

Spectro-imagerie endoscopique d'autofluorescence et cartographie 2D pour la localisation et le diagnostic *in situ* de lésions cancéreuses

Autofluorescence endoscopic spectro-imaging and 2D-cartography for *in situ* localisation and diagnosis of cancerous lesions

W. C. P. M. Blondel^{1, 2}, Ch. Daul^{1, 2}, S. Villette³,
R. Miranda-Luna^{1, 2}, Y. Hernandez-Mier^{1, 2}, G. Bourg-Heckly³
et D. Wolf^{1, 2}

¹ Nancy Université, ² CRAN UMR 7039 CNRS-INPL-UHP, 2 avenue de la forêt 54500 Vandœuvre - Lès-Nancy, France, ³ BioMoCeTi UMR 7033 CNRS-UPMC – génopôle Campus 1, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry Cedex
{walter.blondel,christian.daul,didier.wolf}@ensem.inpl-nancy.fr
g.bourg-heckly@ccr.jussieu.fr

Manuscrit reçu le 8 juillet 2005



Résumé et mots clés

Le diagnostic précoce est le moyen le plus efficace de lutte contre le cancer. Parmi toutes les techniques possibles, les méthodes optiques (photodiagnostic du proche UV au proche IR) présentent des caractéristiques importantes recherchées par les médecins : grande sensibilité, radiations non ionisantes et mesures atraumatiques. Elles sont particulièrement bien adaptées à la détection des cancers des organes creux, par nature superficiels et difficilement décelables en endoscopie classique. Cet article décrit une approche méthodologique fondée sur l'exploitation de l'autofluorescence tissulaire, applicable en endoscopie clinique, et conduisant à l'élaboration d'indicateurs diagnostiques issus des paramètres spectraux. Après un état de l'art sur les méthodes spectroscopiques (LIFS) et d'imagerie endoscopique d'autofluorescence, nous montrons l'efficacité de la LIFS fibrée en terme de sensibilité et de spécificité pour le diagnostic de lésions cancéreuses de l'œsophage (étude clinique sur 25 patients). Nous présentons ensuite les caractéristiques technologiques et le calibrage du prototype d'imageur endoscopique d'autofluorescence développé. Une seconde partie traite du pré-traitement, du recalage et du mosaïquage des images endoscopiques appliqués à la construction automatique d'une image panoramique (cartographie) à partir de séquences vidéos des zones explorées de l'organe. Finalement, en exploitant les informations de fluorescence fournies par l'imageur, la faisabilité d'une superposition des informations spatiale et spectrale est validée sur fantôme.

Spectroscopie *in vivo*, pré-traitement et recalage d'images endoscopiques, mosaïquage, autofluorescence, instrumentation, cancer.

Abstract and key words

Early diagnosis is the most efficient way to struggle against cancer. Among all the existing techniques, optical methods (photodiagnosis from NUUV to NIR) show important characteristics required by the physicians : high sensitivity,

non-ionising radiations and non-traumatic measurements. They are particularly well suited to the detection of cancers in hollow organs, that are usually superficial and hardly visible with classical endoscopy. This paper describes a methodological approach based on the use of tissue autofluorescence, applicable in clinical endoscopy, and leading to the definition of diagnosis indicators from the spectral parameters. Following a state-of-the-art on autofluorescence spectroscopic (LIFS) and endoscopic imaging methods, we present the efficiency of fibered LIFS in terms of sensitivity and specificity for the diagnosis of esophagus cancerous lesions (clinical study over 25 patients). We then present the technological characteristics of an autofluorescence endoscopic imaging prototype developed in our labs as well as its calibration. A second part is devoted to endoscopic image registration and mosaicing and to optics aberration correction in perspective of the automatic construction of a panoramic image (cartography) of the organ's explored areas. Finally, exploiting the fluorescence data provided by the imager, the feasibility of the superimposition of spatial and spectral information is validated with a phantom.

In vivo Spectroscopy, endoscopic image registration and pre-processing, mosaicing, autofluorescence, instrumentation, cancer.

Remerciements

Les auteurs remercient Jean-Marie Munier pour sa contribution précieuse à l'ingénierie du dispositif d'imagerie, Yann Burdin pour son aide au recueil des images et Céline Frochot (DCPR – UMR CNRS 7630, Nancy) pour la fourniture du marqueur fluorescent. Les auteurs remercient également le CNRS (département STIC), la Région Lorraine et l'UHP (BQR), ainsi que la ligue régionale de lutte contre le cancer (CD54, CD52) pour leur soutien financier substantiel.



1. Introduction

1.1. Contexte et enjeux médico-économiques

L'ensemble des cancers représente la deuxième cause de mortalité dans les pays industrialisés. Plus de 85 % des cancers prennent naissance dans les couches superficielles (épithélium) des organes du corps humain dont 50 % au sein des muqueuses des organes creux, [Skala, Backman]. Dans ce cas, l'endoscopie est indiquée pour l'examen et la détection des lésions des voies aériennes (trachée, bronches) et digestives supérieures (œsophage, estomac, duodénum) et basses (intestin, côlon), ainsi que des voies uro-génitales (urètre, vessie, utérus). Pour ces cancers d'origine épithéliale, la détection à un stade précoce est un enjeu majeur car elle permet une augmentation importante des chances de guérison tout en utilisant des traitements moins agressifs et aux coûts réduits. Si l'endoscopie conventionnelle en lumière blanche permet d'identifier les cancers suffisamment avancés (modification significative de l'aspect macroscopique de la muqueuse), la visualisation *in situ* des états précancéreux et cancéreux précoces est en revanche plus difficile.

Actuellement, les stratégies courantes de surveillance et de détection de ce type de lésion préconisent des endoscopies périodiques (1 à 3 ans). L'examen visuel, en lumière blanche, de l'aspect macroscopique de la surface de la muqueuse permet de

repérer les zones suspectes visibles qui seront alors biopsiées pour déterminer la nature histo-pathologique exacte du tissu. En l'absence d'anomalie remarquable, un certain nombre de biopsies est réalisé de façon plus ou moins aléatoire. Pour certaines pathologies, un quadrillage biopsique systématique est recommandé sur l'ensemble de la muqueuse (exemple: protocole Seattle, tous les 2 cm pour l'œsophage) [Kara]. Mais cette procédure lourde possède une sensibilité médiocre du point de vue clinique. Par ailleurs, certaines lésions (tumeurs de la vessie par exemple) sont par nature multifocales, ce qui rend les résections délicates car d'autres tumeurs peuvent être présentes à des endroits où elles ne sont pas encore visibles [Demos].

1.2. Intérêt du photodiagnostic

L'application de l'optique-photonique aux sciences de la vie (biophotonique), en particulier dans le domaine du spectre électromagnétique allant de l'UltraViolet (UV) à l'InfraRouge (IR), vise à exploiter les interactions de la lumière avec les tissus biologiques à des fins thérapeutiques (chirurgie laser, thérapie photodynamique, photothérapie), d'analyses biologiques (microscopies optiques, micromanipulation laser, biopuces...) et diagnostiques (caractérisation des tissus sains et pathologiques). Les méthodes de diagnostic optique (photodiagnostic) présentent des avantages par rapport aux méthodes de diagnostic clas-

siques (rayons X, IRM...), liés à leur grande sensibilité, à la nature non ionisante de la lumière et au caractère atraumatique (non invasif) de la mesure. Les propriétés optiques des tissus biologiques sont fonction de leur composition biochimique et de leur structure cellulaire et tissulaire. Les mesures optiques ont ainsi un fort potentiel de développement d'outils non invasifs de diagnostic médical *in vivo in situ* (biopsie optique) [Thueller, Rollins]. Différents types de propriétés optiques peuvent être mesurées en exploitant les phénomènes de fluorescence, d'absorption, de diffusion élastique et inélastique, qui fournissent des informations complémentaires [Bigio]. Au cours des dix dernières années, la sensibilité et la spécificité en terme de détection de néoplasies précoces ont été évaluées pour plusieurs nouvelles techniques endoscopiques de diagnostic, les plus répandues étant l'imagerie de fluorescence et d'autofluorescence et la spectroscopie d'autofluorescence et de diffusion [Benavides, Demos, Goujon].

En cancérologie, la spectroscopie ponctuelle des tissus (surface sondée de l'ordre du mm^2) a pour objectif la détection de lésions précancéreuses et cancéreuses précoces à un stade où elles sont encore non décelables pour l'endoscopie en lumière blanche. En permettant de guider les biopsies, la méthode doit conduire à une amélioration significative de la sensibilité, voire de la spécificité du diagnostic endoscopique et aider à la détermination de marges tumorales plus précises au niveau thérapeutique et chirurgical [Thueller]. Les différentes méthodes de spectroscopie optique actuellement en cours d'évaluation utilisent la fluorescence, la diffusion élastique et/ou la diffusion Raman. Historiquement la première à être utilisée à des fins diagnostiques, la fluorescence reste aujourd'hui le phénomène le plus exploité et donne lieu à la majorité des travaux de recherche en photodiagnostic, tant fondamentaux que cliniques [Ramanujam-00]. L'approche spectroscopique de par sa grande résolution spectrale, constitue une étape primordiale de caractérisation spectrale de l'émission d'autofluorescence des tissus humains aux différents stades du développement tumoral. Celle-ci permet ensuite le développement de systèmes d'imagerie (endoscopique) possédant une plus grande résolution (couverture) spatiale (surface observée de l'ordre du cm^2) et une résolution spectrale réduite (quelques bandes de longueurs d'ondes choisies). Elle permet notamment de préciser et d'optimiser le seuillage des images de rapports de bandes spectrales (vert/rouge par exemple) compte tenu des fluorophores endogènes d'intérêt [Goujon, Haringsma].

Lors d'un examen endoscopique classique de la paroi interne d'un organe creux, le praticien réalise un premier diagnostic et enregistre une ou plusieurs séquences d'images de plusieurs minutes. Cependant, ce type de support vidéo reste peu exploité en post-opératoire (très grand volume d'information, recherche fastidieuse dans les séquences, durée des séquences de plusieurs minutes, etc.). Généralement, le médecin repère les sites suspects qu'il a localisés et les biopsies effectuées en les re-dessinant sur un croquis ou une photographie de l'organe, support papier auquel il peut alors se référer pour son compte-rendu opératoire et dans le cas d'examen répétés du même

patient (contrôle de l'évolution de la maladie et/ou du traitement). Actuellement, aucune méthode n'existe pour fournir au clinicien de façon automatique un support global, pratique et combinant les informations spatiales et spectrales (sous la forme d'une carte ou de quelques cartes 2D de zones partielles de l'organe). Cette approche permettrait un gain de temps et d'efficacité substantiels, ainsi qu'une réduction des données redondantes (recouvrement spatial des images consécutives dans la séquence vidéo) [Miranda-05].

L'objectif de cet article est de présenter les résultats de travaux menés dans le domaine de la spectro-imagerie endoscopique d'autofluorescence appliquée à la détection, à la localisation et au diagnostic de lésions cancéreuses. Partant de résultats de caractérisation spectrale de tissus sains et tumoraux obtenus en spectroscopie d'autofluorescence *in vivo in situ*, nous présentons les principales caractéristiques du système d'imagerie endoscopique d'autofluorescence développé ainsi qu'une approche originale pour combiner des informations spatiale et spectrale en reconstruisant des images panoramiques de la surface des organes explorés et en y superposant les informations spectrales d'intérêt.

2. État de l'art

2.1. Caractéristiques histo-pathologiques des tissus

La structure du tissu muqueux comprend un épithélium avasculaire, constitué d'une ou plusieurs couches de cellules épithéliales jointives, reposant sur une membrane basale qui les sépare du tissu conjonctif sous-jacent, le chorion, contenant des protéines structurales (collagène) et des vaisseaux sanguins. L'épithélium se renouvelle constamment : les cellules qui reposent sur la membrane basale donnent naissance à d'autres cellules qui se différencient à mesure qu'elles migrent et gagnent progressivement la surface où elles remplacent les cellules anciennes qui sont éliminées. Les lésions précancéreuses sont des anomalies histologiques à partir desquelles un cancer peut se développer, la cancérisation étant un phénomène le plus souvent lentement évolutif. Le principal type de lésion précancéreuse est la dysplasie qui est une altération de la différenciation épithéliale : les cellules atypiques vont progresser vers la surface de l'épithélium depuis l'assise de la membrane basale ; longtemps réversible, la dysplasie est potentiellement maligne avec plusieurs degrés : classe I ou légère, classe II ou modérée, classe III ou sévère. La dysplasie sévère (dite aussi de haut grade) représente l'aspect le plus évolué pour une lésion précancéreuse épithéliale. À ce stade, la prolifération de cellules atypiques a envahi toute l'épaisseur de l'épithélium mais sans effraction de la membrane basale donc sans contact avec le système vasculaire et sans risque de diffusion métastatique. À partir du moment où il y a rupture de la membrane basale et infiltration de cellules malignes dans le chorion, on est en présence d'un

carcinome microinvasif. L'aspect clinique des dysplasies et des carcinomes microinvasifs est très divers et, dans de nombreux cas, l'épithélium paraît normal à l'examen endoscopique en lumière blanche. C'est dans ce cadre que les techniques de détection optique prennent tout leur intérêt.

L'épaisseur des épithéliums varie de quelques dizaines de micromètres à plusieurs centaines suivant les organes (50 pour le côlon, environ 150-200 pour l'œsophage). La profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus dépend de la longueur d'onde ; elle peut aller de quelques 10 microns dans l'UV moyen à plusieurs centimètres dans le proche IR. Utilisant des longueurs d'onde d'excitation dans l'UV moyen et le bleu, la spectroscopie d'autofluorescence est donc particulièrement bien adaptée au sondage des muqueuses.

2.2. Spectroscopie de fluorescence et d'autofluorescence appliquée au diagnostic précoce

La spectroscopie de fluorescence induite par excitation lumineuse (ou LIFS acronyme pour Light Induced Fluorescence Spectroscopy) donne une information liée à la nature biochimique et structurale du tissu qui est fonction de son état pathologique. Compte tenu notamment des faibles profondeurs de pénétration des longueurs d'onde d'excitation intéressantes et utilisables en clinique (UV-visible 350-450nm), la spectroscopie de fluorescence présente un intérêt particulier dans le cadre de la détection de lésions superficielles d'organes accessibles par les voies naturelles (voies aériennes, digestives et uro-génitales). Il existe différentes approches possibles de diagnostic par fluorescence, fondées respectivement sur l'exploitation de fluorophores exogènes (administrés au patient), endogènes (naturellement présents dans les tissus biologiques) et induits de manière exogène avec un « précurseur ». Dans le premier cas, la méthode consiste à administrer au patient un fluorophore qui présente une affinité préférentielle pour les tissus tumoraux et à provoquer sa fluorescence. Dans le second cas, on exploite le fait que la fluorescence naturelle d'un tissu contient de l'information sur sa nature histologique en mesurant directement l'autofluorescence du tissu excité à une longueur d'onde particulière. Enfin, dans le dernier cas l'administration exogène d'un précurseur (tel que l'ALA ou ses dérivés) provoque une accumulation temporaire d'un fluorophore naturellement présent dans les tissus, la Protoporphyrine IX (PpIX), préférentiellement dans les cellules tumorales ; une excitation appropriée provoque alors la fluorescence rouge de la PpIX, révélant les zones anormales. La spectroscopie d'autofluorescence est préférentiellement mise en œuvre compte tenu des contraintes liées à l'utilisation en clinique de marqueurs (autorisations difficiles à obtenir, sélectivité moyenne, photosensibilité résiduelle). La faible intensité des signaux d'autofluorescence mesurés en émission est relativement bien compensée par la sensibilité des capteurs existants.

