature isotropic optical fibre probes for quantitative light dosimetry in tissue*. Phys. Med. Biol. 1993, vol. 38, p. 215-230.
- [58] ZONIOS, G., COTHREN, R. M., ARENDT, J., WU, J., CRAWFORD, J. M., VAN DAM, J., MANOHARAN, R., FELD, M. S. *Fluorescence spectroscopy for colon cancer diagnosis*. SPIE. 1995, vol. 2324, p. 9-12.
- [59] PROFIO, A. E., XIE, S., SHU, K-H. *Diagnosis of tumors by fluorescence : quantification of photosensitiser concentration*. SPIE photodynamic therapy : mechanisms II. 1990, vol. 1203, p.12-18.
- [60] KEIJZER, M., RICHARDS-KORTUM, R., JACQUES, S. L., FELD, M. *Fluorescence spectroscopy of turbid media : autofluorescence of human aorta*. Applied optics. 1989, vol. 28, N° 20, p. 4286-4292.
- [61] STRAIGHT, R. C. and al. *Application of charge coupled device technology for measurment of laser light and fluorescence distribution in tumors for photodynamic therapy*. Chemistry and Photobiology. 1991, vol. 53, N° 6, p. 787-796.
- [62] HUNG, J., LAM, S., LERICHE, J. C., PALPIC, B. *Autofluorescence of Normal and Malignant Bronchial tissue*. Lasers in Surgery and Medicine. 1991, vol. 11, p. 99-105.
- [63] ZENG, H., MACAULAY, C., MCLEAN, D. I., LUI, H., PALPIC, B. *Miniature spectrometer and multi-spectral imager as a potential diagnosis aid in dermathology*. SPIE. 1995, vol. 2387, p. 57-61.
- [64] ANKERST, J., MONTAN, S., SVANBERG, K., SVANBERG, S. *Laser-induced fluorescence studies of hematoporphyrin derivative in normal and tumor tissues of rat*. Applied Spectroscopy. 1984, vol. 38, N° 6, p.890-896.
- [65] ANDERSON-ENGELS, S., ELINER, A., JOHANSSON, J., KARLSSON, S.-E., SALFORD, L.G., STRÖMBLAD, L.-G, SVANSBERG, K., SVANSBERG, S. *Clinical recording of laser-induced fluorescence spectra for evaluation of tumor demarcation feasibility in selected clinical specialities*. Lasers in medical science. 1991, vol. 6, p. 415-424.
- [66] CUBEDDU, R., DOCCHIO, F., RAMPONI, R., TARONI, P. *Laser-induced fluorescence in biomedical applications*. International journal of optoelectronics. 1991, vol. 6, N° 5, p. 479-490.

- [67] SCHNECKENBURGER, H., KÖNIG, K., KUNZI-RAPP, K., WESTPHAL-FRÖSCH, C., RÜCK, A. *Time-resolved in-vivo fluorescence of photosensitizing porphyrins*. J. Photochem. Photobiol. 1993, B : Biol., 21 p. 143-147.
- [68] MEIRONG, L., BAOZHENG, Z., QINGYUAN, W., FANG, F. *The fluorescence characteristic of biological tissue and cells*. SPIE Cell and Biotissue Optics, 1994, vol. 2100 p. 237-243.
- [69] UTTS, S. R., SINICHKIN, Y. P., PILIPENKO, E. A. *Laser Fluorescence spectroscopy of human skin in vivo : the effect of erythema*. Optics and Spectroscopy. 1994, vol. 76, N°. 5, pp. 771-774.
- [70] MAHADEVAN, A., MITCHELL, M. F., SILVA, E., THOMSEN, S., RICHARDS-KORTUM, R. *Study of the fluorescence properties of normal and neoplastic human cervical tissue*. Lasers in Surgery and Medicine. 1993, vol. 13, p. 647-655.
- [71] STERENBORG, H. J. C M., THOMSEN, S., JACQUES, S. L., MOTAMEDI, M. *In vivo autofluorescence of unpigmented melanoma in mice. Correlation of spectroscopic properties to microscopic structure*. Melanoma Research. 1995, vol. 5, p. 211-216.
- [72] RICHARDS-KORTUM, R., MITCHELL, M. F., RAMANUJAM, N., MAHADEVAN, A., THOMSEN, S. *In vivo Fluorescence spectroscopy : Potential for non-invasive, Automated diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and use as a surrogate endpoint biomarker*. Journal of cellular biochemistry, Supplement 19. 1994, p. 111-119.
- [73] LIN, C-W., BELLNIER, D. A., PROUT, G. R., ANDRUS, W. S., PRESCOTT, R. *Cystoscopic fluorescence detector for photodetection of bladder carcinoma with hematoporphyrin derivative*. The journal of urology. 1984, vol. 131, p. 587-590.
- [74] TANG, G. C., PRADHAN, A., ALFANO, R. R. *Spectroscopic differences between human cancer and normal lung and breast tissues*. Lasers in surgery and medicine. 1989, vol. 9, p. 290-295.
- [75] PANJEHPOUR, M., SNEED, R. E., FRAZIER, D. L., BARNHILL, M. A., O'BRIEN, S., HARB, B., OVERHOLT, B. F. *Laser-induced fluorescence quantitation of chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate concentration in rat tissue*. SPIE Optical Methods for Tumor Treatment and Detection. 1992, vol. 1645, p. 171-179.
- [76] VALAT, P., REINHART, G. D., JAMESON, D. M. *Application of time-resolved fluorometry to the resolution of porphyrin-photoproduct mixtures*. Photochemistry and photobiology. 1988, vol. 47, N°. 6, p. 787-790.
- [77] DHINGRA, J. K., PERRAULT, D. F., MCMILLAN, K., REBEIZ, E. E., KABANI, S., ANOHARAN, ITZKAN, I., FELD, M. S., SHAPSHAY, S. M. *Early diagnosis of*

- upper aerodigestive tract cancer by autofluorescence.* Arch. Otolaryngol Head Neck Surg. 1996, vol. 122, p. 1181-1186.
- [78] BIGIO, I. J., MOURANT, J. R. *Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics : fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy.* Phys. Med. Biol. 1997, vol : 42, p. 803-814.
- [79] ANDERSON, P.S., KJELLEN, E., MONTAN, S., SVANBERG, K., SVANBERG, S. *Autofluorescence of various rodent tissues and human skin tumour samples.* Lasers in medical science. 1987, vol. 2, p. 41-49.
- [80] LEUNG, J. K. W., YIP, T. T. C., LAU, W. H., WONG, K. S., YOO, K. M. *Photoluminescence as a diagnostic technique for nasopharyngeal carcinoma.* CLEO'95. 1995, p.299-230.
- [81] PROFIO, A. E., DOIRON, D. R., SARNAIK, J. *Fluoremeter for endoscopic diagnosis of tumors.* Med. Phys. 1984, vol. 11(4), p. 516-520.
- [82] ABIGNOLI, M., GOELDEL, C. *Les techniques de l'ingénieur : moteurs pas à pas.* D 3690, p.1-21.
- [83] MÖLLER, K. D., BELORGEOT, C. *Optique géométrique.* éditions ellipse.
- [84] ROSENMAN, J., ROE, C. A., CROMATIE, R., MULLER, K. E., PIZER, S. M. *Portal film enhancement : technique and clinical utility.* Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. Vol. 25, p. 333-338
- [85] REHM, K., SEELEY, G. W., DALLAS OVITT, T. W., SEEGER, J. F. *Design and testing of artifact-suppressed adaptive histogram equalisation : a contrast-enhancement technique for the display of digital chest radiographs.* J. Thorac. Imag. 1991, vol. 5, p. 85-91.
- [86] KUNT, M. *Traitement numérique des images.* Presses polytechniques et universitaires romandes, ISBN 2-88074-238-2
- [87] COCQUEREZ, J. P., PHILIPP, S. *Analyse d'images : filtrage et segmentation.* Edition Masson, ISBN : 2-225-84923-4.
- [88] LESZCZYNSKI, K. W., SHALEV, S. *Digital contrast enhancement for online portal imaging.* Medical & Biological Engineering & computing. 1989, vol. 27, p. 507-512.
- [89] CROOKS, I., FALLONE, B. G. *A novel algorithm for edge detection and edge enhancement of medical images.* Med. Phys. 1993, vol.20 (4), p. 993-998.
- [90] LESZCZYNSKI, K. W., SHALEV, S. *A robust algorithm for contrast enhancement by histogram modification.* Image and Vision Computing. 1989, vol. 7, N°. 3, p.205-209.
- [91] PIZER, S. M., AMBURN, E. P., AUSTIN, J. D., CROMARTIE, R., GESELOWITZ, A., GREER, T., ROMENY, B. H., ZIMMERMAN, J. B., ZUIDERVELT, K. *Adaptive*

histogram equalisation and its variations. Computer Vision, Graphics and Image Processing. 1987, vol. 39, p. 355-368.

[92] CROOKS, I., FALLONE, B. G. *Contrast enhancement of portal images by selective histogram equalisation*. Med. Phys. 1993, vol. 20 N° 1, p. 199-204.

[93] POWLIS, W. D., BRIKMAN, I., SESHADRI, S. B., BLOCH, P. *Portal Radiographs : digital enhancement of contrast*. Radiology. Vol. 169 N° 3, p.839-841.

[94] LEH-NIEN, D. L., KUNIO, D., CHARLES, E. M. *Investigation of basic imaging properties in digital radiography 4. Effect of unsharp masking on the detectability of simple patterns*. Med. Phys. 1985, vol. 12, N° 2.

[95] WEISER, J. C., GUR, D., GENNARI, R., DEUTSCH, C.M. *Evaluation of analog contrast enhancement and digital unsharp masking in low-contrast portal images*. Med. Phys. 1990, vol. 17, N° 1, p. 122-125.

[96] SHEROUSE, G. W., ROSENMAN, J., MCRURRY, H. L., PIZER, S. M., CHANEY, E. L. *Automatic digital contrast enhancement of radiotherapy films*. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 1986, vol. 13, p. 801-806.

[97] PRESS, W. H., TEUKOLSKY, S. A., VETTERLING, W. T., FLANNERY, B. P. *Numerical recipes in C The art of scientific computing*. Cambridge University Press. 1992, ISBN 0-521-43108-5

[98] MEERTENS, H., VAN HERK, M. WEEDA, J. *An inverse filter for digital restoration of portal images*. Phys. Med. Biol. 1988, vol. 33, N° 6, p. 687-702.

[99] CUNNINGHAM, I. A., REID, B. K. *Signal and noise in modulation transfert function determinations using the slit, wire and edge techniques*. Med. Phys. 1992, vol. 19, N°4, p.1037-1044.

[101] CALVETTI, D., REICHEL, L. *Application of ADI iterative methods to the restoration of noisy images*. SIAM J. Matrix Anal. Appl. 1996, vol. 17, N° 1, p. 165-186.

[100] SHEN, S., DENARDO, G. L., DENARDO, S. J. *Quantitative bremsstrahlung imaging of yttrium-90 using a Wiener filter*. Med. Phys. 1994, vol. 21, n° 9, p. 1409-1417.

[102] LEE, T. S., MIN, B. G. *Image restoration in digital radiography using dual sensor Wiener filter*. Med. Phys. 1991, vol. 18, N° 6, p. 1132-1140.

[103] BÖCKER, W., , MÜLLER, W. U., STREFFER, C. *Comparison of different automatic threshold algorithms for image segmentation in microscope images*. SPIE. 1995, vol. 2564, p. 230-241.

[104] ZIMMER, Y., TEPPER, R., AKSELROD, S. *A two-dimensional extension of minimum cross entropy thresholding for the segmentation of ultrasound images*. Ultrasound in Med. & Biol., 1996, vol. 22, N° 9, p. 1183-1190.

- [105] BAE, K. T., GIGER, M. L., CHEN, C-T., KAHN, C. E. *Automatic segmentation of liver structure in CT images*. Med. Phys. 1993, vol. 20(1), p. 71-78.
- [106] WANG, Y., ADALI, T., LO, S-C. B. *Automatic threshold selection using histogram quantization*. Journal of Biomedical Optics. 1997, vol. 2, N°. 2, p. 211-217.
- [107] GUILLEMIN, F., A'AMAR, O., REZZOUG, H., LIGNON, D., JAFFRY, F., ABDULNOUR, C., MÜLLER, L., YVROUD, E., MERLIN, J.L., GRANJON, Y., ZEGARI, N., KHEMIS, K., BARBERI-HEYOB, M., MEUNIER-REYNES, A., POTAPENKO, A., NOTTER, D., VIGNERON, C. *Optical instrumentation suitable for real-time dosimetry during photodynamic therapy*. Proc. SPIE. 1995, vol. 2627, p. 92-99.
- [108] BARBERI-HEYOB, M., REZZOUG, H., MERLIN, J.L., GUILLEMIN, F. *A sensitive isocratic liquide chromatography assay for the determination of 5, 10, 15, 20-tetra (m_hydroxyphényl) chlorin (mTHPC) in plasma and tissue with electrochemical detection*. Journal of chromatography B : Biomedical Application. 1997, vol. 688, No. 2, p. 331-339.
- [109] REZZOUG, H., A'AMAR, O., BARBERI-HEYOB, M., MERLIN, J.L., GUILLEMIN, F. *In vivo photodynamic therapy with meso-tetra (m_hydroxyphényl) chlorin : Influence of light intensity and optimisation of photodynamic efficiency*. Proc. SPIE. 1996, vol. 2924, p. 181-186.
- [110] REZZOUG, H., BEZDETNAYA, L., A'AMAR, O., MERLIN, J.L., GUILLEMIN, F. *Influence of different parameters on photodynamic activity of meso-tetra (m_hydroxyphényl) chlorin (m-THPC) : in vitro and in vivo*. Lasers in medical Science. 1998.
- [111] 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. 1997, vol. 8, p. 67-72.
- [112] GUILLEMIN, F., A'AMAR, O., REZZOUG, H., LIGNON, D. *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.
- [113] A'AMAR, O., LIGNON, D., BEGORRE, H., GUILLEMIN, F., YVROUD, E. *Light Induced Fluorescence Spectroscopy: A Clinical Instrumentation For Tissue Characterization*. The Annual IAR Conference, Karlsruhe, Germany, 21-22. November 1996.

- [114] A'AMAR, O., GUILLEMIN, F., BEGORRE, H., YVROUD, E. *Autofluorescence spectroscopy of normal and pathological tissues of the bladder*. SPIE: Optical Biopsy. 1997, vol. 3197.
- [115] A'AMAR, O., GUILLEMIN, F., BEGORRE, H., YVROUD, E. *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, 14-19 September 1997.
- [116] PADILLA-YBARRA, J.-J., BOURG-HECKLY, G., A'AMAR, O., BLAIS, J., ETIENNE, J., GUILLEMIN, F. *UV-induced autofluorescence spectroscopy in Barrett's esophagus*. SPIE : Optical Biopsy. 1997, vol. 3197.
- [117] A'AMAR, O., LIGNON, D., MENARD, O., BEGORRE, H., GUILLEMIN, F., YVROUD, E. *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. 7-11 September 1996 vol. 9, Supplement 23, p.375s.
- [118] A'AMAR, O., LIGNON, D., MENARD, O., BEGORRE, H., GUILLEMIN, 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*. SPIE : Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancers and Other Diseases III: Optical Biopsy. 1996, vol. 2679, p. 42-50.
- [119] LIGNON, D., A'AMAR, O., KHEMIS, K., GUILLEMIN, F. 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. 18 et 19 Mai 1995, p. 12.
- [120] JAFFRY, F., A'AMAR, O., LIGNON, D., GUILLEMIN, F., 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. 18 et 19 Mai 1995, p. 27.
- [121] REZZOUG, H. *Activité photodynamique in vitro et in vivo de la mTHPC : Etude préclinique*. Thèse de Doctorat de l'INPL, 1997.
- [122] A'AMAR, O. *Spectroscopie tissulaire in vivo de l'autofluorescence et de la fluorescence induite : Instrumentation, analyse et modélisation ; Application au diagnostic*

des cancers précoces et à l'optimisation de la thérapie photodynamique. Thèse de Doctorat d'INPL, 1997.

[123] WAGNIERES, G. A., STUDZINSKI, A. P., VAN DEN BERGH, H. E. *An endoscopic fluorescence imaging system for simultaneous visual examination and photodetection of cancers*. Review of scientific instruments. 1997, vol. 68, N°. 1, Part. I, p. 203-206.

[124]] WAGNIERES, G. A., STUDZINSKI, A. P., BRAICHOTTE, D. R., MONNIER, P., DEPEURSINGE, C., VAN DEN BERGH, H. E. *Clinical imaging fluorescence apparatus for endoscopic photodetection of early cancers by use of Photofrin II*. Applied Optics. 1997, vol. 36, N°. 22, p.5608-5620.

[126] WAGNIERES, G., MIZERET, J., STUDZINSKI, A., VAN DEN BERGH, H. *Frequency-domain fluorescence lifetime imaging for endoscopic clinical cancer photodetection : apparatus design and preliminary results*. Journal of Fluorescence. 1997, vol. 7, N°. 1, p. 75-82.

[125] GROSJEAN, P., SAVARY, J. F., WAGNIERS, G., MIZERET, J., WOODTLI, A., THEUMANN, J-F., FONTOLLIET, C., VAN DEN BERGH, H., MONNIER, P. *Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin clinical photodynamic therapy of early bronchial and oesophageal cancers*. Lasers in medical science. 1997, vol. 11, p. 227-235.

[127] LAM, S., HUNG, J., PALPIC, B. *Mechanism of detection of early cancer by ratio fluorometry*. Lasers in life science. 1991, vol. 4(2), p. 67-73.

[128] LAM, S., PALPIC, B., McLean, D., HUNG, J., KOBELIK, M., PROFIO, A. E. *Detection of early lung cancer using low dose photofrin II*. CHEST. 1990, vol. 97/2, p. 333-337.

[129] ANDERSON, P. S., KJELLEN, E., MONTAN, S., SVANBERG, K., SVANBERG, S. *Autofluorescence of various rodent tissues and human skin tumour samples*. Laser in medical science. 1987, vol. 2:41, p. 41-49.

[130] BRAICHOTTE, D., WAGNIERES, G., PHILIPPOZ, J. M., BAYS, R., RIS, H. B., MONNIER, Ph., CHATELAIN, A., VAN DEN BERGH, H. *Clinical LIF pharmacokinetic measurements with Photofrin II for optimizing the detection of early cancer*. SPIE Optical methods for tumor treatment and detection. 1992, vol. 1645, p. 229-240.

[131] RICHARDS-KORTUM, R., RAVA, R. P., PETRAS, R. E., FITZMAURICE, M., SIVAK, M., FELD, M. S. *Spectroscopic diagnosis of colonic dysplasia*. Photochemistry and photobiology. 1991, vol. 53, N°. 6, p. 777-786.

- [132] ALFANO, R. R., PRADHAN, A., TANG, G. C. *Optical spectroscopic diagnosis of cancer and normal breast tissues*. Journal of Optical Society of America. 1989, vol. 6, N^o. 5, p.1015-1023.
- [133] PROFIO, A. E., DOIRON, D. R., SARNAIK, J. *Fluorometer for endoscopic diagnosis of tumors*. Med. Phys. 1984, vol. 11(4), p. 516-520.
- [134] ANDERSSON, T., BERG, R., JOHANSSON, J., KILLANDER, D., SVANSBERG, K., SVANBERG, S., YUANLONG, Y. *Photodynamic therapy with fluorescence diagnostics in the treatment of human superficial malignancies*. SPIE Optical methods for tumor treatment and detection . 1992, vol. 1645, p.187-199.
- [135] DILLER, M-L. *Detection, traitement du signal et modélisation de l'image de fluorescence in vitro et sur tissus biologiques : Application au diagnostic des tumeurs cancéreuses par thérapie photodynamiques, métrologie associée*. Thèse de Doctorat de l'INPL, 1994.
- [136] ZEGHARI, N. *Caractérisation et étude des conséquences biologiques du photoblanchiment de l'hématoporphyrine dérivée utilisée en thérapie photodynamique*. Thèse de pharmacologie, UHP, Nancy I, 1995.
- [137] ORIEL catalogue de vente, 1997.
- [138] KHEMIS, K., LIGNON, D., LOUIS, V., GUILLEMIN, F., YVROUD, E. *Early diagnosis of cancers using in-vivo fluorescence imaging of tissues*. Algerian Journal Of Technology. 1996, vol. 2 p. 76.
- [139] KHEMIS, K., LIGNON, D., LOUIS, V., YVROUD, E., GUILLEMIN, F. *Early diagnosis of cancers using fluorescence imaging of tissues*. Proceeding of SPIE. 1996, vol. 2927-16.
- [140] KHEMIS, K., LIGNON, D., LOUIS, V., YVROUD, E., GUILLEMIN, F. *Fluorescence imaging of tissues : Application in Oncology*. Proceeding of I.A.R. Nov 1996.
- [141] KHEMIS, K., LOUIS, V., YVROUD, E., GUILLEMIN, F. *Fluorescence imaging of tissues with and without photoensitizer applied to cancers diagnosis*. Journal of the international federation for Medical & Biological Engineering. 1997, vol. 35, Supplement Part I, p. 156.
- [142] KOUWENHOVEN, E., MAST, F., VAN RIJK-ZWIKKER, G. L. *Geometrical reconstruction of images obtained with electronic endoscopy*. phys. Med. Biol. 1993, vol. 38, p. 13-24.