Le tableau 1 recense les principaux fluorophores endogènes avec différentes valeurs de couples de longueurs d'onde d'excitation – émission, sachant que les bandes totales d'absorption et d'émission sont relativement larges (de l'ordre d'une centaine de nm).

Tableau 1. Les colonnes λ_{abs} et λ_{em} donnent respectivement les domaines spectraux dans lesquels se situent les maxima d'absorption et d'émission des principaux fluorophores endogènes des tissus biologiques (références issues ou citées de [Kara, Padilla, Ramanujam-00]).

| Fluorophores | λ_{abs} (nm) | λ_{em} (nm) |
|--------------|----------------------|---------------------|
| Collagène | 270-285 | 310 |
| | 325-340 | 390-405 |
| Élastine | 260-290 | 340 |
| | 325-350 | 400-410 |
| | 425-460 | 490-520 |
| NAD(P)H | 290 | 440-460 |
| | 340-350 | |
| Flavines | 440-450 | 520-535 |
| Porphyrines | 400 | 630-635 |
| | 450 | 675-690 |
| Tryptophane | 275-280 | 350 |

Un grand nombre d'études a montré que les tissus normaux, métaplasiques et dysplasiques présentent des différences au niveau des spectres d'autofluorescence, d'absorption et de diffusion, dans la bande Visible – Proche IR. Ces modifications spectrales sont associées aux altérations des types, des concentrations et de la micro-distribution des constituants [Kara, Kumar, Thueller, Bigio, Kortum]. Les fluorophores ayant une localisation tissulaire et des fonctions biologiques différentes, l'autofluorescence est plus particulièrement sensible aux variations du métabolisme cellulaire entre cellules saines et cancéreuses à travers l'émission des co-enzymes flavines et NAD(P)H (formes phosphorylée et non-phosphorylée du Nicotinamide Adénine Dinucléotide), de l'organisation structurale du tissu à travers l'émission du collagène (épaississement de la muqueuse et modification de l'architecture de la matrice extra-cellulaire) et de la concentration en hémoglobine de la muqueuse liée à l'activité tumorale. Le choix des longueurs d'onde à utiliser pour sonder le tissu dépend donc de la profondeur de pénétration recherchée, du nombre de fluorophores que l'on désire exciter et des caractéristiques optiques du tissu.

La spectroscopie de fluorescence induite par excitation lumineuse monochromatique (laser ou source large bande filtrée) a été largement étudiée et mise en œuvre au moyen de systèmes de spectrofluorimétrie utilisant de petites sondes à multiples fibres optiques (1 fibre centrale pour l'excitation et plusieurs fibres pour la collecte de l'émission) amenées au contact du tissu, en passant par le canal instrumental des endoscopes (diamètre inférieur à 3 mm) [Kobayashi, Brewer, Zellweger, Ramanujam-00, Koenig, Anidjar]. Chaque spectre $S(k\lambda)$ acquis

avec ces systèmes (typiquement 400 à 1000 points) fournit une information ponctuelle sur une superficie limitée par le diamètre de la fibre optique utilisée pour l'acquisition (quelques centaines de microns) et une profondeur (quelques centaines de microns) qui dépend de la longueur d'onde d'excitation et du diamètre de la fibre. Différentes études montrent que, dans un certain nombre de cas *in vitro* et *in vivo*, la spectroscopie de fluorescence en excitation continue (résolution spectrale ou spatiale) – mesures comparatives d'intensités à des longueurs d'ondes spécifiques – est plus efficace que la spectroscopie de fluorescence résolue temporellement – mesure des durées de vie de fluorescence après excitation impulsionnelle – pour différencier de manière significative des lignées cellulaires ou des tissus normaux et des cellules ou tissus tumoraux, ou des états dysplasiques différents [Huttenberger, Pfefer, Pradhan, Zellweger]. À partir de l'analyse comparative des spectres provenant des sites tissulaires sains et tumoraux (différences d'intensité et de forme), il est possible de déterminer des indicateurs spectraux permettant de les différencier. Classiquement, les spectres d'autofluorescence *in vivo* sont tout d'abord normalisés par rapport au pic de fluorescence et/ou à l'aire sous la courbe pour tenir compte notamment des variations de la source et de la géométrie du capteur (rapport d'intensité de fluorescence à différentes longueurs d'ondes, rapport des intensités sur la surface totale sous le spectre). Afin d'améliorer le rapport signal sur bruit, chaque spectre enregistré est la moyenne de 3 à 5 spectres acquis. Le nombre de points par spectre (plusieurs centaines) et le nombre de spectres recueillis (plusieurs dizaines à plusieurs centaines en fonction du nombre de sites), parfois multiplié par le nombre de longueurs d'onde d'excitation et/ou par le nombre de mesures répétées sur le même site (suivi d'une évolution pathologique sur modèle animal par exemple) conduisent à traiter un volume de données relativement important. Jusqu'à présent, les critères de différenciation sont dans leur grande majorité fondés sur l'analyse statistique simple (tests de Student et Fischer par exemple) de ratios d'intensités à 2 longueurs d'ondes choisies dans les spectres [Zheng]. Depuis peu, différentes méthodes d'analyses statistiques et de classification sont plus largement mises en œuvre pour définir des algorithmes de diagnostic différentiel (sain/pathologique). Après une étape initiale de réduction des données par une Analyse en Composantes Principales (ACP), une sélection des composantes principales montrant les différences statistiquement les plus significatives pour différencier tissus dysplasique et sain peut être réalisée (par exemple : tests de Wilcoxon appairés et non-appairés). Quelques travaux ont été publiés autour de l'optimisation de cette classification en utilisant des méthodes comme l'Analyse Discriminante Linéaire (ADL) ou les Machines à Support Vectoriel Linéaire (MVSL) [Kara, Skala, Palmer, Ramanujam-00]. Mais les procédures pour parvenir à ces résultats sont lourdes car il faut d'une part, disposer de jeux d'entraînement et de validation de taille suffisante et d'autre part, obtenir une évaluation fiable de la procédure de référence pour la validation (« gold standard ») en l'occurrence l'analyse histopathologique.

En plus du taux de classification, les informations finales essentielles sont la sensibilité (probabilité d'un test positif en présence de lésion) et la spécificité (probabilité d'un test négatif en l'absence de lésion). Les résultats des travaux les plus récents [Svistun, Goujon, Palmer, Ferris, Bourg-Heckly, Heintzelman] ont permis d'obtenir des augmentations de sensibilité de 75 % à plus de 90 % et de spécificité de 45 % à plus de 85 % notamment en optimisant les longueurs d'onde d'excitation. Les travaux menés en LIFS à multiples longueurs d'onde d'excitation ont montré que les bandes optimales pour développer des algorithmes de diagnostic sont 280-300, 330-340, 350-380 et 400-450 nm [Chang, Coghlan], bien qu'il ne semble pas exister de différences significatives en terme de sensibilité et de spécificité pour les excitations à 337, 380 et 460 nm [Ramanujam-96]. Par contre, les excitations autour de 410 nm ou bien autour de 300 nm semblent être plus efficaces pour le diagnostic entre tissus sains et tissus dysplasiques *in vitro* [Zheng, Anidjar] comme *in vivo* sur l'animal [Skala] ou sur l'homme [Kara, Zellweger]. Plusieurs problèmes restent à résoudre dans l'application actuelle de ces techniques spectroscopiques d'autofluorescence. D'une part, leur sensibilité aux modifications tissulaires notamment inflammatoires entraîne de nombreux faux-positifs (test positif en l'absence de lésion) et d'autre part, leur capacité de détection des différents stades d'évolution dysplasique doit être améliorée. Deux approches complémentaires sont actuellement étudiées [Muller, Drezek, Georgakoudi-01] :

- l'exploitation et la combinaison de données spectrales issues d'autres modalités utilisables simultanément (spectroscopies de diffusion élastique, Raman, recouvrement de fluorescence après photoblanchiment FRAP) afin d'améliorer la spécificité de la mesure et ainsi l'efficacité du diagnostic (fusion de données),
- la modélisation des interactions de la lumière avec les tissus en vue d'identifier leurs propriétés optiques et remonter ainsi aux spectres intrinsèques des structures morphologiques [Zonios] voire des constituants d'intérêt au sein des couches tissulaires considérées (NAD(P)H et flavines dans l'épithélium, collagène dans le chorion). Certaines études récentes indiquent que l'autofluorescence provenant de la sous-surface du tissu épithélial (couche basale) semble plus informative que celle de surface [Skala]. Les méthodes actuelles consistent à simuler la distribution spatiale de l'intensité lumineuse et à la faire correspondre aux mesures expérimentales de variations spatiales de la réflectance en optimisant les valeurs des paramètres optiques : coefficients d'absorption ($\mu_a(\lambda)$), de diffusion ($\mu_s(\lambda)$) et d'anisotropie ($g(\lambda)$) en fonction de la longueur d'onde, spectres d'excitation – émission des fluorophores. Compte tenu de la complexité du milieu (multicouches) et des contraintes géométriques (faibles distances entre fibres d'excitation et d'émissions), les simulations statistiques (Monte Carlo) de propagation de photons donnent des résultats plus précis que les simulations basées sur la résolution de l'équation de diffusion, en particulier pour les milieux turbides et très absorbants [Liu].

2.3. Imagerie endoscopique de fluorescence multi-bandes

De la même façon que pour la biopsie mécanique, il n'est pas envisageable d'effectuer en clinique des biopsies optiques point par point (surface sondée de l'ordre du mm^2) sur toute la surface de l'organe à examiner. Il existe donc un risque de non détection d'une zone maligne lié à la faible couverture spatiale de la technique. Ce problème a motivé le développement de systèmes d'imagerie endoscopique exploitant les résultats des analyses spectrométriques pour fournir une information de nature spectrale sous la forme d'images acquises dans différentes bandes (résolution de 2 ou 3 bandes), de même taille et résolution spatiale qu'en lumière blanche classique. Typiquement, la longueur d'onde de transition en émission se situe vers 590 nm (excitation entre 400 et 450 nm) [Zellweger]. Plusieurs travaux montrent l'intérêt de l'utilisation de la fluorescence en imagerie endoscopique pour améliorer la perception de contraste entre zones saines et tumorales des muqueuses sur tissus frais excisés [Svistun] et sur tissus *in vivo in situ* [Kara, Zeng]. Sur ce point, de nombreuses études recensées par [Kara] ont déjà été menées sur l'utilisation conjointe de l'imagerie à base de fluorescence et de l'endoscopie conventionnelle pour la détection de lésions néoplasiques intraépithéliales bronchiques (plusieurs milliers de patients). L'endoscopie de fluorescence lumière-induite permet de visualiser une information spatiale de fluorescence dans le champ de vision de l'endoscope. La figure 1 représente le schéma de principe de ce type de système, constitué des éléments de base suivants :

- une ou plusieurs sources de lumière large bande (lampe Xénon généralement) associée à des filtres interférentiels passe-bande pour sélectionner une bande précise (plus ou moins étroite) de longueur d'onde d'excitation λ_{ex} .
- une ou plusieurs caméras CCD pour former les images en lumière blanche et en fluorescence associées à différents filtres passe-bande aux longueurs d'onde d'intérêt choisies.
- un filtre passe-haut placé sur la voie d'acquisition d'autofluorescence pour filtrer la lumière d'excitation rétro-diffusée.
- une colonne de vidéo-endoscopie classique (moniteur, enregistreur, fibroscope).

En principe, les systèmes exploitant les signaux d'autofluorescence (faibles intensités) nécessitent l'emploi de caméras très sensibles.

Quatre industriels associés à des équipes de recherche ont développé des solutions technologiques en imagerie endoscopique de fluorescence qui ont permis d'aboutir à la fabrication et à la commercialisation d'instruments à usage clinique : Xillix Onco-LIFE (Canada) [Kara, Takehana], Pentax SAFE-3000 (Japon) [Kakihana], Storz D-Light/AF (Allemagne) [Haussinger] et le système DAFE de la société Richard Wolf (Allemagne) [Wagnieres-00, Goujon]. Les principales caractéristiques de ces systèmes sont :

- une excitation dans le violet-bleu (380-450 nm ou 420-480nm, lampe Xénon 300 W filtrée).
- une ou deux bandes d'acquisition (500-600 nm uniquement ou vert 480-520 nm et rouge > 630 nm).

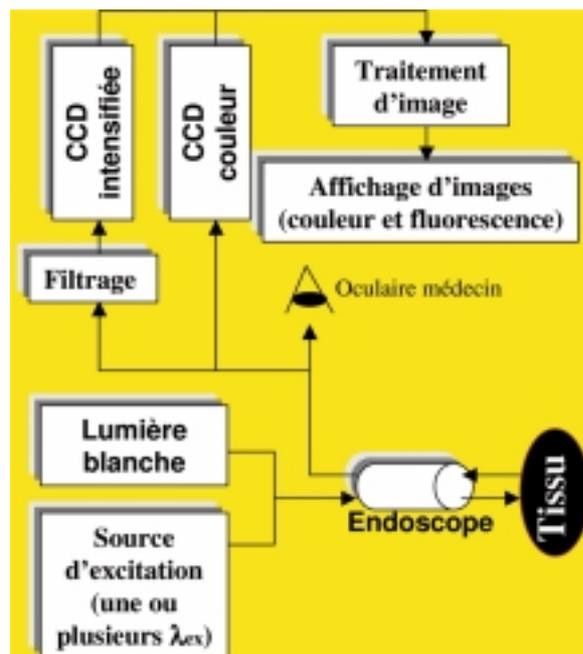


Figure 1. Schéma de principe représentatif d'un système d'imagerie endoscopique en fluorescence induite basé sur la détection multi-bandes

- l'affichage en temps réel de l'image en fausses couleurs (à partir de rapports de bandes) sur laquelle les zones anormales apparaissent en « négatif » ou en noir par rapport à l'épithélium normal.

- la commutation à la demande du mode lumière blanche au mode autofluorescence.

Pour l'instant, ces systèmes sont principalement appliqués à la détection de cancers et de lésions précancéreuses dans les bronches, la vessie et les voies digestives.