- [143] VAKIL, N., SMITH, W., BOURGEOIS, K., EVERBACH, E. C., KNYRIM, K. *Endoscopic measurement of lesion size : improved accuracy with image processing.* Gastrointestinal endoscopy. 1994, p. 178-183.
- [144] VAKIL, N. *Measurement of lesions by endoscopy : An overview.* Endoscopy. 1995, vol. 27, p. 694-697.
- [145] WITT, H., MANNEBERG, G., SLEZAK, P., WATANABE, M., KRONANDER, T. *Quantitative endoscopic classification of esophagitis by means of computerized image processing Part II : experimental study.* Hepato-Gastroenterology. 1996, vol. 43, p. 1321-1326.
- [146] FUJINO, M. A. *Can endoscopic measurement be reliable elegant, and economical ? The search for computerized image processing.* Endoscopy. 1994, vol. 26, p. 486-487.
- [147] FUJINO, M. A., KAWAI, T., YAMAMOTO, A., IKEDA, M., SUZUKI, H. *Endoscopic image manipulation : state of the art.* Endoscopy. 1992, vol. 24, Suppl. 2, p. 516-521.
- [148] KOWDLEY, K. V., SILVERSTEIN, F. E. *Future developments in endoscopic imaging.* Baillière's Clinical Gastroenterology. 1995, vol. 9, N° 1, p. 173-183.
- [149] FUJINO, M. A., MOROZUMI, A., NAKAMURA, T. and al. *Electronic endoscopy in perspective.* Journal of Gastroenterology. 1994, vol. 29, Suppl VII, p. 58-90.
- [150] LANGE, TH. *State of the art of video technique for endoscopic surgery.* End. Surg. 1993, vol. 1, p. 29-35.
- [151] DEMAILLE, A., CAPPELAERE, P. *Prévention et diagnostic des cancers.* Flammarion médecine-science.
- [152] VERDAASDONK, R. M., VAN SWOL, C. F. P. *Laser light delivery systems for medical applications.* Phys. Med. Biol. 1997, vol. 42, p. 869-894.
- [153] BESSON, R. *Electronique composants radio television satellites video sonorisation.* Dunod. 1996, ISBN 2-10-001410-2.
- [154] MOAN, J. *A change in the quantum yield of photoinactivation of cells observed during photodynamic treatments.* Lasers Med. Sci. 1988, vol. 3, p. 93-97.
- [155] KÖNIG, K., WABNITZ, H., DIETEL, W. *Variation in the fluorescence decay properties of haematoporphyrin derivative during its conversion to photoproducts.* J. Photochem. Photobiol. 1990, vol. 8, p. 103-111.
- [156] SCHWARTZ, D. *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.* Flammarion médecines-sciences, FM 0326-93-1

ANNEXE B : PHOTOBIOLOGIE [26]

Excitation et désactivation des molécules par la lumière

1. Introduction

Selon le principe d'exclusion de PAULI de l'état fondamental d'une molécule, les spins des électrons sont regroupés en paires de façon à donner l'état singulet fondamental. Si un électron π est excité sans changement de spin, l'état électronique résultant est dit état singulet, au contraire si'il y a changement de signe l'état est dit triplet (égal à $2S+1$ avec $S=1/2\pm 1/2$).

Toutes les molécules biologiques sont à l'état fondamental dans leur état singulet sauf l'oxygène qui est à l'état triplet.

L'énergie de l'état triplet est inférieure au niveau correspondant singulet.

Une molécule M sera notée avec un indice représentant son niveau électronique, un exposant à gauche représentant son état (singulet ou triplet), et/ou un exposant à droite représentant sa charge(+,-,0)ou son état instable (*).

exemple : 3M_n représente une molécule dans son état triplet et au niveau électronique n.

2. L'absorption de la lumière par les molécules

Lorsqu'une molécule dans son état fondamental singulet (1M_0) absorbe un photon d'énergie $h\nu$, elle passe à un niveau électronique n de telle sorte que la différence d'énergie par rapport à l'énergie de l'état fondamental est égale à l'énergie du photon absorbé c'est à dire :

$$h\nu = E({}^1M_n) - E({}^1M_0)$$

h est la constante de planck ($h = 6.6256 \cdot 10^{-34}$ J.s) et ν est la fréquence du photon.

Chaque niveau électronique est composé de plusieurs niveaux vibrationnels et chaque niveau vibrationnel est composé de plusieurs niveaux rotationnels. Ainsi, l'énergie d'une molécule est la somme de l'énergie électronique E_e , vibrationnelle E_v et rotationnelle E_r :

$$E = E_e + E_v + E_r$$

de telle sorte que :

$$h\nu = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r$$

La quantité ΔE_e (pour passer à un état électronique plus élevé), est plus grande que ΔE_v (pour passer à un état vibrationnel plus élevé) qui est à son tour plus grande que ΔE_r .

Les différents états énergétiques d'une molécule sont représentés par le diagramme de JABLONSKI (figure AB1).

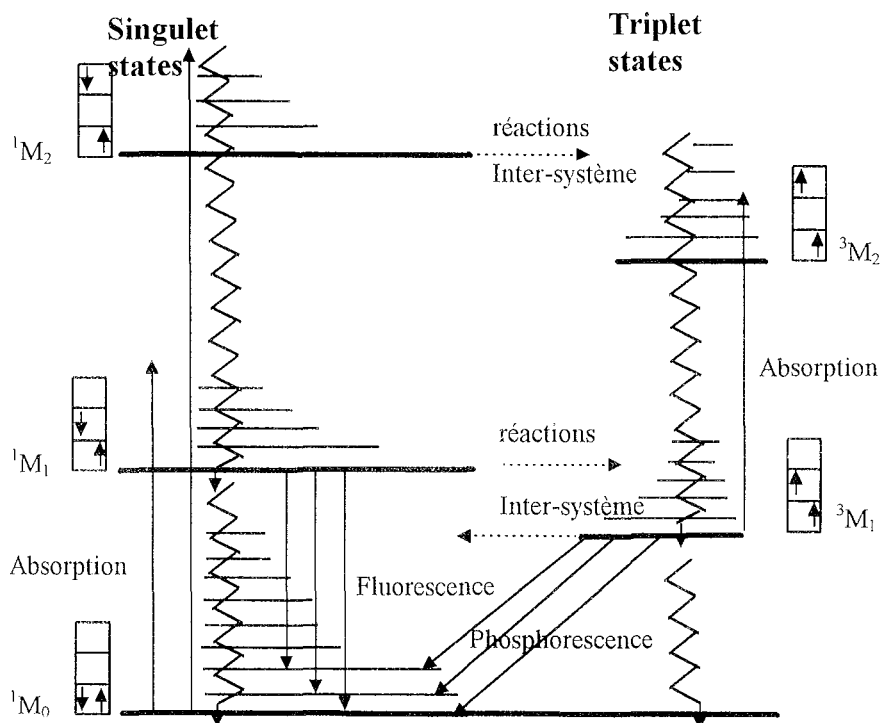


Figure AB1 : Diagramme de Jablonski

Le coefficient d'extinction : la loi de Beer-Lambert

Si une lumière monochromatique traverse un échantillon d'épaisseur l cm et contenant n molécules absorbantes par cm^3 , le taux de fluence du faisceau sortant est :

$$I = I_0 \exp(-\sigma \cdot n \cdot l) = I_0 \exp(-\mu \cdot l)$$

I est donné en fonction de la surface moléculaire σ (cm^2), ou en fonction du coefficient d'absorption μ (cm^{-1}). I peut également être exprimé en fonction du coefficient d'extinction molaire ϵ , défini par :

$$I = I_0 10^{-\epsilon[M]l}$$

où $[M]$ est la concentration molaire des molécules absorbantes et ϵ est exprimée en $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, car $n = N[M] \times 10^{-3}$, N étant le nombre d'AVOGADRO ($= 6.02 \times 10^{23}$)

Ainsi :

$$\sigma = 2.3 \cdot \epsilon / N = 3.8 \times 10^{-21} \epsilon$$

A titre d'exemple les porphyrines ont un coefficient d'extinction molaire de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 400 nm (avec une section de 10^{-16} cm^2), tandis que pour le tryptophane ce coefficient vaut $5800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 280 nm.

La quantité $\log_{10}(I_0/I)$ est l'absorbance (A) de la solution également appelée la Densité Optique (D.O.)

la quantité de lumière absorbée par l'échantillon est :

$$I_{abs} = I_0(1 - 10^{-A})$$

Le spectre d'absorption est la représentation graphique de A en fonction de la longueur d'onde.