Les développements les plus récents concernent l'utilisation séquentielle d'excitations rouge, verte (réflectances) et bleue (autofluorescence) et l'exploitation des filtres standard de caméra tri - CCD pour former les images multi-bandes [Bergman]. Des améliorations du contraste sont proposées soit en utilisant une quantité optimisée de lumière rouge rétro-diffusée soit en réduisant la largeur de la bande d'excitation (contraste maximal observé pour 405 nm). Les résultats les plus significatifs obtenus pour des explorations trachéo-bronchiques chez l'homme ont permis d'atteindre une valeur prédictive positive (probabilité que le sujet au test positif soit malade) de 75 % en autofluorescence seule et de 100 % en autofluorescence et lumière blanche combinées [Goujon, Zheng]. Afin de continuer à améliorer l'efficacité de la méthode, les études en spectroscopie point à point doivent être poursuivies pour caractériser les différents stades de cancérisation.

Compte tenu de la nécessité de disposer d'une instrumentation utilisable en vidéo-endoscopie clinique, aucun algorithme de traitement d'images autre que celui effectuant le rapport pixel à pixel entre images de bandes différentes n'a été mis en œuvre jusqu'à présent, pour l'affichage en temps réel. Pourtant l'ac-

quisition «simultanée» des images en lumière blanche et en autofluorescence permet d'envisager de nouvelles formes de visualisation des données spatiales et spectrales plus pratiques pour le clinicien comme par exemple la construction d'images panoramiques partielles d'organe avec localisation des anomalies repérées ou bien la visualisation endoscopique en temps réel augmentée par la localisation de la fenêtre d'observation dans la carte de l'organe réalisée. Ces approches nécessitent la mise en œuvre de solutions de traitement d'images optimisées pour être compatibles en terme de temps de réponse avec les contraintes d'observation clinique.

3. Spectroscopie d'autofluorescence

3.1 Détection de cancers précoces *in vivo, in situ*, par spectroscopie tissulaire d'autofluorescence endoscopique

Nous nous sommes orientés vers le photodiagnostic dans l'œsophage, et tout particulièrement dans l'endobranchyœsophage (ou œsophage de Barrett) domaine sur lequel nous sommes les seuls à travailler en France. Les patients souffrant de cette pathologie présentent un risque accru (d'un facteur 30 à 125 suivant les études) de développer un cancer par rapport à la population générale et font l'objet d'une surveillance endoscopique régulière. Il existe une forte demande médicale pour accroître la sensibilité du diagnostic endoscopique, actuellement insuffisante.

Nous avons choisi une longueur d'onde d'excitation de 330 nm car elle permet d'observer l'expression de plusieurs fluorophores endogènes (collagène, élastine, NAD(P)H et flavines) et fournit donc une information spectrale plus riche, alors qu'une excitation dans le bleu concerne principalement les flavines et les éventuelles porphyrines endogènes. Nous avons conçu et construit un spectrofluorimètre à fibres destiné à l'utilisation clinique dont le schéma de principe est donné figure 2.

L'excitation lumineuse est fournie par une lampe Xénon (300 W, Eurosep) munie d'un filtre interférentiel (Andover) centré à 330 nm, de bande passante à mi-hauteur égale à 10 nm. L'acquisition des spectres tissulaires est effectuée grâce à un faisceau de fibres optiques (SEDI France) comprenant une fibre d'excitation de diamètre de cœur 500 μm et 9 fibres de diamètre de cœur 200 μm destinées à recueillir la fluorescence tissulaire. Le spectromètre (Jobin-Yvon, CP200, résolution spectrale 2 nm) est équipé d'un filtre d'émission passe-haut à 360 nm (Andover) et d'un détecteur matriciel CCD 1024 \times 256 pixels refroidi à l'azote liquide, ce qui assure une sensibilité suffisante pour acquérir un spectre en moins d'une seconde. Pour une excitation à 330 nm, chaque spectre correspond à l'exploration d'un volume tissulaire de l'ordre du dixième de mm^3 .

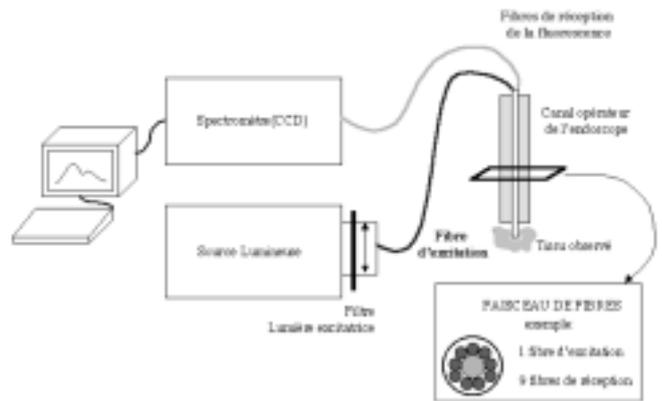


Figure 2. Schéma de principe du spectrofluorimètre développé et utilisé en clinique, comprenant : une lampe Xénon 300W filtrée ($330 \pm 5 \text{ nm}$), un capteur multifibres optiques et un spectromètre CP200 (résolution spectrale 2 nm) muni d'un filtre passe-haut à 360 nm.

Notre étude s'est déroulée dans le cadre d'un protocole clinique et a porté sur 25 patients. Les mesures sont effectuées lors de la procédure endoscopique conventionnelle. La figure 3 montre deux spectres typiques, chez un même patient, d'une muqueuse œsophagienne normale saine et d'une dysplasie sévère non visible en lumière blanche. L'analyse statistique des données expérimentales (test de Student et analyse de la variance) nous a permis de montrer que, dans le cas de l'œsophage, les modifications spectrales associées à la transformation néoplasique sont plus importantes que celles dues aux variations biologiques intra- et inter-patients. Nous avons pu ainsi déterminer un indicateur spectral, formé à partir de 2 ratios entre les intensités émises à 390 et 450 nm et à 390 et 550 nm, qui différencie les tissus sains des carcinomes intramuqueux avec une sensibilité de 97 % et une spécificité de 87 % [Bourg-Heckly].

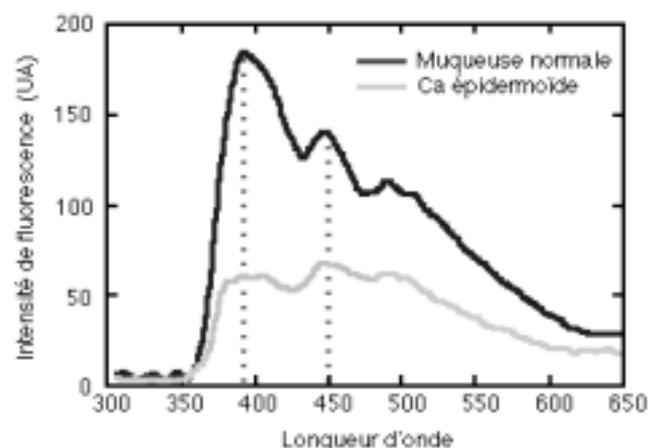


Figure 3. Exemple de spectres typiques d'une muqueuse œsophagienne saine (courbe noire) et dysplasique sévère (courbe grise) pour un même patient.

3.2. Étude de l'émission d'autofluorescence cellulaire en vue d'une quantification des spectres

La modification de l'intensité et de la forme des spectres tissulaires d'autofluorescence lors de la cancérogenèse est un fait expérimental bien établi et la possibilité d'exploiter ce phénomène à des fins diagnostiques a été démontrée par un certain nombre d'études cliniques dont celle sur l'œsophage citée au paragraphe précédent. Cependant les indicateurs permettant de différencier tissus sains et lésions cancéreuses précoces sont définis de façon empirique à partir de l'analyse comparative des spectres tissulaires et l'interprétation quantitative de ces derniers est très délicate. Plusieurs facteurs expliquent cette difficulté : le spectre d'autofluorescence tissulaire résulte du recouvrement de l'émission de plusieurs fluorophores endogènes situés à différents niveaux de profondeur de la muqueuse dont il n'est pas aisé de déterminer les contributions respectives : la fluorescence de l'épithélium est due à l'émission des coenzymes NAD(P)H et flavines impliqués dans le métabolisme cellulaire, alors que celle du chorion sous-jacent est dominée par la fluorescence du collagène et de l'élastine, protéines fibreuses qui constituent l'essentiel de la matrice extra-cellulaire du tissu conjonctif. Le spectre acquis *in vivo* ne représente pas la somme des spectres intrinsèques émis par chaque couche tissulaire tels qu'ils seraient observés dans un milieu optiquement mince. En effet, l'intensité et la distribution spectrale sont fortement affectées par les propriétés d'absorption et de diffusion de l'épaisseur de tissu traversée par la lumière avant d'atteindre la fibre collectant la fluorescence.

La quantification de l'émission d'autofluorescence à partir de la restauration des spectres intrinsèques doit permettre de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la modification spectrale, notamment en séparant les facteurs d'origine métabolique et ceux d'origine structurelle, et conduire à un diagnostic plus précis.

Dans une première étape, notre objectif a été de mettre en évidence et de caractériser la part du métabolisme cellulaire dans les spectres d'autofluorescence de la muqueuse œsophagienne acquis lors de l'étude clinique pour obtenir des spectres de référence de l'émission cellulaire permettant à terme une interprétation quantitative des spectres par modélisation. À cette fin, nous avons entrepris des études comparatives portant sur des cultures cellulaires saines et tumorales. Les cellules saines n'étant pas disponibles commercialement, nous avons mis au point une procédure permettant d'obtenir des cultures primaires à partir de pièces opératoires. Les cellules tumorales sont deux lignées correspondant respectivement aux tumeurs se développant sur la muqueuse malpighienne œsophagienne (OE21) et sur la muqueuse de Barrett (adénocarcinome OE33). Deux techniques spectroscopiques ont été utilisées : la microspectrofluorimétrie confocale, dont la résolution spatiale est de l'ordre de quelques μm^3 , pour obtenir l'information sur la forme du spectre émis par une cellule unique vivante, et la spectrofluorimétrie sur cellules en suspension qui fournit un spectre résultant

de l'émission de quelques 10^5 cellules et permet d'accéder à l'intensité moyenne d'autofluorescence.

Nous avons déterminé les spectres de fluorescence intrinsèques émis par les différents types cellulaires et montré ainsi que l'intensité de fluorescence des cellules tumorales est significativement plus élevée que celle des cellules saines (contrairement à ce qui est observé sur le tissu) et que leurs distributions spectrales ne sont pas identiques (figure 4). L'analyse des spectres au niveau de la cellule individuelle a permis d'identifier les fluorophores responsables de l'émission et d'en déterminer leurs contributions relatives. Comme attendu pour une excitation dans l'UV moyen, le fluorophore prépondérant est le NAD(P)H, responsable de plus de 90 % de l'émission cellulaire [Villette-04].

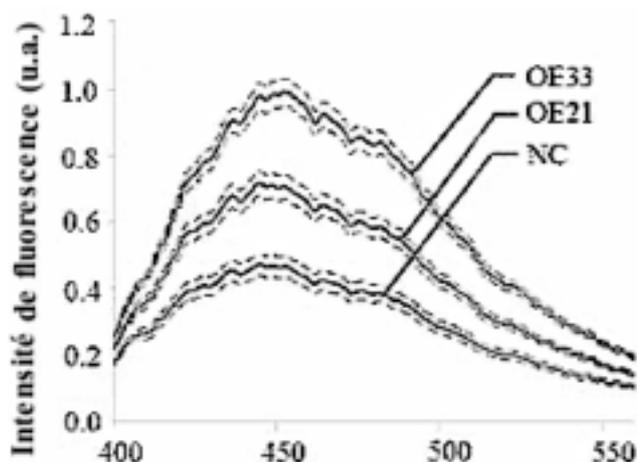


Figure 4. Spectres moyens de fluorescence pour les cellules saines NC ($n = 362$), et tumorales se développant sur la muqueuse malpighienne œsophagienne OE21 ($n = 362$) et sur la muqueuse de Barrett (adénocarcinome OE33, $n = 396$) obtenus en microspectrofluorimétrie confocale. Les intervalles de confiance sont donnés en pointillés.

Une quantification de la concentration intracellulaire du NAD(P)H effectuée par deux méthodes différentes, l'une fondée sur la comparaison des intensités de fluorescence émises par les cellules et par des solutions de NAD(P)H pur, l'autre fondée sur une analyse biochimique indépendante de la fluorescence, a conduit à des résultats cohérents. La quantité totale de NAD(P)H est plus importante dans les cellules tumorales que dans les cellules saines (plus d'un facteur 2 entre cellules d'adénocarcinome et cellules saines). L'ensemble des résultats obtenus lors de ces études cellulaires peut s'interpréter en terme de différences métaboliques entre cellules saines et tumorales en supposant que la transformation néoplasique favorise la voie métabolique anaérobie (sans oxygène) par rapport à la voie aérobie [Villette-06].

La transformation néoplasique est donc associée à une augmentation de l'intensité de l'émission du NAD(P)H, ce qui semble en contradiction avec l'observation *in vivo* où elle se manifeste

toujours par une diminution globale de l'intensité de fluorescence. L'interprétation doit prendre en compte le fait que, dans le tissu, les spectres d'émission du NAD(P)H cellulaire et du collagène provenant du chorion se superposent et subissent une déformation lors de leur propagation vers la surface. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par une équipe du MIT qui restaure les spectres intrinsèques à partir des spectres acquis *in vivo* en utilisant une méthode fondée sur la théorie de la migration de photon [Georgakoudi-02]. Ils ont montré que les spectres tissulaires intrinsèques des dysplasies sévères sur œsophage de Barrett se caractérisaient par une décroissance du collagène et une augmentation du NAD(P)H par rapport à la muqueuse non dysplasique alors même que les spectres *in vivo* étaient caractérisés par une réduction globale de l'intensité de fluorescence. Les auteurs attribuaient ce fait à une augmentation du nombre de cellules et/ou à un niveau plus élevé de l'activité métabolique cellulaire dans le tissu dysplasique. Nos résultats permettent d'affirmer que l'accroissement de l'intensité tissulaire de l'émission du NAD(P)H est la traduction en partie d'une modification de l'activité métabolique cellulaire puisque nous l'observons au niveau de la cellule individuelle. La réduction de l'émission du collagène pourrait être due à un effet d'écran provoqué par un épaissement de l'épithélium et/ou à une désorganisation de la structure de la molécule au point de masquer l'augmentation de l'émission du NAD(P)H.