3. La désactivation des états singulets

La molécule dans son état instable peut perdre l'excès d'énergie soit de façon radiative soit de façon non radiative. Lorsqu'elle est excitée à un niveau électronique $n > 1$, elle passe d'abord par processus dit de conversions internes qui dure de 10^{-12} à 10^{-13} secondes dans lequel elle passe d'un état vibrationnel bas d'un niveau supérieur à un état vibrationnel élevé du plus bas état électronique excité ($n=1$). Après les conversions internes, la molécule perd rapidement son énergie vibrationnelle en excès par collision avec les molécules du solvant et descend au plus bas niveau vibrationnel du premier niveau électronique excité. Par la suite, la molécule descend à son état fondamental et en particulier sur n'importe quel niveau vibrationnel, en émettant de la fluorescence mais avec un décalage de longueur d'onde vers le rouge c'est à dire avec une longueur d'onde plus grande que la longueur d'onde d'excitation (loi de Stokes)

4. Désactivation du premier état excité singulet par les transitions intersystèmes vers l'état triplet

La probabilité de passage d'une molécule de l'état fondamental à l'état triplet est très faible. Cependant la population de cet état (3M_1) peut se faire de différentes manières en passant par l'état (1M_1) par un processus appelé transitions intersystèmes (Diagramme de JABLONSKI).

Lorsque la molécule descend au plus faible niveau vibrationnel de l'état singulet, elle peut alors descendre à l'état fondamental mais elle peut également transiter à l'un des niveaux vibrationnels de l'état triplet dont l'énergie est plus faible que celle de l'état singulet.

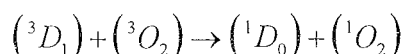
5. Fluorescence retardée

A part l'absorption d'un photon, il existe d'autres façons, pour occuper l'état singulet excité:

- Si une faible énergie sépare l'état triplet de l'état singulet, la molécule peut repasser en sens inverse vers l'état singulet, et puisque la durée de vie de l'état triplet est plus longue que celle de l'état singulet, une fluorescence retardée sera observée.
- La molécule peut également passer d'un état triplet inférieur à un état triplet supérieur, en absorbant à nouveau un photon libéré par la molécule et dont l'énergie correspond au saut effectué. Dans ce cas une phosphorescence retardée sera observée.

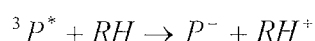
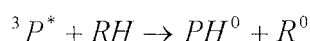
6. Transfert d'énergie entre les états triplets et les états singulets

L'exemple le plus important pour les photobiologistes est celui de l'oxygène, qui est une molécule dont l'état fondamental est un état triplet. Elle est utilisée comme accepteur d'énergie provenant des molécules à l'état triplet notées (3D_1). Typiquement on aura l'équation suivante:

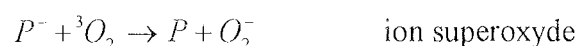
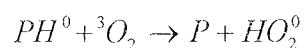


Réaction photochimique de type I

Le photosensibilisant dans son état triplet réagit avec un substrat soit en captant l'hydrogène et produisant ainsi un radical neutre, soit en captant un électron de façon à produire un composé chargé. Ces deux situations sont représentées par les réactions suivantes dans lesquelles P représente le photosensibilisant et RH est le substrat :



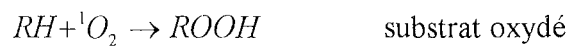
Les radicaux formés réagissent avec l'oxygène triplet pour donner naissance à des produits photooxydants :



Réaction photochimique de type II

Le photosensibilisant dans son état triplet réagit directement avec l'oxygène (dont l'état de base est naturellement un état triplet) pour produire l'oxygène singulet (l'oxygène singulet ainsi formé est une substance très active et cytotoxique). Ce dernier étant instable, va réagir

avec les substrats du milieu (RH) pour donner des substrats oxydés très actifs (ROOH). Ces deux réactions s'écrivent :



Les réactions photochimiques de type II sont dominantes dans un milieu oxygéné. L'efficacité de la PDT dépend éventuellement de l'oxygénation de la tumeur.

ANNEXE 3D : IMAGERIE DE FLUORESCENCE EN TROIS DIMENSIONS

1. Principe et théorie

Selon la loi de **Beer-Lambert**, la puissance lumineuse P à une distance d de la source où la puissance est P_0 , est donnée par la relation :

$$P = P_0 \cdot e^{-\lambda d} \quad (1)$$

où λ est le coefficient d'atténuation globale de la lumière à travers le milieu considéré.

Nous pouvons déterminer la puissance minimale qui peut générer un signal de fluorescence détectable par la caméra, cette puissance est P_{\min} . Tant que P est supérieure à P_{\min} une image de fluorescence est détectable. Comme la lumière se propage principalement dans la direction perpendiculaire à la surface excitée (sachant que les tissus sont anisotropiques) l'image de fluorescence obtenue est en réalité la superposition des images de fluorescence des surfaces parallèles S_i , i variant de 0 à n , S_0 correspond à la surface externe où l'énergie lumineuse reçue est de P_i , alors que S_n correspond à la plus profonde surface où l'énergie est de P_{\min}

P_{\min} peut être évaluée expérimentalement, elle correspond à l'atténuation de la plus faible puissance d'excitation P'_{\min} , à travers l'interface source-tissu, et qui permet de générer une image de fluorescence détectable par la caméra.

L'équation (1) sera notée :

$$P_{\min} = P'_{\min} \cdot e^{-\lambda_i \cdot d} \quad (2)$$

λ_i est le coefficient d'atténuation de la lumière d'excitation dans l'interface source de lumière (sortie de fibre)-tissu ; d étant la distance qui sépare la source de la surface du tissu examiné.

Pour chaque valeur de la puissance d'excitation une suite consécutives de surfaces, dont le nombre dépend de cette puissance, seront excitées. Plus la puissance augmente, plus le nombre de surfaces excitées augmente, puisque la profondeur de pénétration de la lumière augmente. Le but est de distinguer la réponse de chaque surface S_i ou plus précisément, de chaque élément de volume :

$$dV = S_i \cdot e.$$

Nous supposons que le milieu considéré est homogène.

La puissance d'excitation varie de P'_{\min} à P'_{\max} .

Les réponses des différentes couches qui sont également des énergies lumineuses se propagent entre autre, en sens inverse de l'excitation et selon la même formule de Beer-Lambert :

$$R = R_0 \cdot e^{-\lambda_r \cdot d}$$

pour une puissance P'_{\min} : $R = \alpha_0 \cdot I_0$

pour une puissance P_1 : $R = \alpha_0 \cdot I_0 + \alpha_1 \cdot I_1$

.

.

.

pour une puissance P'_{\max} : $R = \alpha_0 \cdot I_0 + \alpha_1 \cdot I_1 + \dots + \alpha_n \cdot I_n$ (3)

R est la réponse brute captée par la caméra, et I_i est la réponse (l'image) d'une couche i située à une profondeur $i \cdot e$ (e : épaisseur de chaque couche).

α_i est le facteur d'atténuation de la transmission de la fluorescence de chaque couche. Une première atténuation se fait dans le tissu et une seconde atténuation dans l'interface tissu-caméra . Si nous ne considérons que l'atténuation dans le tissu alors :

$$\alpha_i = e^{-\lambda_r \cdot i \cdot e} \quad (7)$$

λ_r est le coefficient d'atténuation globale de la fluorescence dans le tissu. L'équation (3) devient alors :

$$R_i = \sum_i (I_i \cdot e^{-\lambda_r \cdot i \cdot e}) \quad (8)$$

La relation liant les réponses de deux couches consécutives est donnée par :

$$R_{i+1} = R_i + I_{i+1} \cdot e^{-\lambda_r \cdot (i+1) \cdot e} \quad (9)$$

connaissant la réponse de la couche superficielle, et les réponses de l'ensemble des couches pour chaque puissance d'excitation, nous pouvons déterminer, par récurrence, les réponses de chaque couche.

Par ailleurs, puisque l'atténuation du signal de fluorescence dans le tissu tumoral est différente de celle du tissu sain, une correction supplémentaire sera faite sur l'image.

Le choix des puissances d'excitation est important. La résolution 'e' et la profondeur maximale d'exploration du site examiné dépendent des valeurs P_{\min} et P_{\max} possibles. P_{\min} dépend de la sensibilité de la caméra et P_{\max} dépend de la puissance maximale en sortie de fibre.

2. Modèle d'application

Supposons qu'il existe une tumeur infiltrante sous forme de cône. L'image de fluorescence en surface ne révèle qu'une tumeur de diamètre D_{min} alors que l'imagerie 3D peut nous donner le profil de la tumeur.

Un tel cas peut être simulé par deux fantômes, l'un représentant le tissu sain et l'autre le tissu cancéreux (Figure 2.1).

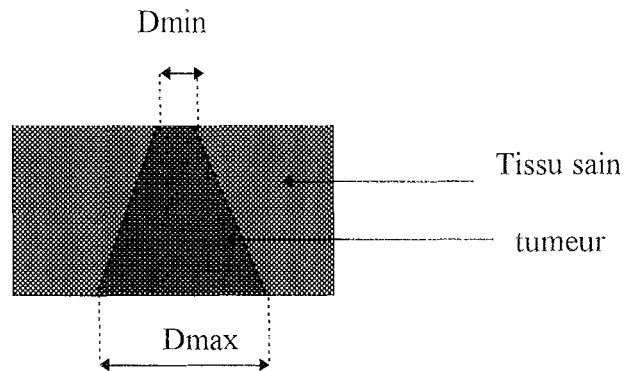


Figure 2.1 : Fantômes simulants une tumeur infiltrante et un tissu sain

3. Instrumentation associée

En clinique, le système d'acquisition étant mobile, il faut que l'acquisition des différentes images de fluorescence soit assez rapide pour représenter le même site. Ceci peut être réalisé en utilisant un moteur pas à pas commandant un système de filtres tournant (Figure 3.1a et 3.1.b), ayant une fréquence au démarrage assez élevée, mais également avec une caméra commandable et possédant la commande obturation, qui permet l'acquisition d'une image en moins de 40 ms (cette durée est divisée par 'n', 'n' étant le facteur d'obturation). Si chaque image est prise en 10 ms et que la fréquence au démarrage du moteur peut atteindre 1000 Hz, une image 3D (correspondant à une profondeur de $3 \times e$), sera générée en 129 ms.

Si le nombre de facettes est plus important, la résolution de l'image en profondeur sera meilleure, mais cela exige une fréquence d'acquisition plus importante.