Ces résultats montrent la grande sensibilité de la méthode spectroscopique d'autofluorescence pour détecter des modifications des propriétés structurales et biochimiques des tissus et notamment des transformations néoplasiques à des endroits très localisés. Or cette technique de détection ponctuelle (1 mm² de surface de tissu sondé) implique un échantillonnage spatial limité pour être compatible avec la durée d'un examen clinique, donc

un nombre de points de mesure restreint et un risque plus grand de ne pas « tomber » sur un site lésé. Afin de pallier ce défaut, et aux dépens d'une résolution spectrale limitée à quelques bandes, une approche en imagerie endoscopique d'autofluorescence est développée pour améliorer la localisation spatiale macroscopique préalable des zones suspectes et guider alors efficacement la spectroscopie point à point, voire la biopsie.

4. Cartographie endoscopique multi-bandes

4.1. Prototypage d'imageur d'autofluorescence multi-bandes

Le principe du système d'imagerie multi-bandes développé par notre groupe CRAN-BioMoCeTi repose sur la visualisation simultanée (en termes de perception visuelle pour le clinicien) de l'image endoscopique classique en lumière blanche et d'une image d'information spectrale de même dimension et résolution. Cette image peut être celle de l'autofluorescence des tissus dans une seule bande de longueurs d'ondes donnée ou bien une image composite « multi-bandes ». Cette dernière code en fausses couleurs les rapports d'intensités pixels à pixels entre l'autofluorescence acquise dans des bandes de longueurs d'ondes différentes et déterminées à partir des analyses spectroscopiques déjà menées. Cette information, fournie en temps réel et intégrée dans une procédure endoscopique conventionnelle, doit permettre au clinicien

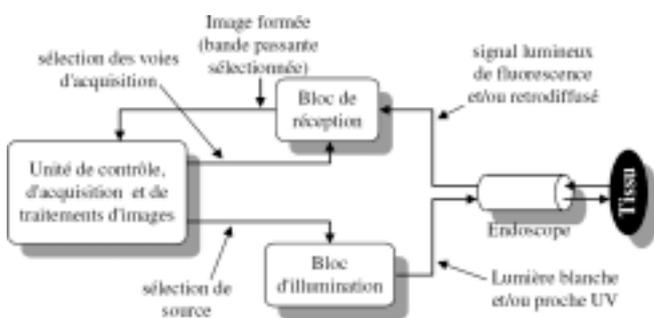


Figure 5. Schéma-bloc du système de spectro-imagerie développé (collaboration CRAN-BioMoCeTi). L'unité de contrôle synchronise la commutation des sources du bloc d'illumination (lumière blanche / excitation de fluorescence) avec la sélection des voies optiques et l'acquisition des images en lumière blanche et en fluorescence.

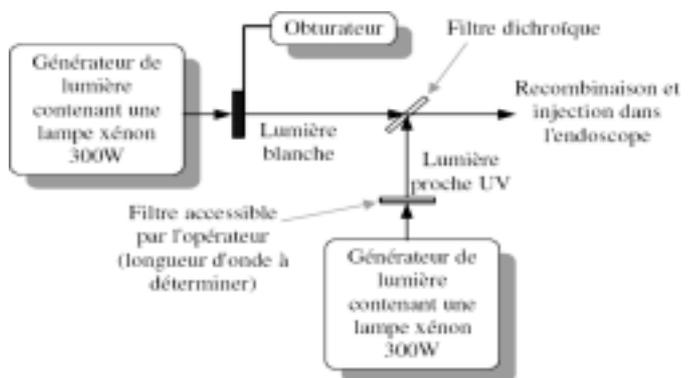


Figure 6. Schéma de principe du bloc d'illumination. L'obturateur situé sur la voie d'illumination de lumière blanche est fermé lors de l'injection de la lumière d'excitation de fluorescence obtenue après filtrage passe-bande 400 ± 20 nm (largeur à mi-hauteur) de la seconde source Xénon. Le filtre dichroïque est un passe bas en réflexion à 430 nm.

d'orienter les prélèvements biopsiques et d'accroître ainsi la sensibilité de la détection. Le prototype développé est susceptible d'être utilisé aussi bien en endoscopie souple que rigide.

Le schéma de principe du système représenté figure 5 se compose de trois blocs fonctionnels principaux : un bloc d'illumination/excitation, un bloc de réception et une unité de commande et d'acquisition des images.

Le bloc sources d'illumination (figure 6) est composé de deux lampes Xénon 300 W collimatées. La première lampe sert à former l'image en lumière blanche ; elle est munie d'un obturateur (shutter UNIBLITZ VS25, temps de réponse maximum 3 ms) fermé lors des acquisitions en excitation de fluorescence. Le spectre lumineux de la seconde lampe est filtré pour conserver une bande spectrale réduite dans le bleu servant à exciter les fluorophores endogènes d'intérêt. La sélection de cette bande

d'excitation (longueur d'onde centrale, bande passante) s'effectue grâce à l'utilisation de filtres passe-bande standard (par exemple filtre Andover 400 ± 20 nm), en fonction de l'organe à examiner et/ou de la pathologie à rechercher. Dans le cadre de notre application, nous utilisons une excitation entre 400 nm (limite due à la transmission correcte des fibres de verre du fibroscope) et 430 nm, afin d'exciter les fluorophores d'intérêt (flavines, porphyrine, élastine).

La lumière produite est acheminée au travers du canal d'illumination de l'endoscope jusqu'au tissu. Le fibroscope utilisé dans le cadre de notre étude est un appareil standard (FG 100FP, Fujinon) dont l'optique (champ de vision de 105° , intervalle de focalisation 5-100 mm) permet une visualisation des images correspondant à l'exploration d'une zone tissulaire d'une surface de l'ordre d'un à quelques centimètres carrés.

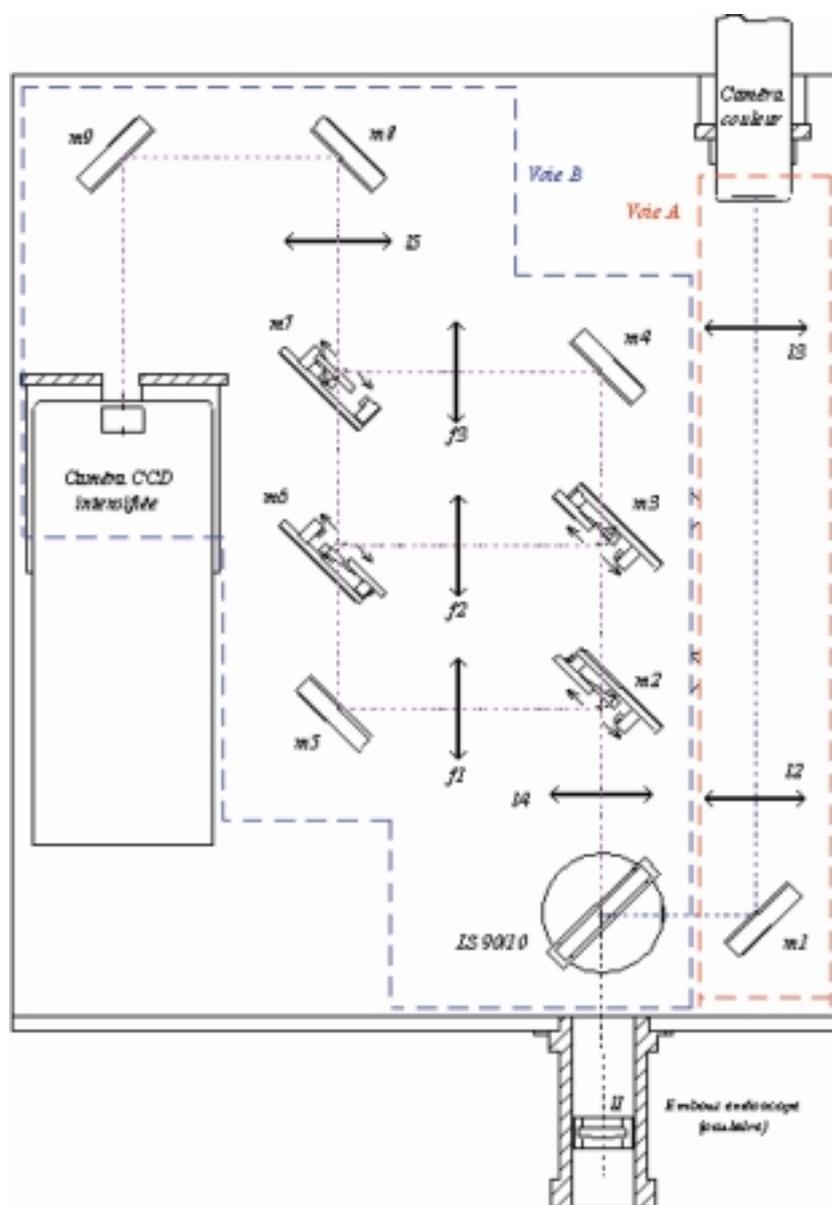


Figure 7. Schéma du bloc de réception et d'acquisition des images, avec « mi » miroirs de renvoi (m2, 3, 6, 7 avec 1 degré de liberté et m4, 5, 8, 9 avec 2 degrés de liberté), « li » lentilles de focalisation, « fi » filtres de sélection de bande et « LS » lame Séparatrice 90/10.

La figure 7 représente le schéma de la partie réception et acquisition des images développée et réalisée. La lumière (l'image), issue de l'oculaire de l'endoscope, est séparée en deux voies par un séparateur pelliculaire de rapport 90/10: voie A (10% en réflexion) vers la caméra couleur pour former l'image en lumière blanche et voie B (90% en transmission) vers la caméra CCD intensifiée pour acquérir les images d'autofluorescence suivant trois chemins optiques (filtres $f1$, $f2$ et $f3$) commutables séquentiellement à l'aide des miroirs mobiles $m2$, $m3$, $m6$ et $m7$ fixés sur des bras d'actuateurs (GM20, General Scanning, débattement angulaire 24° , temps de réponse maximum 12 ms). La commande des dispositifs de commutation s'effectue à l'aide d'une carte d'entrées-sorties PCI-1710 (Advantech Co). La somme des temps de commutation du shutter et de changement de voie est de 20 ms environ. Le temps de traitement maximum des images est de 55 ms, il comprend le rapport pixel à pixel entre deux images acquises dans deux bandes différentes et la coloration des zones suspectes (image composite). Le cycle recommence toutes les 160 ms pour le mode le plus rapide (1 image en lumière blanche et 1 image de fluorescence) et toutes les 460 ms pour le mode le plus lent (1 image en lumière blanche, 2 images de fluorescence et calcul de l'image composite).

L'ajustement précis de chaque chemin optique est réalisé au moyen d'une part, de platines de rotation micrométriques (Standa, rotation 360° , résolution 0.017°) sur lesquelles sont fixés les miroirs mobiles $m2$, $m3$, $m6$, $m7$ et la lame séparatrice et d'autre part, de supports verticaux Trait-Point-Plan à 2 degrés de liberté (KMS/M Thorlabs, précision $3/16''$ -100 TPI) sur lesquels sont collés les miroirs fixes $m1$, $m4$, $m5$, $m8$, $m9$.

La caméra couleur (Sony XC-999P, CCD $1/2''$, $752H \times 582V$ pixels) fonctionne en continu, et acquiert une image toutes les 40 ms. De façon intercalée dans le temps, la caméra intensifiée (Lheritier LH760 ULL, CCD $2/3''$, 752×582 pixels, éclairage minimum 2.10^{-5} lux) réalise l'acquisition d'images d'autofluorescence dans une ou plusieurs bandes spectrales selon le

mode choisi par l'utilisateur. Tous les éléments d'optique sont traités. Pour chaque voie optique, sans filtre, environ 50% de la puissance lumineuse à l'entrée du bloc de réception parvient à la caméra intensifiée. Un système afocal est utilisé pour chaque voie afin d'adapter la taille des images aux dimensions des capteurs de chaque caméra tout en limitant au maximum l'encombrement. La numérisation des images est assurée par une carte d'acquisition Matrox Meteor II standard.

4.2. Prétraitements et calibrage

4.2.1. Précorrections par filtrage (vignettage, motif des fibres)

Du fait de la conception même des endoscopes (champ de vision circulaire, éclairage localisé), les images endoscopiques sont circulaires et affectées d'un important gradient lumineux, le centre des images étant nettement plus éclairé que les bords (vignettage). Par ailleurs, pour les endoscopes fibrés, le canal image est constitué de plusieurs milliers de fibres optiques (environ 15000 pour le Fujinon FG 100FP utilisé) qui transmettent la lumière par leur cœur, de sorte que la gaine de chacune de ces fibres (transmettant moins de lumière) fait apparaître un motif (grille en nid d'abeilles) qui se superpose à l'image. Enfin, l'optique grand angle de l'endoscope induit une forte distorsion radiale (déformation dite de « barillet ») dans les images [Asari]. Ces trois défauts illustrés figure 8 doivent impérativement être atténués (correction et choix d'une zone utile) pour obtenir un recalage fonctionnel et une carte précise [Shahidi].

Concernant les problèmes d'éclairage et de motif des fibres, nous avons tout d'abord analysé le contenu fréquentiel d'images fibroscopiques « typiques » (vessies de porc). La figure 9 montre un exemple caractéristique (a) d'image « brute » contenant l'inhomogénéité d'éclairage et le motif des fibres (dimension $N^2 = 341 \times 341$ pixels), (b) de la même image sans

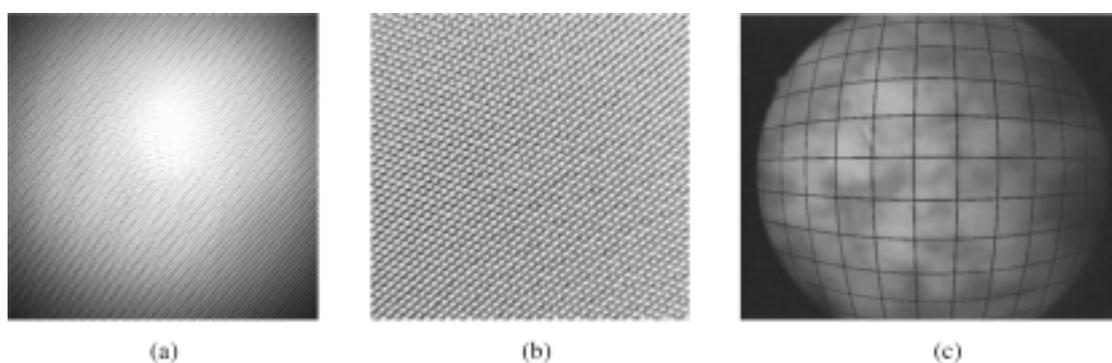


Figure 8. Images endoscopiques en niveaux de gris (a) prise à la perpendiculaire d'une surface uniformément blanche et montrant l'inhomogénéité d'illumination (taille de l'image: 768×576 pixels). (b) grossie localement et montrant le motif en nid d'abeilles dessiné par les fibres optiques du fibroscope (taille de l'image 140×140 pixels). (c) de la paroi d'une vessie sur laquelle un quadrillage a été superposé pour indiquer la déformation radiale de l'image.

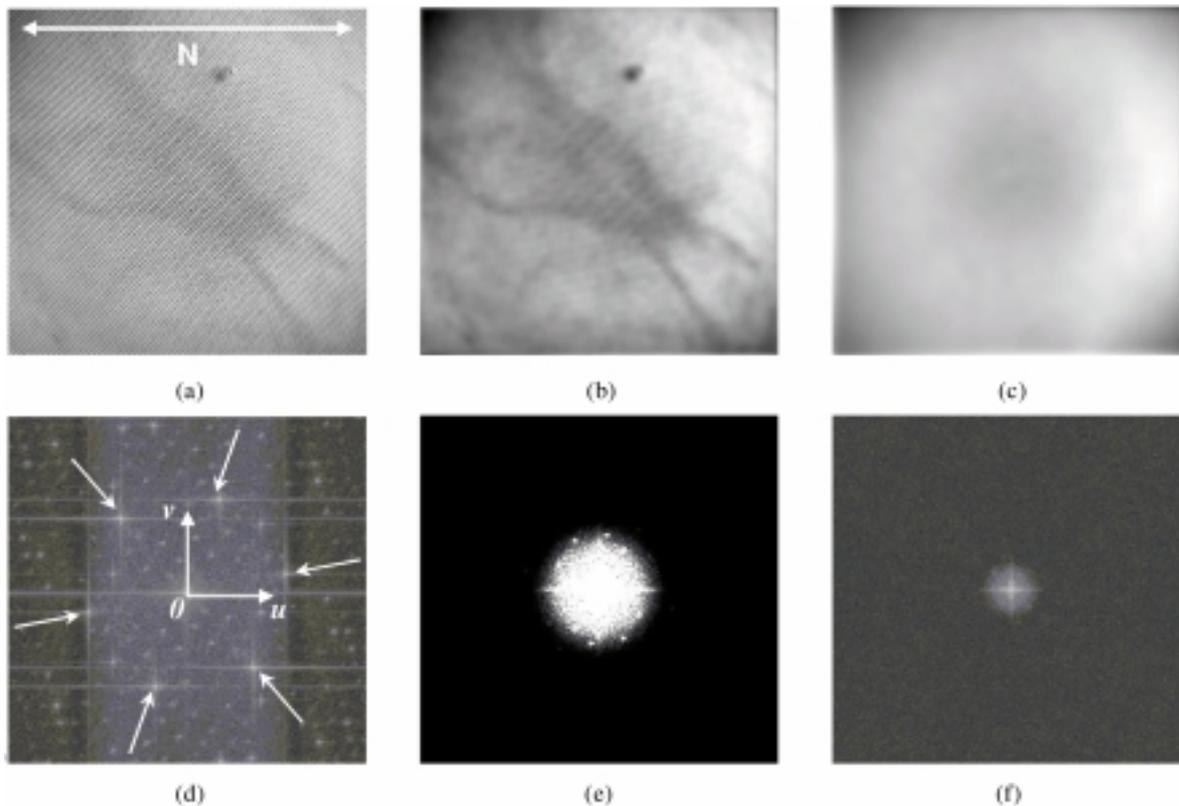


Figure 9. (a) *Ia* Image endoscopique de la paroi d'une vessie de porc acquise à l'aide d'un fibroscope. (b) *Ib* La même image après filtrage des composantes de haute fréquence du spectre dues au pattern de fibres. (c) *Ic* Image (a) après filtrage passe-bas ne conservant que les variations de basse fréquence présents dans l'image (a). (d) (e) et (f) sont les spectres d'amplitude normalisés et centrés à l'origine en fonction des fréquences spatiales et correspondant respectivement à (a), (b) et (c). Sur l'image (d) les flèches pointent les 6 principaux pics répartis à angles égaux sur le cercle centré de rayon $0.28N$ ($N = 341$ pixels) et correspondant au dessin du motif des fibres optiques.

le motif des fibres (filtré) et (c) de la même image en ne conservant que les très basses fréquences (visualisation du gradient lumineux). En dessous de chacune de ces images, le spectre d'amplitude normalisé centré est donné en fonction des fréquences spatiales u et v entre $-(N - 1)/2$ et $+(N - 1)/2$. On distingue clairement en a) le dessin du motif des fibres, présent dans le plan fréquentiel sous la forme de 6 pics principaux répartis à angles égaux sur un cercle de rayon $0.28N$ et de centre ($u = 0, v = 0$). On constate également que les composantes du signal « utile » sont essentiellement inscrites à l'intérieur d'un disque de rayon $0.12N$ (images (b) et (e)) et que les composantes correspondant aux inhomogénéités d'éclairage appartiennent à un disque de rayon $0.03N$ (images (c) et (f)).

Pour compenser le gradient dû à l'éclairage inhomogène et pour atténuer la présence du motif des fibres optiques du fibroscope, nous avons donc choisi d'appliquer simplement deux filtres passe-bas spécifiques aux images acquises. L'image originale *Ia* est filtrée par un filtre passe-bas $h1$ pour obtenir l'image *Ib* contenant toujours les informations utiles mais sans composantes hautes fréquences (pattern des fibres). *Ib* est

ensuite filtrée par un filtre passe-bas $h2$ pour obtenir l'image *Ic* ne contenant plus que les très basses fréquences (gradient lumineux). L'image finale est obtenue par soustraction $I = Ib - Ic$ [Miranda-04a]. $h1$ et $h2$ sont des filtres gaussiens de fonction de transfert :

$$h(m,n) = \frac{1}{2\pi\sigma_h^2} e^{-\frac{d^2(m,n)}{2\sigma_h^2}} \tag{1}$$

où $d(m,n) = \sqrt{m^2 + n^2}$ est la distance spatiale entre le pixel sous le masque ayant pour coordonnées (m,n) et le pixel au centre du masque ($m = 0, n = 0$). $\sigma_h = N/2\pi\sigma_H$ et σ_H sont les écarts-type du masque gaussien dans les domaines spatial et fréquentiel respectivement. Pour le filtre $h1$ (masque de convolution 5×5), nous avons choisi $\sigma_H = 0.125N$, soit $\sigma_h = 1.27$. Cette valeur de σ_H signifie que l'amplitude de chacune des composantes est inférieure à 15 % de leur valeur initiale au-delà d'une distance de $2\sigma_H$ (les premières composantes significatives du pattern étant situées au-delà de cette valeur) et que la partie la plus importante de l'information ($\leq \sigma_H$) est préservée. Pour le filtre $h2$ (masque 11×11), nous avons fixé

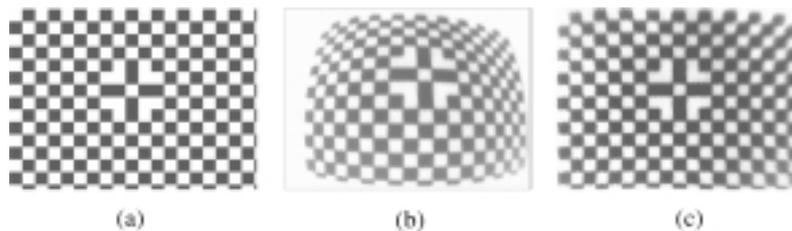


Figure 10. Mire d'étalonnage : (a) Image sans distorsion. (b) Image acquise avec l'endoscope (c) Image corrigée avec les paramètres k_i du polynôme (2) trouvés après recalage.

$\sigma_H = 0.015N$, soit $\sigma_h = 6.12$. Cette valeur de σ_H signifie que toutes les composantes du spectre qui se trouvent dans un rayon inférieur à $0.026N$ conservent au moins 60 % de leur amplitude.

4.2.2. Calibrage (correction de la distorsion en barillet)

L'algorithme de recalage développé pour le mosaïquage et décrit dans la section suivante (4.3) est également utilisé pour calculer automatiquement les paramètres de compensation des distorsions radiales de l'endoscope. Pour ce faire, une image sans distorsion d'une mire est recalée avec une image de la même mire (avec distorsion) acquise avec l'endoscope (voir figure 10). La mire sans distorsion est générée informatiquement et imprimée sur papier pour ensuite être acquise. Durant le recalage des deux images, les paramètres optimisés sont les paramètres de la projection perspective (liée à la position de l'endoscope par rapport à la mire) et ceux décrivant la distorsion, à savoir les coordonnées (C_x, C_y) de la projection du centre optique de l'endoscope dans l'image et les paramètres k_i de l'équation (2). Ce polynôme d'ordre 5 traduit l'allongement du rayon r entre le centre (C_x, C_y) et le point image de coordonnées (x, y) sachant que les variations d'erreur de correction de distorsion sont largement négligeables au-delà de cet ordre [Asari]. L'avantage de cet algorithme réside dans le fait que l'endoscope n'a pas besoin d'être maintenu perpendiculairement à la mire, de sorte que la procédure de calibrage, ne nécessitant ni mire particulière ni système précis de positionnement de l'endoscope, s'en trouve largement simplifiée pour l'utilisateur.

$$r' = \sum_{i=1}^5 k_i \cdot r^i \quad (2)$$

avec : $r = \sqrt{(x - C_x)^2 + (y - C_y)^2}$ et $k_1 = 1$

La distance moyenne entre les centres homologues des carrées noirs des images Figure 10(a) et (c) est de 1.33 pixels. Cette erreur très faible autorise des recalages précis d'images. Elle est représentative pour une inclinaison de l'axe de l'endoscope par rapport à la perpendiculaire de la mire variant de 0° à 20° (résultats montrés dans [Miranda-04b]) ; pour différents points de

vue, différentes valeurs de perspectives sont bien déterminées, avec des valeurs de paramètres optiques identiques. Tout en étant plus flexible, la méthode proposée est aussi précise que les méthodes de référence publiées sur ce sujet [Shahidi, Helferty, Sawhney, Asari].

4.3. Méthode de recalage et cartographie 2D

Le mosaïquage d'images est une technique permettant de construire une carte à partir d'une séquence d'images se recouvrant spatialement comme celles acquises en endoscopie. Il trouve de nombreuses applications dans le domaine médical, notamment pour diverses modalités telles que l'imagerie à rayons X ([Jalink, Chou]) l'imagerie ultrasonographique [Weng] ou l'imagerie microscopique [Vogt]. Cependant, pour la grande majorité de ces applications, les déplacements ou les positions du capteur sont connus. Les paramètres des transformations nécessaires pour le recalage des données peuvent être déterminés à partir de ces déplacements connus. Ceci n'est pas le cas en endoscopie clinique où le praticien manipule l'endoscope selon des trajectoires 3D sans positionnement mesurable et dépendantes du site et/ou de l'organe observé. L'ophtalmologie [Can] est un des rares domaines médicaux pour lequel le recalage est effectué automatiquement et sans connaissances *a priori* liées au déplacement du capteur. À ce jour, aucun algorithme de mosaïquage automatique n'a été recensé dans le domaine de la cartographie 2D en vision monoculaire appliquée à l'imagerie endoscopique. Pourtant, la vitesse d'acquisition (25 images/ seconde) et la vitesse de déplacement de l'endoscope dans les organes creux ($< 1\text{cm/s}$) conduisent à une grande surface de recouvrement d'images consécutives (typiquement plus de 90 % de la surface des images) autorisant l'utilisation d'algorithmes de recalage.

Les algorithmes de recalage sont au cœur du processus de mosaïquage. Leur but est de trouver la transformation géométrique locale superposant deux images consécutives ($i^{\text{ème}}$ et $(i+1)^{\text{ème}}$ images) de la séquence. Les transformations locales $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ sont ensuite utilisées pour placer les images, au fur et à mesure du recalage des paires d'images, dans un repère com-

mun $(O_{carte}, \vec{x}_{carte}, \vec{y}_{carte})$ à l'aide d'une transformation globale \tilde{T}_{i+1}^g actualisée au cours du recalage telle que :

$$\tilde{T}_{i+1}^g = \tilde{T}_i^g \tilde{T}_{i,i+1}^l = \prod_{j=1}^{j=i} \tilde{T}_{j,j+1}^l \quad (3)$$

Le processus de recalage de données est mathématiquement formulé par l'équation (4). Soient deux images I_M (modèle ou référence) et I_T (à transformer). La superposition de ces deux images consiste à trouver les paramètres de la transformation \tilde{T} au moyen d'une méthode d'optimisation (*argopt_T*) qui maximise la ressemblance (mesure de similarité S) des structures homologues extraites des images. Les fonctions f_1 et f_2 représentent les algorithmes de calcul ou de segmentation des structures homologues des images I_M et I_T .

$$\tilde{T} = \arg \text{opt}_T S(f_1(I_M), T(f_2(I_T))) \quad (4)$$

Le type de la transformation géométrique T , les structures homologues $f_1(I_M)$ et $f_2(I_T)$, la mesure de similarité S et la méthode d'optimisation à employer sont à définir en fonction de l'application, des modalités d'imagerie et de la nature des images ainsi que des besoins en termes de précision, de robustesse, *etc.* Il a par exemple été utilisé dans le domaine de la cancérologie pour recaler des informations multimodales utiles au repositionnement automatique du patient en radiothérapie [Sarrut, Bansal] ou en cardiologie pour superposer des données fonctionnelles 3D de tomoscintigraphie avec des données anatomiques 2D de coronarographie [Schindler, Valet].