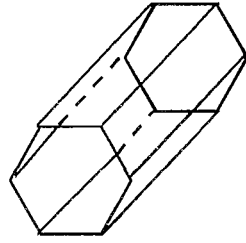


Figure 3.1.a : Exemple de pièce portant les filtres atténuateurs ; une facette sur deux porte un filtre

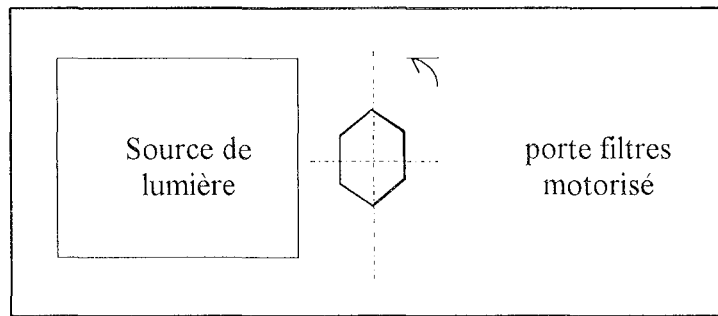


Figure 3.1.b : Disposition du porte filtres motorisé

Cette étude est basée sur une forme très simplifiée des phénomènes optiques qui ont réellement lieu au sein d'un tissu.

Nous pouvons également imaginer une matrice composée d'une juxtaposition d'un très grand nombre de filtres atténuateurs disposés de façon périodique et de telle sorte que dans un échantillon unitaire on retrouve toutes les atténuations possibles. Ainsi nous n'aurons pas besoin d'une commande mécanique pour varier la puissance lumineuse, le site sera excité simultanément avec toutes les puissance désirées. Cette solution à l'inconvénient de diminuer la résolution spatiale de l'image sur les plans perpendiculaires au faisceau lumineux, puisque un point de l'image correspond à la partie du site excité à travers un échantillon de la matrice de filtres.

4. Application simplifiée

Nous avons considéré le modèle de la pyramide présenté dans la figure 2.1. Nous avons alors préparé deux fantômes l'un simulant le tissu sain (en périphérie) et l'autre simulant le tissu tumoral (au centre).

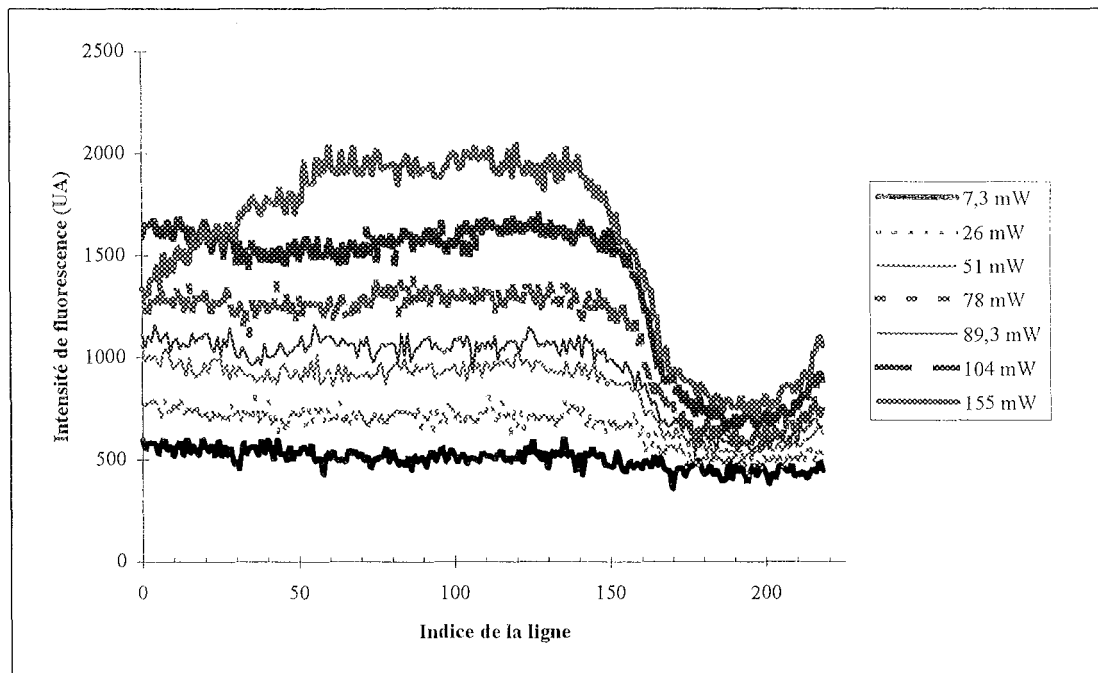
Nous avons considéré des fantômes avec et sans mTHPC, pour une excitation à 488 nm.

Le fantôme simulant le tissu sain (TS) est placé autour de celui simulant le tissu tumoral (TT). Les deux fantômes ont la même concentration de Rouge de méthyle (75 $\mu\text{g/ml}$) et

d'intralipides (100 $\mu\text{g/ml}$). Leur concentration en fluorescéine est de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ et 0.8 $\mu\text{g/ml}$ pour TT et TS respectivement.

Le fantôme global est irradié par un faisceau laser à 488 nm (Laser à Argon) avec une puissance qui varie de 7.3 mW à 155 mW. Des lignes profil sont mesurées sur une moitié de l'image de fluorescence de la pyramide.

La figure 4.1 représente ces lignes profils ainsi obtenues pour les différentes puissances d'excitation.



Figures 4.1 : Profils des intensités de vert des images de fluorescence à différentes puissances d'excitation et à 488 nm

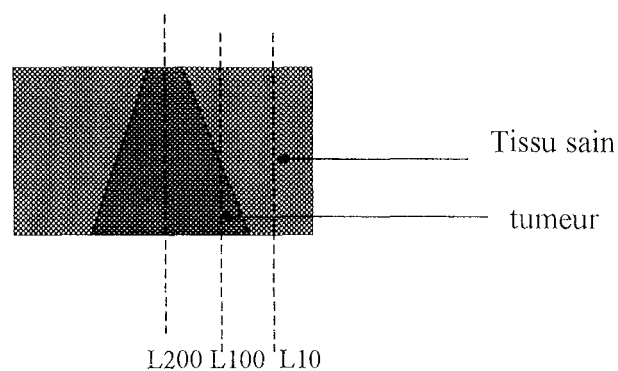


Figure 4.2 : Position des lignes profils sur le modèle pyramide

Plus la puissance augmente, plus la pénétration de la lumière augmente. Ceci se traduit par une différence dans le rapport de niveau de gris entre la région centrale du fantôme (de la

ligne 170 à la ligne 220) et la région moyenne (de la ligne 70 à la ligne 150), et entre la région moyenne et le bord de la pyramide (de la ligne 0 à la ligne 30).

La figure 4.3 représente la variation du niveau de gris autour de l'axe de symétrie de la pyramide pour trois lignes appartenant aux régions intéressantes également représentées sur le modèle pyramide de la figure 4.2.

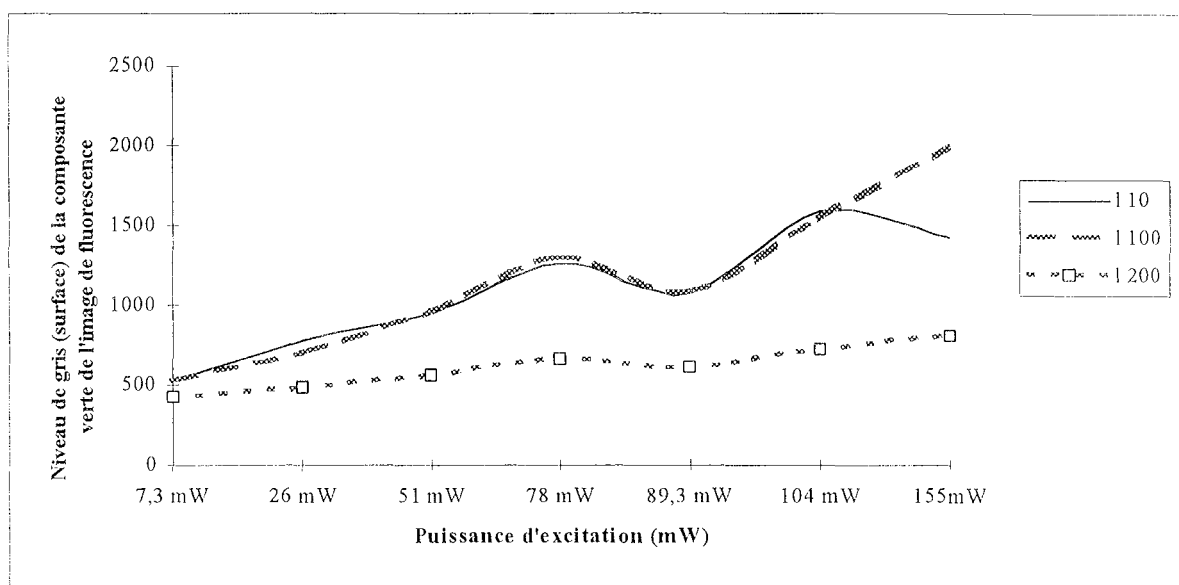


Figure 4.3 : Profils des lignes 10, 100 et 200 de la pyramide

Le profil de la ligne 100 est caractérisé par une zone croissante de 7.3 mW jusqu'à 78 mW, ensuite la courbe décroît à 89,3 mW puis augmente à nouveau. Il est probable que la première croissance est due à l'augmentation de la pénétration de la lumière qui de ce fait excite plus de molécules de fluorescéine. A une certaine puissance, le faisceau arrive au niveau du plastic séparant les deux fantômes qui par sa forme inclinée réfléchit une partie de la lumière et également la fluorescence à droite. Ainsi la fluorescence reçue sera plus faible. Enfin lorsque la puissance augmente encore, la lumière traverse la séparation et la quantité de fluorescence augmente d'avantage en provenance du fantôme simulant la tumeur.