L'endoscope étant déplacé sans restriction particulière dans l'organe, une transformation perspective 2D-2D doit être utilisée pour recaler les images. La transformation perspective décrite par l'équation 5 déplace un pixel de coordonnée (x, y) dans l'image I_T en une position de coordonnées (x', y') . Les paramètres a_{11} et a_{22} sont sans dimension et sont notamment liés aux facteurs d'échelle agissant respectivement selon l'axe des abscisses et des ordonnées du repère image. a_{12} et a_{21} (également sans dimension) sont responsables de l'effet dit de cisaillement ou glissement. Ces quatre paramètres déterminent également la rotation 2D effectuée dans le plan de l'image. a_{13} et a_{23} sont les paramètres de translation selon l'axe des abscisses (a_{13}) et celui des ordonnées (a_{23}) de I_T . Enfin, a_{31} , a_{32} et a_{33} (sans dimension) sont les paramètres responsables de l'effet de perspective.

$$\begin{pmatrix} x' \\ y' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} u/w \\ v/w \end{pmatrix} \text{ avec } \begin{pmatrix} u \\ v \\ w \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} \quad (5)$$

Dans le cas des images endoscopiques qui nous intéressent, des primitives (contours, *etc.*) communes à toutes les images ne sont pas systématiquement visibles dans les données. Par contre, les niveaux de gris peuvent constituer des informations homologues à partir desquelles une mesure de similarité peut être dérivée. Dans ce cas de figure, une hypothèse de corrélation

liant statistiquement les niveaux de gris des images à recaler est usuellement recherchée. Si aucun lien n'est connu entre les images en termes de niveau de gris, c'est souvent l'information mutuelle (IM) qui est choisie, ce pour des raisons de robustesse et de flexibilité [Pluim]. Ces raisons nous ont conduit à retenir l' IM comme mesure de similarité dans le cadre de notre méthode de recalage d'images endoscopiques. L'information mutuelle est déterminée avec les entropies $H(I'_M(x, y))$ et $H(I'_T(x, y))$ et avec l'entropie conjointe $H(I'_M(x, y), I'_T(x, y))$ (voir équation 6 et [Viola]), où $I'_M(x, y)$ et $I'_T(x, y)$ sont respectivement les parties communes de l'image $I_M(x, y)$ et de l'image $I_T(x, y)$ transformée avec T . $I'_T(x, y)$ est donc la partie de $T(I_T(x, y))$ qui se superpose à $I_M(x, y)$. Les entropies sont elles-mêmes calculées à l'aide des distributions des niveaux de gris données sous la forme d'histogrammes normalisés. z et z' désignent les niveaux de gris des images $I'_M(x, y)$ et $I'_T(x, y)$, et $p_M(z)$, $p_T(z')$ et $p_{MT}(z, z')$ sont respectivement les distributions des niveaux de gris de $I'_M(x, y)$ et $I'_T(x, y)$, et de l'histogramme joint des deux images.

$$IM(I'_M(x, y), I'_T(x, y)) = H(I'_M(x, y)) + H(I'_T(x, y)) - H(I'_M(x, y), I'_T(x, y)) \quad (6)$$

avec :

$$\begin{cases} H(I'_M(x, y)) = - \sum_{z=0}^{z=255} p_M(z) \ln(p_M(z)) \\ H(I'_T(x, y)) = - \sum_{z'=0}^{z'=255} p_T(z') \ln(p_T(z')) \\ H(I'_M(x, y), I'_T(x, y)) = - \sum_{z=0}^{z=255} \sum_{z'=0}^{z'=255} p_{MT}(z, z') \ln(p_{MT}(z, z')) \end{cases}$$

L'information mutuelle est maximale lorsque les deux images sont recalées. Un gradient descendant est utilisé pour obtenir la transformation \tilde{T} qui maximise l'information mutuelle. Les paramètres de la transformation perspective T sont actualisés à chaque itération de l'optimisation grâce à la relation (7). α est un pas de convergence qui diminue lorsqu'on s'approche de la solution et k est l'indice d'itération. La valeur initiale de T est la matrice identité.

$$T_{k+1} = T_k + \alpha \frac{\partial IM(I'_M(x, y), I'_T(x, y))}{\partial T_k} \quad (7)$$

avec : $I'_T(x, y) = T_k(I_T(x, y))$.

Pour une progression robuste vers la solution, la dérivée de l'information mutuelle doit être calculée précisément. Celle-ci ne doit donc pas être déterminée numériquement mais à partir d'une expression analytique des distributions des niveaux de gris. Les histogrammes des images endoscopiques sont typiquement constitués de plusieurs pics (modes). La fenêtre de Parzen est une méthode d'estimation non paramétrique à noyau gaussien qui permet, à partir d'un ensemble de fonctions gaussiennes, de modéliser précisément des fonctions exponentielles

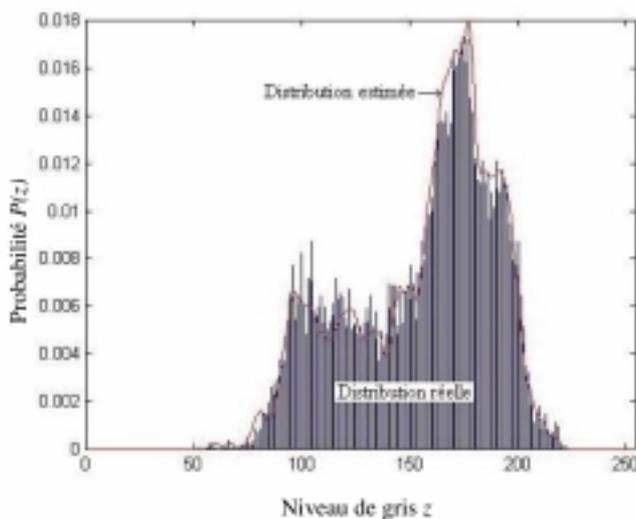
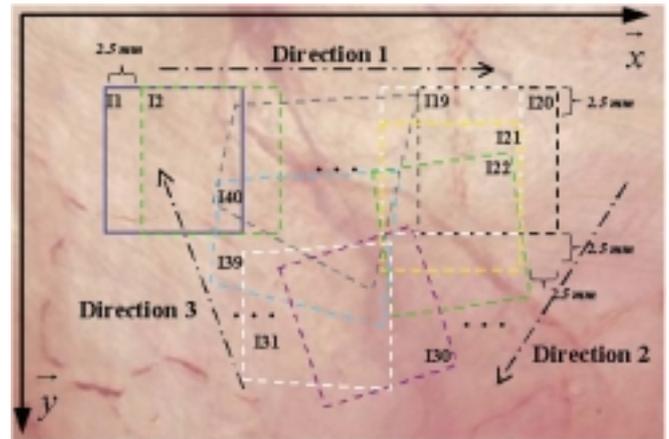


Figure 11. Distribution de la densité de probabilité des niveaux de gris réelle (histogramme de l'image) et estimée par la méthode de la fenêtre de Parzen.

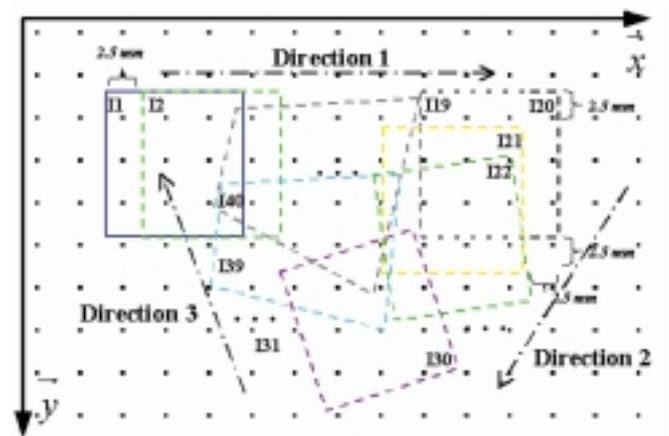
non uni-modales. Dans l'approche proposée, le même écart type σ (à déterminer) est utilisé pour toutes les gaussiennes. Deux échantillons A et B de pixels, de niveaux de gris z_a et z_b , sont tirés au sort dans l'image. Les z_a sont utilisés pour définir les valeurs moyennes des gaussiennes et les z_b pour optimiser leur écart type σ au cours du processus de recalage. Quelques dizaines de gaussiennes (ou de z_a) suffisent pour modéliser précisément les distributions (voir histogramme de la figure 11).

4.4. Validation expérimentale et évaluation quantitative de la qualité du recalage pour le mosaïquage

Pour la validation expérimentale du mosaïquage d'images endoscopiques, un dispositif de positionnement micrométrique (Newport, Contrôleur 3 axes ESP300, platines M-UMR8.51, sensibilité $1\mu m$) a été mis en œuvre pour effectuer un déplacement précis de la tête de l'endoscope. Afin de tester l'algorithme de mosaïquage, une séquence de 40 images endoscopiques d'une photographie de vessie de porc a été acquise. La position de l'endoscope pour la première acquisition et les déplacements de l'endoscope entre chaque paire d'images sont connus (voir figure 12(a)) : translations de 2.5 mm et rotations de 2 degrés entre images (dans le plan et pour la perspective). Le même protocole d'acquisition (mêmes positions de la tête d'endoscope) a été renouvelé avec une mire (en lieu et place de la photographie de vessie) montrant une grille formée de points noirs dont les coordonnées des centres sont également calculées (voir figure 12(b)). Les transformations locales $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ et globales \tilde{T}_{i+1}^g obtenues en recalant les images de vessie sont ensuite utilisées pour construire les mosaïques de la vessie de porc et de la mire. Les images (a) et (b) de la figure 13 montrent la mosaïque par-



(a)



(b)

Figure 12. Représentation schématique du parcours d'acquisition réalisé à l'identique a) sur la photographie de vessie de porc et b) sur la mire (grille de points noirs). La séquence est constituée de 40 images (I1-I40) liées entre elles par des translations uniquement (direction 1), des translations et des rotations dans le plan image (direction 2) et des changements de perspective (direction 3).

tielle de la photographie de vessie construite à partir de la totalité des 40 images acquises lors du parcours décrit précédemment, respectivement sans et avec filtrage du pattern de fibres (passe-bas) et lissage des bords des images. La méthode de lissage implémentée consiste à effectuer la moyenne pondérée des pixels superposés de chaque nouvelle image placée sur la mosaïque, avec des coefficients de pondérations suivant une gaussienne centrée sur cette nouvelle image. La mosaïque correspondante de la grille de petits disques noirs (figure 13(c)), dont les positions ont été calculées avec les transformations \tilde{T}_{i+1}^g obtenues grâce au recalage des images de la vessie, permet une première analyse qualitative. En effet, sur le plan visuel, le recalage des images est relativement juste car les centres des points sont effectivement situés sur des droites parallèles et perpendiculaires symbolisant la grille.

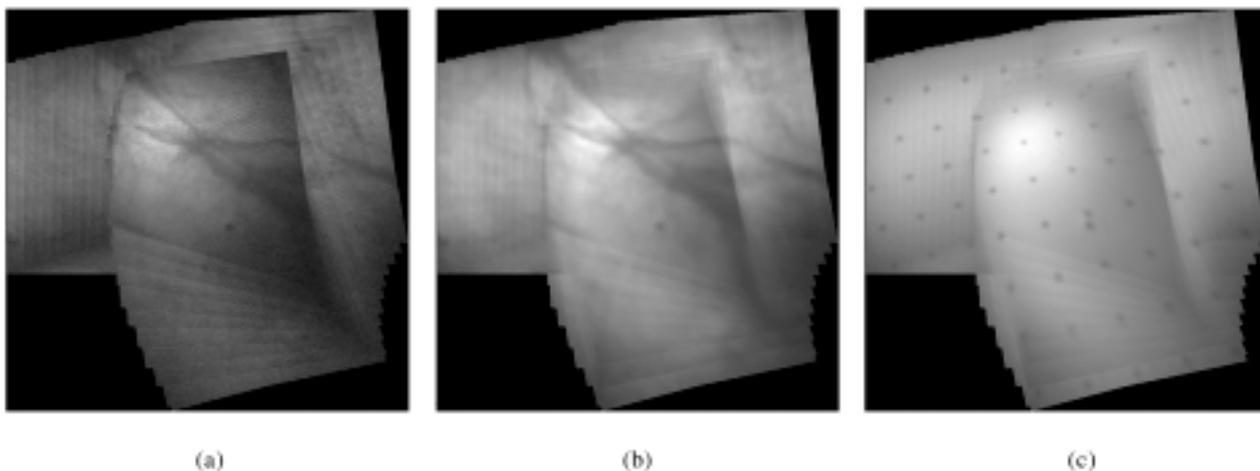


Figure 13. Mosaïque partielle de la photographie de vessie construite à partir de 40 images : (a) sans et (b) avec filtrage passe-bas du pattern de fibres et lissage des bords, et acquises lors du parcours décrit précédemment. La mosaïque correspondante de la grille de points (c) est construite avec les mêmes transformations globales (obtenues lors du recalage des images de la vessie).

Pour estimer quantitativement la précision du mosaïquage, nous avons calculé la distance euclidienne entre la position connue du centre de chaque points et celle du centre du points correspondant dans la carte reconstruite. Ces distances sont représentatives des erreurs de mosaïquage réalisées au niveau du pixel. Les petites imprécisions au niveau des paramètres des matrices $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ induisent des erreurs relativement faibles au niveau du pixel. Les erreurs moyennes réalisées au niveau des paramètres des transformations locales $\tilde{T}_{i,i+1}^l$ entre paires d'images consécutives valent 0.09 pixels pour les translations selon l'axe des abscisses (a_{13}), -0.33 pixels pour les translations selon l'axe des ordonnées (a_{23}), 0.001 pour les facteurs d'échelles selon les axes des abscisses (a_{11}) et des ordonnées (a_{22}), 0.073° pour l'angle de rotation et tendent vers 0 pour les paramètres de projection perspective (a_{31} , a_{32} et a_{33}). Ces erreurs sont plus faibles pour la première paire d'image $(i, i + 1) = (1, 2)$, se cumulent au cours du recalage et deviennent maximales pour la paire formée par la dernière ($i = 40$) et la première image ($i = 1$) (dans l'exemple présenté ici, le parcours de l'endoscope correspond à une boucle). Pour cette paire d'image $(i, i + 1) = (40, 1)$, les distances moyenne, minimale et maximale entre les positions idéales et calculées des centres valent respectivement 6.37, 1.1 et 30.1 pixels.

Environ 250 itérations sont nécessaires en moyenne pour recalage chaque paire d'images, ce qui représente actuellement environ 80 secondes de temps de traitement (PIV 3.2 GHz, 2Go RAM) soit plus de 50 minutes de calcul pour la séquence de 40 images considérée. Ces durées limitent l'exploitation de cette méthode à une utilisation en temps différé (post-opératoire). Nous travaillons actuellement au développement d'autres approches algorithmiques de recalage et de mosaïquage afin de diminuer au maximum ces temps de calcul et pouvoir envisager

des constructions panoramiques exploitables au cours de l'examen clinique.

Les résultats présentés montrent qu'il est possible d'obtenir des mosaïques visuellement suffisamment juste pour que le médecin puisse repérer facilement un endroit donné de l'organe. Un travail est également en cours pour compenser le cumul des erreurs de recalage au cours de la séquence. L'algorithme développé permet de construire des images panoramiques à partir de séquences réelles qui semblent tout à fait correctes visuellement; la figure 14 montre un exemple de carte obtenue pour une séquence vidéo de 249 images d'une cystoscopie sur un patient. La durée moyenne de recalage par paire d'image est de l'ordre de 69 secondes soit plus de 4,75 heures pour traiter la séquence entière.

Par ailleurs, l'observation de différentes séquences vidéos de cystoscopies réalisées en clinique sur patients laisse apparaître que les images qui en sont issues possèdent un contraste supérieur à celui des séquences acquises ici sur la photographie de vessie de porc servant de fantôme. La qualité (résolution et contraste) est meilleure pour l'image vidéo réelle par rapport à l'image imprimée (moins de flou); les conditions d'illumination (et au final le rendu) sont très différentes entre l'impression papier et l'image directement acquise de la vessie. L'information en niveaux de gris contenue dans les images d'endoscopie sur patients (présence de vascularités...) semble ainsi plus riche.