Liste des tableaux

- Partie I, Chap. 2, Tableau 1.1 : Les fluorophores endogènes, p24
- Partie I, Chap. 3, Tableau 4.1 : Modèle de la peau, p34
- Partie I, Chap. 3, Tableau 2.1.1 : Récapitulatif sur les systèmes d'imagerie de fluorescence, p 46
- Partie IV, Chapitre 1, Tableau 3.1 : Ecart entre les composantes vertes des spectres d'émission de fluorescence des fluorophores choisis (NADH, Collagène, flavine, fluorescéine) par rapport au spectre de la main, p 138
- Partie IV, Chapitre 1, Tableau 3.2 : Intégrales des composantes vertes des spectres d'émission de fluorescence normalisés des fluorophores choisis (NADH, Collagène, flavine, fluorescéine) et de la main, p 138
- Partie IV, Chapitre 1, Tableau 3.3 : Décalage en nm des spectres d'émission de fluorescence en fonction de la concentration du rouge de méthyl, p 139
- Partie IV, Chapitre 1, Tableau 4.1.1 : Influence des intralipides sur le signal de fluorescence, p 143
- Partie IV, Chapitre 1, Tableau 4.3.5.1 : Réponse en imagerie et réponse spectrale modulée par le système d'imagerie en fonction de la variation de la concentration de la fluorescéine, l'HpD, la PpIX et la mTHPC, p 153
- Partie IV, Chapitre 2, Tableau 2.2.1.1 : Rapport signal sur bruit avant et après l'application du filtre Médian, du filtre de NAGAO, du filtre de rang adaptatif et du filtre de WIENER pour les fantômes F1F5 et M10M3, p 160
- Partie IV, Chapitre 2, Tableau 2.2.1.2 : Durée d'exécution sur le micro-processeur Pentium 75 MHz du filtre Médian, du filtre de NAGAO, du filtre de rang adaptatif et du filtre de WIENER de l'image F1F5 et M10M3, p 160
- Partie IV, Chapitre 2, Tableau 2.3.1 : Résultats quantitatifs de Globa pour le fantôme semi-virtuel de la figure 2.3.1, p 172
- Partie IV, Chapitre 2, Tableau 2.3.2 : Résultats quantitatifs de Globi pour le fantôme semi-virtuel de la figure 2.3.4, p 179
- Partie IV, Chapitre 2, Tableau 3.2.1.1 : Comparaison des rapports signal sur bruit de *hh-48* et *hm0* et *n0* avant et après restauration, p 185
- Partie IV, Chapitre 2, Tableau 3.2.2.1 : Valeurs de la différence de contraste avant et après l'application de S2 AHE D HSN et HSX sur la ligne profil de l'image de fluorescence de *hh-48* (figure 3.2.2.2), p 188

Partie IV, Chapitre 2, Tableau 3.2.2.2 : Temps relatif moyen d'exécution des algorithmes de rehaussement de contraste et ou de contour sur les images *hm0* et *hh48* (la valeur maximale correspond à 2.8 ms sur un Pentium 75 Mhz), p 188

Partie IV, Chapitre 2, Tableau 4.2.1.1 : Rapport signal sur bruit avant et après l'application des algorithmes de restauration sur la lésion du doigt, p 202

Partie IV, Chapitre 2, Figure 4.2.2.1 : Résultats du rehaussement de contraste sur une lésion bénigne du doigt, p 202

Partie IV, Tableau 5.2 : Réponse rouge et verte de la caméra avec cystoscope en fonction de la variation de la concentration des composés simulant les propriétés optiques des tissus, p 148

Partie IV, Tableau 6.1 : rapport signal sur bruit avant et après l'application du fenêtrage du filtre de NAGAO, du filtre de rang adaptatif et du filtre de WIENER pour les fantômes F1F5 et M10M3, p150

Liste des figures

Partie I

Chap. 1

Figure 4.2.4.1 : Spectres d'absorption comparés de l'HpD et de la mTHPC dans du méthanol à 1 µg/ml, p 21

Figure 4.2.4.2: Spectres de fluorescence comparés de l'HpD et de la mTHPC avec 10 % de sérum et à une longueur d'onde d'excitation de 396 nm, p 21

Chap. 4

Figure 1.1: Schéma simplifié d'un système de spectroscopie de fluorescence, p 40

Figure 1.2 : Schéma du spectrofluorimètre du CAV p 43

Figure 2.1.1 : Modèle simplifié d'un dispositif d'imagerie de fluorescence, p 45

Figure 2.3.1 : Système d'imagerie de fluorescence Suédois, p 49

Figure 2.7.1 : Schéma du bout de l'endoscope réalisé pour le diagnostic et le traitement par fluorescence, p 52

Partie II

Figure 1.1 : Schéma synoptique du système d'imagerie de fluorescence, p 63

Figure 2.1.1 : Réponses des filtres Cyan, jaune vert et Magenta de la caméra Cohu, p 65

Figure 2.1.2 : Diagramme fonctionnel de l'association des pixels dans une image couleur, p66

Figure 2.2.1 : Réponse en puissance de la CCD de la caméra Cohu, p 67

Figure 2.2.2 : Réponses RGB des filtres de la caméra Cohu, p 67

- Figure 2.2.3 : Réponse des filtres RGB en cascade avec le filtre passe-haut à 475 nm, p 68
- Figure 3.1 : Spectre d'émission de la source de lumière blanche, p 69
- Figure 3.2 : Spectre d'émission du laser Krypton, p 70
- Figure 3.3 : Spectre d'absorption de la mTHPC diluée dans du PBS avec 2% de sérum de veau fœtal, p 70
- Figure 4.1.1 : Schéma d'un cystoscope classique, p 71
- Figure 4.1.2 : Coupe transversale de la gaine, p 72
- Figure 4.1.3 : Caractéristiques de transfert de l'objet, p 72
- Figure 4.1.4 : Adaptation optique entre le cystoscope et la caméra, p 73
- Figure 4.2.1 : Boîtier optique d'obturation et de déviation des deux sources de lumière, p74
- Figure 4.2.2 : Réflexion de la lumière blanche par le miroir sphérique concave, p75
- Figure 4.2.3 : Principe d'action d'une lentille convergente et d'une lentille divergente sur un faisceau parallèle, p 76
- Figure 4.2.4 : Profil de l'intensité lumineuse en sortie de la fibre F₂, p 76
- Figure 5.1.1.a : Module d'obturation (vue de face), p 77
- Figure 5.1.1.b : Module d'obturation (vue de profil), p 77
- Figure 5.1.2 : Montage du moteur pas à pas sur le disque d'obturation D, p 78
- Figure 6.2.1 : Schéma descriptif de la carte de mise en forme du signal photoélectrique, p82
- Figure 7.1 : Chronogramme des signaux échangés entre le PC, le capteur et le micro-contrôleur, p 83
- Figure 7.2 : Organigrammes des programmes de commandes du moteur et de la carte d'acquisition d'images, p 84
- Partie III**
- Figure 2.3.1.1 : Masques de NAGAO, p 93
- Figure 2.1.5.1 : Image d'autofluorescence d'une souris nude, p 95
- Figure 2.1.5.2 : Résultats de l'application du filtre médian, du filtre de NAGAO, du filtre de rang adaptatif et du filtre de WIENER sur l'image b. de la figure 2.1.5.1, p 96
- Figure 2.1.5.3 : Durée d'exécution des algorithmes de restauration, p 97
- Figure 2.1.5.4 : Choix des régions d'intérêt pour le signal et le bruit dans l'image d'autofluorescence de la souris nude, p 97
- Figure 2.1.5.5 : Comparaison du rapport signal sur bruit sur une moyenne de 7 images avant (entrée) et après application de 4 algorithmes de restauration (NAGAO, rang, WIENER et le filtre Médian), p 98

Figure 2.2.2.6.1 : Image d'une lésion cutanée non maligne (après changement d'échelle), p103

Figure 2.2.2.6.2 : résultats obtenus avec HS (avec décalage vers les grandes intensités) pour différentes valeurs de f et pour un masque de taille 5, p103

Figure 2.2.3.1 : Noyaux de SOBEL, p 104

Figure 2.2.3.2 : Effet de variation du coefficient α sur le rehaussement de contour par DERICHE de l'image de la figure 2.2.3.2, p 106

Figure 2.2.4.1 : Application de AHE (avec un masque de taille 3), HS (avec $f=0.8$ et un masque de taille 5), SOBEL (à deux directions et à 8 directions) et DERICHE (avec $\alpha=0.8$), sur l'image d'autofluorescence de la souris nude, p 108

Figure 2.2.4.2 : Durée d'exécution des algorithmes de rehaussement de contraste et de contour, p 108

Figure 2.2.4.3 : Contraste relatif des algorithmes de rehaussement de contraste et de contours, p 109

Figure 2.3.5.1: Résultats obtenus avec l'algorithme de relaxation avec des moyennes initiales différentes, p120

Figure 2.3.5.2 : Résultats de la segmentation de l'image d'autofluorescence d'une souris nude, respectivement et de gauche à droite, par ISODATA et algorithme de relaxation, p121

Figure 2.3.5.3 : Durée d'exécution des algorithmes de segmentation, p 121

Figure 3.1.1 : Représentation schématique du chemin parcouru par la fluorescence depuis le tissu jusqu'à la conversion en mode RGB, p 123

Figure 3.1.2 : Représentation du chemin parcouru par la fluorescence depuis le tissu jusqu'à la conversion en mode RGB avec les fonctions, p 123

Figure 3.2.1 : Organigramme de traitement d'images appliqué dans le cas du diagnostic par fluorescence induite, p126

Figure 3.2.2 : Etude de la variation du signal de fluorescence d'un fantôme en fonction de la puissance d'excitation (LASER Krypton), p 127

Figure 3.3.1 : Organigramme de traitement d'images appliqué dans le cas du diagnostic par autofluorescence, p 128

Partie IV

Figure 1.1.1 : Réponse de l'œil, p 131

Figure 1.2.1 : Spectre d'autofluorescence de la paume de la main normalisé en unités proches des nanowatts, p 132

- Figure 1.2.2 : Produit du spectre d'autofluorescence de la main par les réponses RVB de la caméra, p 133
- Figure 2.1.1 : Espérances mathématiques et écarts type du bruit, p 134
- Figure 2.2.1 : Variation de l'espérance mathématique du bruit de fond en fonction de la puissance d'excitation, p 134
- Figure 2.2.2 : Variation de l'écart type du bruit en fonction de la puissance d'excitation, p 135
- Figure 3.1 : Spectre d'absorption du rouge de méthyle, p 136
- Figure 3.2 : Spectres d'émission de fluorescence de certains fluorophores en comparaison avec la paume de la main, pour une excitation à 410 nm, p 137
- Figure 3.3 : Composantes vertes des spectres de fluorescence des fluorophores en comparaison avec la paume de la main, pour une excitation à 410 nm, p 137
- Figure 4.1.1 : Réponse de la caméra en fonction de la variation de la diffusion ($I=10..100\mu\text{g/ml}$; $F= 5\mu\text{g/ml}$; $\lambda= 410\text{ nm}$), p 141
- Figure 4.1.2 : Réponse de la caméra en fonction de la variation de la diffusion ($I=10..100\mu\text{g/ml}$; $F= 5\mu\text{g/ml}$; $RM = 50\ \mu\text{g/ml}$), p 142
- Figure 4.1.3 : Réponse de la caméra en fonction de la variation de la diffusion ($I=10..100\mu\text{g/ml}$; $F= 5\mu\text{g/ml}$; $RM = 10\ \mu\text{g/ml}$), p 142
- Figure 4.2.1 : Réponses RV de la caméra en fonction de la variation de l'absorption, p 143
- Figure 4.2.2: Intégrales des spectres RV en fonction de la variation de l'absorption, p 144
- Figure 4.3.1.1 : Variation des intensités de vert (I_v) et de rouge (I_r) de la caméra pour $RM= 20\ \mu\text{g/ml}$; $I=100\ \mu\text{g/ml}$; $F=0..25\ \mu\text{g/ml}$; $\lambda= 410\text{ nm}$, $P= 15\text{ mW/cm}^2$; optique : cystoscope, p 144
- Figure 4.3.1.2 : Superposition du spectre d'émission de fluorescence d'un fantôme à base de fluorescéine avec les fonctions de transfert RV du système d'acquisition, p 143
- Figure 4.3.1.3 : Spectre d'émission de fluorescence (F) et spectres RV (R.F et V.F) d'un fantôme à base de fluorescéine, p 145
- Figure 4.3.1.4: Intégrales des spectres RV en fonction de la concentration de la fluorescéine($RM=20\ \mu\text{g/ml}$, $I = 100\ \mu\text{g/ml}$, $F = 0..25\mu\text{g/ml}$, $\lambda= 410\text{ nm}$; $P=15\text{mW/cm}^2$), p146
- Figure 4.3.2.1 : Étude de la réponse de la caméra en fonction de la variation de la concentration de la mTHPC (avec $RM = 20\ \mu\text{g/ml}$ et $I = 20\ \mu\text{g/ml}$; Excitation ($\lambda = 410\text{ nm}$; 15 mW/cm^2), p 147

Figure 4.3.2.2: Superposition du spectre d'émission de fluorescence de la mTHPC aux réponses RV du système d'acquisition d'images, p 148

Figure 4.3.2.3 : Intégrales des spectres RV en fonction de la concentration de la mTHPC (avec : $I = 100 \mu\text{g/ml}$; $RM = 20 \mu\text{g/ml}$; $\lambda=410 \text{ nm}$ $P=15 \text{ mW/cm}^2$), p 148

Figure 4.3.3.1: Réponse de la caméra en fonction de la variation de la concentration de PpIX (avec : $RM = 20 \mu\text{g/ml}$; $I = 100 \mu\text{g/ml}$; $\lambda = 410 \text{ nm}$ $P= 15 \text{ mW/cm}^2$), p 149

Figure 4.3.3.2: Superposition du spectre d'émission de fluorescence de la PpIX aux réponses RV du système d'acquisition d'images, p 149

Figure 4.3.3.3 : Intégrales des spectres RV en fonction de la concentration de la PpIX ($I = 100 \mu\text{g/ml}$; $RM = 20 \mu\text{g/ml}$; $\lambda =410 \text{ nm}$), p 150

Figure 4.3.4.1 : Réponse de la caméra en fonction de la variation de la concentration de l'HpD ($RM = 20 \mu\text{g/ml}$; $I = 100 \mu\text{g/ml}$; $\lambda = 410 \text{ nm}$ $P= 15 \text{ mW/cm}^2$), p 151

Figure 4.3.4.2 : Superposition du spectre d'émission de fluorescence de l'HpD aux réponses RV du système d'acquisition d'images, p 151

Figure 4.3.4.3 : Intégrales des spectres RV en fonction de la concentration de l'HpD ($I = 100 \mu\text{g/ml}$; $RM = 20 \mu\text{g/ml}$; $\lambda = 410 \text{ nm}$), p 152

Figure 1.1 : Représentation schématique des images sources des algorithmes de restauration de rehaussement de contraste ou de contour et de segmentation (HE : Histogram Equalisation, AHE Adaptative Histogram Equalisation, HSN : Histogram Shifting /Minimum ; HSX : Histogram Shifting /Maximum), p 157

Figure 1.2 : Représentation schématique des images sources des algorithmes Globaux de traitement d'images : Globa (autofluorescence) et Globi (fluorescence induite), p 157

Figure 2.2.1.1: Images du fantôme F1F5 avant et après application du filtre Médian du filtre de rang adaptatif de taille 5, du filtre de NAGAO et du filtre de WIENER, p 159

Figure 2.2.1.2: Images du fantôme M10M3 avant et après application du filtre Médian du filtre de rang adaptatif de taille 5, du filtre de NAGAO et du filtre de WIENER, p 159

Figure 2.2.2.1 : Résultats du rehaussement de contraste sur le fantôme F1F5 avant et après application des algorithmes de rehaussement de contraste (HE (Histogram Equalisation), AHE (Adaptative Histogram Equalisation), HSN (Histogram Shifting/Minimum, HSX(Histogram Shifting/Maximum), S2 (SOBEL à 2 directions), S8 (SOBEL à 8 directions) et D (Deriche), P 161

Figure 2.2.2.2. : Résultats du rehaussement de contraste sur le fantôme M10M3 avant et après application de HE (Histogram Equalisation), AHE (Adaptative Histogram

Equalisation), HSN (Histogram Shifting/Minimum, HSX(Histogram Shifting/Maximum), S2 (SOBEL à 2 directions), S8 (SOBEL à 8 directions) et D (DERICHE), P 162

Figure 2.2.2.3. : Contraste introduit par les algorithmes de rehaussement de contraste et de contour pour les fantômes F1F5 et M10M3 (256x256 pixels) (a. position de la ligne profil sur F1F5 et b. position de la ligne profil sur M10M3), p 163

Figure 2.2.2.4 : Histogrammes des images obtenues après D, HSN, HSX, AHE et S2 sur F1F5(a. position de la région d'intérêt sur une image résultat, b. figures des histogrammes), p 164

Figure 2.2.2.5 : Durée d'exécution des algorithmes de rehaussement de contraste et de contour pour les fantômes F1F5 et M10M3 (256x256 pixels), p 165

Figure 2.2.3.1 : Application de ISODATA et de l'algorithme de relaxation sur une image virtuelle (l'image entière correspond à S=100%), p 166

Figure 2.2.3.2 : Application de ISODATA et de l'algorithme de relaxation sur une image semi-virtuelle de fantômes à base de fluorescéine, p 167

Figure 2.2.3.3 : Application de ISODATA et de l'algorithme de relaxation sur une image semi-virtuelle de fantômes à base de PpIX, p 167

Figure 2.2.3.4 : Résultats de l'application de ISODATA (c.) et de l'algorithme de relaxation (d.) sur l'image de fluorescence de F1F5 (b.) dont l'histogramme de départ est donnée en (a.), p 169

Figure 2.2.3.5: Résultats de l'application de ISODATA (c.) et de l'algorithme de relaxation (d.) sur l'image de fluorescence de M10M3 (b.) dont l'histogramme de départ est donnée en (a.), p 169

Figure 2.3.1. : Application de Globa sur un fantôme semi-virtuel à base de fluorescéine (FT : fantôme central simulant la tumeur; FS : fantôme périphérique simulant le tissu sain), p 171

Figure 2.3.2 : Application de Globa avec un choix quantitatif sur une image virtuelle de 40x40 pixels, p 171

Figure 2.3.3 : Application de Globa sur les composantes vertes des images de fluorescence et en lumière blanche de F1F5 avec un choix quantitatif ($P=15 \text{ mW/cm}^2$ $\lambda = 410 \text{ nm}$), p 174

Figure 2.3.4 : Application de Globa sur les composantes vertes des images de fluorescence et en lumière blanche de F1F5 avec un choix qualitatif ($P=15 \text{ mW/cm}^2$ $\lambda = 410 \text{ nm}$), p 176

Figure 2.3.5. : Application de Globa sur l'image de fluorescence et en lumière blanche de CF5F25 avec un choix quantitatif($p = 15 \text{ mW/cm}^2$; $\lambda = 410 \text{ nm}$), p 177

Figure 2.3.6 : Application de Globa sur CF5F25 avec un choix qualitatif, p 177

Figure 2.3.7 : Application de Globi sur les composantes rouges des images de fluorescence et en lumière blanche d'une image semi-virtuelle à base de PpIX (FS : fantôme simulant le tissu sain ; FT fantôme simulant la tumeur), p 178

Figure 2.3.8 : Application de Globi sur les composantes rouges des images en lumière blanche et de fluorescence de M10M3 avec un choix quantitatif ($P= 15 \text{ mW/cm}^2$; $\lambda = 410 \text{ nm}$), p 180

Figure 2.3.9 : Application de Globi sur les composantes rouges des images en lumière blanche et de fluorescence de M10M3 avec un choix qualitatif ($P= 15 \text{ mW/cm}^2$; $\lambda = 410 \text{ nm}$), p 181

Figure 3.2.1.1 : Application des algorithmes de restauration sur l'image de fluorescence de *hm0* après expansion dynamique, p 183

Figure 3.2.1.2 : Application des algorithmes de restauration sur l'image de fluorescence de *hh48* après expansion dynamique, p 184

Figure 3.2.1.3 : Application des algorithmes de restauration sur l'image de fluorescence de *n0* après expansion dynamique, p 184

Figure 3.2.2.1. : Résultats du rehaussement de contraste sur *hm0* avant et après l'application de HE, AHE, HSN, HSX, S2, S8 et D (HE : Histogram Equalisation ; AHE Adapataitive Histogram Equalisation ; HSN Histogram Shifting /Minimum ; HSX : Histogram Shifting Maximum ; D : DERICHE), p 186

Figure 3.2.2.2. : Résultats du rehaussement de contraste sur *hh48* avant et après l'application de HE, AHE, HSN, HSX, S2, S8 et D (HE : Histogram Equalisation ; AHE Adapataitive Histogram Equalisation ; HSN Histogram Shifting /Minimum ; HSX : Histogram Shifting Maximum ; D : DERICHE ; LP : ligne profile), P 186