Néanmoins, nous avons constaté que quelques dégradations peuvent parfois faire échouer le recalage comme notamment la présence de perturbations dans la séquence liées à la circulation dans la vessie, selon leur taille et leur vitesse, d'éléments en suspension (morceaux de tissus, sang, etc.). L'utilisateur devra donc veiller à choisir des morceaux de séquence vidéo adaptés

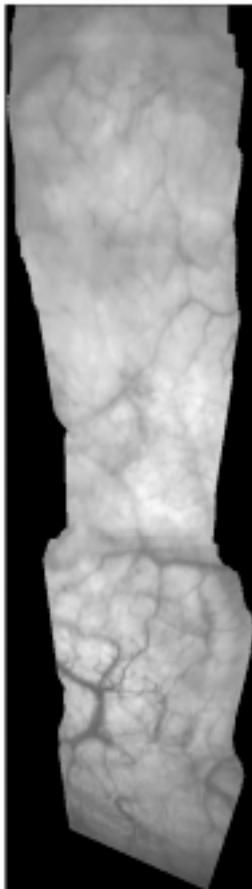


Figure 14. Image panoramique construite à partir de 249 images d'une séquence vidéo de cystoscopie sur patient ; la durée moyenne de recalage par paire d'images est de 69 secondes environ.

mais également s'assurer des conditions d'acquisition permettant d'obtenir un contraste minimum nécessaire dans les images : même si la méthode choisie (information mutuelle sur

niveaux de gris) est justement robuste dans le cas d'images peu contrastées.

4.5. Validation du principe de superposition d'une information de fluorescence sur l'image mosaïque

Pour finir, et afin de valider la faisabilité de superposition sur l'image panoramique d'une information spectrale détectée à l'aide de l'imageur, nous avons utilisé un marqueur fluorescent, invisible à l'observation en lumière blanche, et déposé à un endroit précis sur notre photographie (dont le papier fluoresce également) et sur une surface limitée (environ 1mm^2). Nous avons choisi un marqueur à base de Coumarine (coumCOOH synthétisée par le DCPR UMR CNRS 7630, Nancy), molécule pouvant être utilisée pour simuler la réponse des fluorophores de tissus biologiques compte tenu de ses larges bandes spectrales d'absorption et d'émission centrées autour de 410 et 470 nm respectivement.

Un nouveau protocole de positionnement a été appliqué pour l'acquisition séquentielle des images en lumière blanche et en fluorescence avec un filtre d'excitation à $400 \pm 20\text{nm}$ (largeur à mi-hauteur) et un filtre d'émission passe-bande $480 \pm 10\text{nm}$ (Andover). La figure 14 (a) montre l'image panoramique de vessie obtenue sous éclairage en lumière blanche. Après extraction (seuillage) de la zone fluorescente localisée dans la mosaïque des images de fluorescence correspondante (figure 14(b)), cette information est matérialisée sur l'image panoramique finale (figure 14 (c)) par une valeur particulière d'intensité des pixels concernés (gris foncé dans notre exemple).

Ces premiers résultats permettent de valider la faisabilité de l'acquisition d'images endoscopiques multi-bandes et leur exploitation pour fournir une image panoramique avec localisation de zones de fluorescence particulières. La poursuite de ces travaux de validation expérimentale est prévue dans un premier temps, sur modèles animaux et tumoraux.

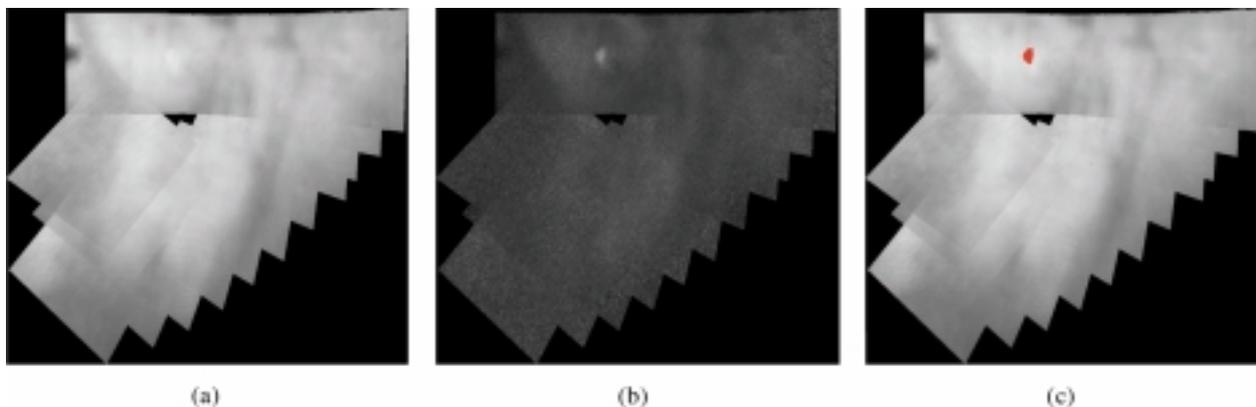


Figure 15. (a) Mosaïque d'une séquence d'images acquise sous lumière blanche. (b) Mosaïque des images de fluorescence correspondantes acquises dans la bande spectrale 470-490 nm. (c) Mosaïque en lumière blanche avec superposition de l'information spectrale (tache gris foncée résultat du seuillage de la mosaïque (b)).

5. Conclusions et perspectives

Nous avons montré l'intérêt et l'efficacité de la spectroscopie d'autofluorescence pour le diagnostic *in situ in vivo* de lésions cancéreuses précoces (œsophage). Nous avons mis en évidence et caractérisé la part du métabolisme cellulaire dans les spectres d'autofluorescence recueillis en montrant notamment que la transformation néoplasique est bien associée à une augmentation de l'intensité d'émission du NAD(P)H masquée par une diminution plus importante de celle du collagène. Les axes de recherche en cours visent à combiner les techniques spectroscopiques de fluorescence, réflectance et diffusion élastique afin d'améliorer encore l'efficacité de la détection des lésions néoplasiques précoces (spectroscopies « bi- ou tri-modales »). La mise en œuvre de ces techniques nécessite le développement de modèles théoriques adaptés auxquels nous travaillons actuellement (simulation statistique en diffusion et fluorescence, milieu multicouche) afin d'identifier des indicateurs diagnostiques pertinents.

Nous avons développé un dispositif d'imagerie endoscopique d'autofluorescence multi-bandes permettant d'acquérir les images en lumière blanche et en fluorescence dans trois bandes spectrales différentes. Nous avons montré une application originale de mosaïquage en vision monoculaire permettant de construire une image panoramique partielle à partir d'une séquence d'images endoscopiques. Les erreurs de recalage ont été quantifiées.

En exploitant les informations d'autofluorescence fournies par l'imageur dans la mosaïque construite, nous avons validé, sur fantôme, la faisabilité d'une superposition des informations spatiale et spectrale d'intérêt pour le clinicien. Le résultat obtenu peut être proposé comme un nouveau support de compte-rendu opératoire ou dans le cadre du suivi du patient.

Il nous faut à présent valider le fonctionnement du dispositif et de la méthode de recalage et mosaïquage développée sur modèles animaux et tumoraux. Avant de passer à des essais cliniques ultérieurs, nous travaillons également au développement d'un algorithme de traitement plus rapide, compatible avec la pratique clinique.

Références

[Anidjar] M. ANIDJAR, D. ETTORI, O. CUSSENOT, P. MERIA, F. DESGRANDCHAMPS, A. CORTESE, P. TEILLAC, A. LE DUC, S. AVRILLIER "Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder tumors: dependence on the excitation wavelength", *The Journal of Urology*, Vol. 156, 1996, p.1590-1596.

[Asari] K. ASARI, S. KUMAR, R. RADHAKRISHNAN "A new approach for nonlinear distortion correction in endoscopic images based on least squares estimation", *IEEE Transactions on Medical Imaging*, Vol. 18, 1999, p. 345-354.

[Backman] V. BACKMAN, M. WALLACE, L. PERELMAN, J. ARENDT, R. GURJAR, M. MULLER, Q. ZHANG, G. ZONIOS, E. KLINE, T. MCGILLICAN, S. SHAPSHAY, T. VALDEZ, K. BADIZADEGAN, J. CRAWFORD, M. FITZMAURICE, S. KABANI, H. LEVIN, M. SEILER, R. DASARI, I. ITZKAN, J. VAN DAM, M. FELD "Detection of preinvasive cancer cells", *Nature*, Vol. 406, 2000, p. 35-36.

[Bansal] R. BANSAL, L. H. STAIB, Z. CHEN, A. RANGARAJAN, J. KRISSELY, R. NATH, J. S. DUNCAN "Entropy-based, multipleportal-to-3DCT registration for prostate radiotherapy using iteratively estimated segmentation", In *Proceedings of the medical image computing and computer assisted intervention (MICCAI'99)*, Vol. 1679, Cambridge, Massachusetts, USA, 19-22 september 1999, p.378-389.

[Benavides] J.M. BENAVIDES, S. CHANG, S.Y. PARK, R. RICHARDS-KORTUM, N. MACKINNON, C. MACAULAY, A. MILBOURNE, A. MALPICA, M. FOLLEN "Multispectral digital colposcopy for in vivo detection of cervical cancer", *Optics Express*, Vol. 11, #10, 2003, p. 1223-1236.

[Bergman] J. BERGMAN, M. KARA, M. SMITS, W. ROSMOLEN, T. KATE, G. TYTGAT "A randomised cross-over study comparing light-induced fluorescence endoscopy (LIFE) with standard endoscopy for detection of early neoplasia in Barrett's esophagus (BE)", *Gastroenterology*, Vol. 124(suppl1), 2003, p. A-49.

[Bigio] I.J. BIGIO, J.R. MOURANT "Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic scattering spectroscopy", *Physics in Medicine and Biology*, Vol. 42, 1997, p. 803-814.

[Bourg-Heckly] G. BOURG-HECKLY, J. BLAIS, J.J. PADILLA, O. BOURDON, J. ETIENNE, F. GUILLEMIN, L. LAFAY "Endoscopic ultraviolet-induced autofluorescence spectroscopy of the esophagus: tissue characterization and potential for early cancer diagnosis", *Endoscopy*, Vol. 32, 2000, p. 756-765.

[Brewer] M. BREWER, U. UTZINGER, E. SILVA, D. GERSHENSON, R. BAST, M. FOLLEN, R. RICHARDS-KORTUM "Fluorescence Spectroscopy for In Vivo Characterization of Ovarian Tissue", *Laser in Surgery and Medicine*, Vol. 29, 2001, p. 128-135.

[Can] A. CAN, C. V. STEWARD, B. ROYSAM "Robust hierarchical algorithm for constructing a mosaic of images of the curved retina", *IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, Fort Collins, Colorado, USA, June 1999, p. 286-292.

[Chang] S. CHANG, M. FOLLEN, M. MALPICA, U. UTZINGER, G. STAERKEL, D. COX, E. ATKINSON, C. MACAULAY, R. RICHARDS-KORTUM "Optimal Excitation Wavelengths for Discrimination of Cervical Neoplasia", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 49, #10, 2002, p. 1102-1111.

[Chou] J. S. CHOU, J. QIAN, Z. WU, H. SCHRAMM "Automatic mosaic and display from a sequence of peripheral angiographic images", *Proceedings of the SPIE Medical Imaging: Image Processing*, Newport Beach, CA, USA, Vol. 3034, april 1997, p. 1077-1087.

[Coghlan] L. COGHLAN, U. UTZINGER, R. DREZEK, D. HEINTZELMAN, A. ZULUAGA, C. BROOKER, R. RICHARDS-KORTUM, I. GIMENEZ-CONTI, M. FOLLEN "Optimal fluorescence excitation wavelengths for detection of squamous intra-epithelial neoplasia: results from an animal model", *Optics express*, Vol. 7, #12, 2000, p. 436-446.

[Demos] S.G. DEMOS, R. GANDOUR-EDWARDS, R. RAMSAMOOJ, R. DEVERE WHITE "Spectroscopic detection of bladder cancer using near-infrared imaging techniques", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 9, #4, 2004, p. 767-771.

[Drezek] R. DREZEK, K. SOKOLOV, U. UTZINGER, I. BOIKO, A. MALPICA, M. FOLLEN, R. RICHARDS KORTUM "Understanding the contribution of NAD(P)H and collagen to cervical tissue fluorescence spectra: Modeling, measurement, and implications", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 6, #4, 2001, p. 385-396.

[Ferris] D.G. FERRIS, R.A. LAWHEAD, E.D. DICKMAN, N. HOLT-ZAPPE, J. MILLER, S. GROGAN, S. BAMBOT, A. AGRAWAL, M. FAUPEL "Multimodal Hyperspectral Imaging for the Noninvasive Diagnosis of Cervical Neoplasia", *Journal of Lower tract Disease*, Vol. 5, #2, 2001, p. 65-72.