Figure 3.2.2.3. : Résultats du rehaussement de contraste sur *n0* avant et après l'application de HE, AHE, HSN, HSX, S2, S8 et D (HE : Histogram Equalisation ; AHE Adapataitive Histogram Equalisation ; HSN Histogram Shifting /Minimum ; HSX : Histogram Shifting Maximum ; D : DERICHE), p 187

Figure 3.2.3.1 : Résultats de l'application de ISODATA et de l'algorithme de relaxation sur *hm0*, p 189

Figure 3.2.3.2: Résultats de l'application de ISODATA et de l'algorithme de relaxation sur l'image *hh48*, p 189

Figure 3.2.3.3: Résultats de l'application de ISODATA et de l'algorithme de relaxation sur l'image *n0*, p 189

Figure 3.3.1. : Superposition des spectres d'autofluorescence de la tumeur et du tissu sain de la souris hairless (*hm*) qui sera injecté en mTHPC (hm0_TS : tissu sain avant injection de mTHPC ; hm0_TT : tissu tumoral avant injection de mTHPC), p 191

Figure 3.3.2 : Applications de Globa sur *hm0*, p 191

Figure 3.3.3. : Superposition des spectres d'autofluorescence de la tumeur et du tissu sain de la souris hairless (*hh*) qui sera injecté en HpD (hh0_TS : tissu sain avant injection de l'HpD; hh0_TT : tissu tumoral avant injection de l'HpD), p 192

Figure 3.3.4. : Superposition des spectres d'émission de fluorescence de la tumeur et du tissu sain de la souris hairless (*hh*) 48 heures après l'injection de l'HpD (hh48_TS : tissu sain 48 heures après injection de l'HpD; hh48_TT : tissu tumoral 48 heures après injection de l'HpD), p 193

Figure 3.3.5 : Application de Globi sur *hh48*, p 194

Figure 3.3.6. : Superposition des spectres d'émission de fluorescence de la tumeur et du tissu sain de la souris hairless (*hm*) 48 heures après l'injection de la mTHPC (hm48_TS : tissu sain ; hm48_TT : tissu tumoral), p 195

Figure 3.3.7 : Application de Globi sur *hm48*, p 196

Figure 3.3.8. : Superposition des spectres d'autofluorescence de la tumeur et du tissu sain de la souris nude *na* (na0_TS : tissu sain; na0_TT : tissu tumoral), p 197

Figure 3.3.9. : Superposition des spectres de fluorescence de la tumeur et du tissu sain de la souris nude *na* 3 heures après l'injection de l'ALA (na3_TS : tissu sain; na3_TT : tissu tumoral), p 198

Figure 3.3.10 : Application de Globi sur les images en lumière blanche et de fluorescence de *na*, 3 heures après l'injection de l'ALA, p 198

Figure 3.3.11. : Superposition des spectres d'autofluorescence de la tumeur et du tissu sain de la rate *ra* (ra0_TS : tissu sain; ra0_TT : tissu tumoral), p 199

Figure 3.3.12. : Superposition des spectres de fluorescence de la tumeur et du tissu sain de la rate *ra* 8 heures après l'injection de l'ALA (ra8_TS : tissu sain; ra8_TT : tissu tumoral), p200

Figure 3.3.13 : Application de Globi sur les images en lumière blanche et de fluorescence de *ra*, 8 heures après l'injection de l'ALA, p 200

Figure 3.2.1.1 : Application des algorithmes de restauration sur l'image de fluorescence d'une lésion bénigne du doigt après expansion dynamique, p 203

Figure 4.2.2.2 : Lignes profils sur les images de la lésion du doigt après l'application de HSX (Histogram Shifting/Maximun) et du filtre de DERICHE, p 204

Partie IV, Chapitre 2, Figure 4.2.3.1 : Résultats de l'application des deux algorithmes de segmentation sur l'image de fluorescence de la lésion du doigt, p 204

Figure 4.3.1 : Application de sur les images de fluorescence et en lumière blanche de la lésion du doigt avec un choix quantitatif, 205

Figure 4.3.2 : Application de Globa sur les images de fluorescence et en lumière blanche de la lésion du doigt avec un choix qualitatif, p 206

Figure 4.3.3 : Application de Globa sur les images de fluorescence et en lumière blanche d'un naevus du bras avec un choix quantitatif, p 207

Figure 4.3.4 : Application de Globa sur les images de fluorescence et en lumière blanche d'un naevus du bras avec un choix qualitatif, p 207

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Figure 1 : Distribution spectrale de la lampe Xénon CERMAX- Société Equipement Scientifiques, p 212

Figure 2 : Module optique, p 214

ANNEXE B

Figure AB1 : Diagramme de Jablonski, p 231

ANNEXE 3D

Figure 2.1 : Fantômes simulants une tumeur infiltrante et un tissu sain, p 237

Figure 3.1.a : Exemple de pièce portant les filtres atténuateurs ; Une facette sur deux porte un filtre, p 238

Figure 3.1.b : Disposition du porte filtres motorisé, p 238

Figures 4.1 : Profils des intensités de vert des images de fluorescence à différentes puissances d'excitation et à 488 nm, p 239

Figure 4.2 : Position des lignes profils sur le modèle pyramide, p 239

Figure 4.3 : Profils des lignes 10, 100 et 200 de la pyramide, p 240

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur JACQUET Serge, Professeur, IUT de Mulhouse,
Monsieur VILLERMAINLECOLIER Gérard, Professeur, IAM/Université de Reims,
Monsieur SCHULTZ Guy, Professeur, IUT de Mulhouse.

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Mademoiselle KHEMIS Kamila

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une
thèse intitulée :

**"Imagerie de fluorescence en cancérologie : Spectroscopie, traitement du
signal et gestion automatisée pour l'optimisation du diagnostic des
tumeurs précoces."**


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 1998**

Le Président de l'I.N.P.L.,


J. HARDY



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDOEUVRE CEDEX

RESUME

Un système d'imagerie de fluorescence a été développé pour permettre le diagnostic des tumeurs superficielles ou endoscopiques en autofluorescence ou en fluorescence induite.

Ce système comprend une source LASER et une lumière blanche, focalisées sur une fibre optique. Leurs rôles respectifs sont de générer les images de fluorescence et de lumière blanche qui sont acquises de façon séquentielle par une caméra couleur (adaptée à l'outil endoscopique), puis digitalisées et visualisées sur le moniteur. Le passage d'une source à l'autre se fait par un obturateur mécanique contrôlé par un moteur pas à pas, lequel est commandé par un micro-contrôleur.

Deux algorithmes sont développés en Windows C++ (Globa et Globi) et permettent respectivement un diagnostic en autofluorescence ou en fluorescence induite. Le deuxième algorithme comporte une étape supplémentaire par rapport au premier : il s'agit de la suppression du signal d'autofluorescence qui est effectuée après l'étude de la séparation fréquentielle de la caméra. Les étapes communes du traitement d'image sont le filtrage de l'image globale, suivi de la correction de l'image de fluorescence par rapport à la distribution du faisceau d'excitation en exploitant l'image en lumière blanche, puis le rehaussement de contraste ou la segmentation de l'image de fluorescence selon le choix de l'opérateur.

Les algorithmes ont été testés sur des fantômes, sur des souris et des rates avec et sans photosensibilisant (HpD, mTHPC et ALA). De bons résultats (applications endoscopiques) sont obtenus avec les fantômes : identification correcte des régions simulant la tumeur et le tissu sain avec des niveaux de gris qui permettent de retrouver la concentration du photosensibilisant de chaque zone. Dans le cas des applications superficielles *in-vivo*, l'identification des tumeurs n'est pas toujours possible à cause de l'hétérogénéité de la fluorescence dans une région donnée. Les mesures spectrales effectuées sur ces sites confirment la non sélectivité du signal de fluorescence entre tissus sain et pathologique.

Cette étude suggère une association de la spectroscopie à l'imagerie de fluorescence en temps réel pour optimiser le choix des points de mesure en spectroscopie, ainsi que l'amélioration de l'instrumentation pour aboutir à des applications endoscopiques *in-vivo*.

MOTS CLES : Imagerie, spectroscopie, fluorescence, traitement d'images, diagnostic, oncologie.

FLUORESCENCE IMAGING APPLIED TO CANCEROLOGY :

Spectroscopy and image processing optimisation for early cancer diagnosis

ABSTRACT

The imaging system we have developed permit the diagnosis of superficial and endoscopic tumours with and without photosensitizer.

It is composed of a LASER and a white light source which are focalised on the same optical fiber. Their sequential outputs leads to the formation of white light and fluorescence images of the same site. These images are acquired with a colour CCD camera for which an optical adaptation to the endoscope have been developed. Then, they are digitised and displayed. The alternation of light sources is achieved by a mechanical shutter driven by a step by step engine which is controlled with a micro-controller.

Two Windows C++ programs (Globa and Globi) have been developed respectively for autofluorescence and induced fluorescence diagnosis. The second algorithm has a supplementary task compared with the first one which consists of autofluorescence suppression. This operation is achieved after the study of the spectral camera responses. The common steps in image processing are image restoration applied to both images, fluorescence image correction as a function of light distribution using white light image, then fluorescence image enhancement or segmentation, depending on operator choice.

These programs have been tested on phantoms, mice and rats, with and without photosensitizers (mTHPC, HpD and ALA). Good results are obtained with phantoms : identification of healthy and cancerous tissues like phantoms is good and quantitative information leads to the knowledge of photosensitizer concentration of each region. In the case of *In-vivo* images (superficial applications), tumour identification is not always possible because fluorescence signal is not always homogenous in healthy or cancerous tissues, hence spectroscopic (point measurement) and imaging (global measurement) results are not correlated.

Real time diagnosis using spectroscopy and imaging would lead to correlation of global and local measurements. *In-vivo* endoscopic application should be possible after the optimisation of instrumentation.

KEY WORDS : Imaging, spectroscopy, fluorescence, image-processing, diagnosis, oncology.

DISCIPLINE : Automatique et Traitement Numérique du Signal.

LABORATOIRES : CRAN, Centre Alexis Vautrin, avenue de bourgogne 54511 Vandoeuvre.