- [Georgakoudi-01] I. GEORGAKOUDI, B. JACOBSON, J. VAN DAM, V. BACKMAN, M. WALLACE, M. MULLER, Q. ZHANG, K. BADIZADEGAN, D. SUN, G. THOMAS, L. PERELMAN, M. FELD "Fluorescence, reflectance, and light-scattering spectroscopy for evaluating dysplasia in patients with Barrett's esophagus", *Journal of Lower tract Disease*, Vol. 5, #2, 2001, p. 65-72.
- [Georgakoudi-02] I. GEORGAKOUDI, B. JACOBSON, M. MULLER, E. SHEETS, K. BADIZADEGAN, D. CARR-LOCKE, C. CRUM, C. BOONE, R. DASARI, J. VAN DAM, M. FELD "NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes", *Cancer Research*, Vol. 62, 2002, p. 682-687.
- [Goujon] D. GOUJON, M. ZELLWEGER, A. RADU, P. GROSJEAN, B.C. WEBER, H. VAN DEN BERGH, P. MONNIER, G. WAGNIERES "In vivo autofluorescence imaging of early cancers in the human tracheobronchial tree with a spectrally optimised system", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 8, #1, 2003, p. 17-25.
- [Haringsma] J. HARINGSMA, G. TYGTAT, H. YANO, H. LISHI, M. TATSUTA, T. OGIHARA, H. WATANABE, N. SATO, N. MARCON, B. WILSON, R. CLINE "Autofluorescence endoscopy: feasibility of detection of GI neoplasms unapparent to white light endoscopy with an evolving technology", *Gastrointestinal Endoscopy*, Vol. 53, #6, 2001, p. 642-650.
- [Haussinger] K. HAUSSINGER, F. STANZEL, R.M. HUBER, J. PICHLER, H. STEPP "Autofluorescence Detection of Bronchial Tumors with the D-Light/AF", *Diagnostic and therapeutic Endoscopy*, Vol. 5, 1999, p. 105-112.
- [Heintzelman] L.D. HEINTZELMAN, U. UTZINGER, H. FUCHS, A. ZULUAGA, K. GOSSAGE, A. GILLENWATER, R. JACOB, B. KEMP, R. RICHARDS-KORTUM "Optimal excitation wavelengths for in vivo detection of oral neoplasia using fluorescence spectroscopy", *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 72, #1, 2000, p. 103-113.
- [Helferty] J.P. HELFERTY, C. ZHANG, G. MACLENNAN, W.E. HIGGINS "Videoendoscopic distortion correction and its application to virtual guidance of endoscopy," *IEEE Transactions in Medical Imaging*, Vol. 20, pp. 605-617, 2001.
- [Hüttenberger] D. HUTTENBERGER, T. GABRECHT, G. WAGNIERES, B. WEBER, A. LINDER, H.G. FOTH, L. FREITAG "Autofluorescence detection of tumors in the human lung – comparison between in vivo and vitro measurements", In *SPIE-ECBO European Conference on Biomedical Optics*, Munich, Allemagne, 12-16 juin, 2005.
- [Jalink] A. JALINK, J. Mc ADOO, G. HAMALA, H. LIU "Mosaic techniques for large-field digital mammography" *IEEE Transactions on Medical Imaging*, Vol. 15, #3, 1996, p. 260-267.
- [Kakihana] M. KAKIHANA, K.K. IL, T. OKUNAKA, K. FURUKAWA, T. HIRANO, C. KONAKA, H. KATO, Y. EBIHARA "Early Detection of Bronchial Lesions Using System of Autofluorescence Endoscopy (SAFE) 1000", *Diagnostic and Therapeutic Endoscopy*, Vol. 5, 1999, p. 99-104.
- [Kara] M. KARA, R.S. DACOSTA, B.C. WILSON, N.E. MARCON, J. BERGMAN "Autofluorescence-based detection of early neoplasia in patients with Barrett's esophagus", *Digestive Diseases*, Vol. 22, 2004, p. 134-141.
- [Kobayashi] M. KOBAYASHI, K. SHIBUYA, H. HOSHINO, T. FUJISAWA "Spectroscopic analysis of the autofluorescence from human bronchus using an ultraviolet laser diode", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 7, #4, 2002, p. 603-608.
- [Koenig] F. KOENIG, F.J. MCGOVERN, H. ENQUIST, R. LARNE, T. DEUTSCH, K. SCHOMACKER "Autofluorescence Guided Biopsy for the Early Diagnosis of Bladder Carcinoma", *The Journal of Urology*, Vol. 159, 1998, p. 1871-1875.
- [Kortum] R. RICHARDS-KORTUM, R. RAVA, R. PETRAS, M. FITZMAURICE, M. SIVAK, M. FELD "Spectroscopic diagnosis of colonic dysplasia", *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 53, #6, 1991, p. 777-786.
- [Kumar] D. KUMAR, M. SINGH "Characterization and imaging of compositional variation in tissues", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 50, #8, 2003, p. 1012-1019.
- [Liu] Q. LIU "Experimental validation of Monte Carlo modelling of fluorescence in tissues in the UV-visible spectrum", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 8, #2, 2003, p. 223-236.
- [Miranda-04a] R. MIRANDA-LUNA, Y. HERNANDEZ-MIER, Ch. DAUL, W. BLONDEL, D. WOLF "Mosaicing of medical videoendoscopic images: data quality improvement and algorithm testing", *IEEE International Conference on Electrical and Electronics Engineering (ICEEE) and Tenth Conference on Electrical Engineering (CIE 2004)*, Acapulco Guerrero, Mexico, September 2004, p. 530-535.
- [Miranda-04b] R. MIRANDA-LUNA, W. BLONDEL, Ch. DAUL, Y. HERNANDEZ-MIER, R. POSADA, D. WOLF "A simplified method of video-endoscopic image barrel distortion correction based on grey-level registration", *IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)*, Singapore, October 24-27 2004, p. 3383-3386.
- [Miranda-05] R. MIRANDA-LUNA, Y. HERNANDEZ-MIER, W.C.P.M. BLONDEL, C. DAUL, D. WOLF "Mosaicing of videoendoscopic images and evaluation of the resulting cartography" In *Imaging for medical and life sciences Symposium (IMVIE2)*, Strasbourg, France, March 1-3, 2005.
- [Müller] M.G. MULLER, T.A. VALDEZ, I. GEORGAKOUDI, V. BACKMAN, C. FUENTES, S. KABANI, N. LAVER, Z. WANG, C.W. BOONE, R.R. DASARI, S.M. SHAPSHAI, M.S. FELD "Spectroscopic Detection and Evaluation of Morphologic and Biochemical Changes in Early Human Oral Carcinoma", *Cancer*, Vol. 97, #7, 2003, p. 1681-1692.
- [Padilla] J.J. PADILLA IBARRA, "Biopsie Optique par Spectroscopie de Fluorescence des Tissus Vivants: Spectroscopie UV, Microscopie, Spectroscopie Résolue dans le Temps. Conception Instrumental, Traitement Automatique du Signal et Modélisation", Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine; Novembre 1999.
- [Palmer] G.M. PALMER, C. ZHU, T.M. BRESLIN, F. XU, K.W. GILCHRIST, N. RMANUJAM "Comparison of multiexcitation fluorescence and diffuse reflectance spectroscopy for the diagnosis of breast cancer (march 2003)", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 50, #11, 2003, p. 1233-1242.
- [Pfefer] T.J. PFEFER, D.Y. PAITHANKAR, J.M. PONEROS, K.T. SCHOMACKER, N.S. NISHIOKA "Temporally and spectrally resolved fluorescence spectroscopy for the detection of High Grade Dysplasia in Barrett's Esophagus", *Lasers in Surgery and Medicine*, Vol. 32, 2003, p. 10-16.
- [Pluim] J.P.W. PLUIM, J.B.A. MAINTZ, M.A. VIERGEVER "Mutual-information-based registration of medical images: a survey", *IEEE Transactions on Medical Imaging*, Vol. 22, #8, 2003, p. 986-1004.
- [Pradhan] A. PRADHAN, P. PAL, G. DUROCHER, L. VILLENEUVE, A. BALASSY, F. BABAI, L. GABOURY, L. BLANCHARD "Steady state and time-resolved fluorescence properties of metastatic and non-metastatic malignant cells from different species", *Journal of Photochemistry and Photobiology*, Vol. 31, 1995, p. 101-112.
- [Ramanujam-96] N. RAMANUJAM, M. MITCHELL, A. JANSEN, S. THOMSEN, G. STAERKEL, A. MALPICA, T. WRIGHT, N. ATKINSON, R. RICHARDS-KORTUM "Cervical precancer detection using a multivariate statistical algorithm based on laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths", *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 64, #4, 1996, p. 720-735.
- [Ramanujam-00] N. RAMANUJAM "Fluorescence Spectroscopy in Vivo", *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2000, Ed. R.A. Meyers.
- [Rollins] A. ROLLINS, M.V. SIVAK "Potential new endoscopic techniques for the earlier diagnosis of pre-malignancy", *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Vol. 15, #2, 2001, p. 227-247.
- [Sarrut] D. SARRUT, S. CLIPPE "Patient positioning in radiotherapy by registration of 2D-portal to 3D-CT images by a content-based research with similarity measures", In *Proceedings of the 14th Computer Assisted Radiology and Surgery*, Elsevier Science, USA, June 2000.
- [Sawhney] H.S. SAWHNEY, R. KUMAR "True multi-image alignment and its application to mosaicing and lens distortion correction," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Vol. 18, p. 235-243, 1999.

- [Schindler] T. H. SCHINDLER, N. MAGOSAKI, M. JESERICH, U. OSER, T. KRAUSE, R. FISCHER, E. MOSER, E. NITZSCHE, M. ZEHNDER, H. JUST, U. SOLBACH "Fusion imaging: combined visualization of 3D-reconstructed coronary artery tree and 3D-myocardial scintigraphic image in coronary artery disease", *International Journal of Cardiac Imaging*, Vol. 15, 1999, p. 357-368.
- [Shahidi] R. SHAHIDI, M. BAX, C. MAURER, J. JOHNSON, E. WILKINSON, B. WANG, J. WEST, M. CITARDI, K. MANWARING, R. KHADEM "Implementation, calibration and accuracy testing of an image-enhanced endoscopy system", *IEEE transactions on Medical Imaging*, Vol. 21, #12, 2002, p. 1524-1535.
- [Skala] M.C. SKALA, G.M. PALMER, C. ZHU, Q. LIU, K.M. VROSTOS, C.L. MARSHEK-STONE, A. GENDRON-FITZPATRICK, N. RAMANUJAM "Investigation of fiber-optic probe designs for optical spectroscopic diagnosis of epithelial pre-cancers", *Lasers in Surgery and Medicine*, Vol. 34, 2004, p. 25-38
- [Sokolov] K. SOKOLOV, M. FOLLEN, K.R. RICHARD "Optical Spectroscopy for detection of neoplasia", *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 6, 2002, p. 665-658.
- [Svistun] E. SVISTUN, R. ALIZADEH-NADERI, A. EL-NAGGAR, R. JACOB, A. GILLENWATER, R. RICHARDS-KORTUM "Vision enhancement system for detection of oral cavity neoplasia based on autofluorescence", *Head Neck*, Vol. 26, 2004, p. 205-215
- [Takehana] S. TAKEHANA, M. KANEKO, H. MIZUNO "Endoscopic Diagnostic System Using Autofluorescence", *Diagnostic and Therapeutic Endoscopy*, Vol. 5, 1999, p. 59-63.
- [Thueler] P. THUELER, I. CHARVET, F. BEVILACQUA, M. St. GHISLAIN, G. ORY, P. MARQUET, P. MEDA, B. VERMEULEN, C. DEPEURSINGE "In vivo endoscopic tissue diagnostics based on spectroscopic absorption, scattering, and phase function properties", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 8, #3, 2003, p. 495-503
- [Valet] G. VALET, S. SANCHEZ, J. LOPEZ, Ch. DAUL, D. WOLF, G. KARCHER "Towards a new diagnosis aid of cardiovascular diseases using 2D-multimodal data registration and 3D-data superimposition", *IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)*, Singapore, October 24-27 2004, p. 1907-1910.
- [Villette-04] S. VILLETTE "Analyse spectroscopique de l'autofluorescence de cellules oesophagiennes saines et tumorales in vitro et développement d'un microspectro-imageur confocal fibré destiné à l'exploration *in vivo*", Thèse de doctorat, Université Paris 6, octobre 2004.
- [Villette-06] S. VILLETTE, S. PIGAGLIO-DESHAYES, C. VEVEBIZET, G. BOURG-HECKLY "Ultraviolet induced autofluorescence characterization of normal and tumoral esophageal epithelium cells with quantification of NAD(P)H", *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 5, 2006, p. 483-492.
- [Viola] P. VIOLA "Alignment by Maximization of Mutual Information", *PhD Thesis*. AI Technical Report No.1548, Massachusetts Institute of Technology, 1995.
- [Vogt] R C. VOGT, J. M. TRENKLE, L. A. HARMON "Mosaic construction, processing and review of very large electron micrograph composites", *Proceedings of the SPIE*, Denver, Vol. 2847, August 1996, p. 2-15.
- [Wagnières-98] G. WAGNIERES, W.M. STAR, B.C. WILSON "In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for oncological applications", *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 68, #5, 1998, p. 603-632.
- [Wagnières-00] G. WAGNIERES, M. ZELLWEGER, N. CHAUVIN, N. LANGE, U. ZANGER, A. STUDZINSKI, H. VAN DEN BERGH "Diagnosis apparatus for the picture providing recording of fluorescing biological tissue regions" US Patent 6,148,227, November 2000.
- [Wallace] M. WALLACE, L. PERELMAN, V. BACKMAN, J. CRAWFORD, M. FITZMAURICE, M. SEILER, K. BADIZADEGAN, S. SHIELDS, I. ITZKAN, R. DASARI, J. VAN DAM, M. FELD "Endoscopic detection of dysplasia in patients with Barrett's esophagus using light-scattering spectroscopy", *Gastroenterology*, Vol. 119, 2000, p. 677-682.
- [Weng] L. WENG, A. P. TURUMALAI "Method and apparatus for generating large compound ultrasound images" US Patent 5,575,286, November 1996.
- [Zellweger] M. ZELLWEGER, P. GROSJEAN, D. GOUJON, P. MONNIER, H. VAN DEN BERGH, G. WAGNIERES "In vivo autofluorescence spectroscopy of human bronchial tissue to optimise the detection and imaging of early cancers" *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 6, #1, 2001, p. 41-51.
- [Zheng] W. ZHENG, W. LAU, C. CHENG, K.C. SOO, M. OLIVO "Optimal excitation-emission wavelengths for autofluorescence diagnosis of bladder tumors", *International Journal of Cancer*, Vol. 104, 2003, p. 477-481.
- [Zeng] H. ZENG, M. PETEK, M.T. ZORMAN, A. McWILLIAMS, B. PALCIC, S. LAM "Integrated endoscopy system for simultaneous imaging and spectroscopy for early lung cancer detection", *Optics Letters*, Vol. 29, #6, 2004, p. 587-589
- [Zonios] G. ZONIOS, R. COTHREN, J. ARENDT, J. WU, J. VAN DAM, J. CRAWFORD, R. MANOHARAN, M. FELD "Morphological model of human colon tissue fluorescence", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 43, #2, 1996, p. 113-122.



Walter Blondel

Walter Blondel est né en 1968 à Nancy. Il est ingénieur ESIGELEC (91), titulaire du Master of Science (MSc) en optoélectronique de l'université de Hertfordshire (Angleterre, 92) et du doctorat en Génie Biologique et Médical de l'université Henri Poincaré Nancy 1 (UHP, 2000). Agrégé de Génie Électrique, il est Maître de Conférences à la faculté de médecine (Nancy Université) où il enseigne l'instrumentation et le traitement des signaux en Master (Ingénierie Biomédicale). Responsable depuis 2003 du projet « Spectro-Imagerie de Diagnostic » au sein du CRAN (UMR 7039 CNRS-INPL-UHP), ses activités de recherche concernent les applications de l'instrumentation et du traitement des signaux (1D, 2D) à l'ingénierie pour la santé et en particulier aux interactions lumière – tissus biologiques (modélisation) dans le cadre du photodiagnostic .



Christian Daul

Christian Daul a obtenu un doctorat en sciences (spécialité : vision par ordinateur) de l'Université Louis Pasteur (ULP), à Strasbourg en 1994. De 1990 à 1995, il a été chercheur au Laboratoire des Sciences de l'Image, de l'Informatique et de la Télé-détection (LSIIT, ULP) avant de rejoindre l'« Institut für Techno- und Wirtschaftsmathematik » (ITWM, Fraunhofer Institut) de Kaiserslautern, Allemagne, où il était membre du groupe de traitement d'images. Depuis octobre 1999, il est chercheur au Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN UMR CNRS 7039) où il travaille dans le domaine de l'imagerie médicale. Ses principaux thèmes de recherche sont la segmentation, le recalage et la reconstruction 3D de données. Il est actuellement maître de conférences à l'Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL/EEIGM) où il enseigne dans le domaine du traitement du signal.



Sandrine **Villette**

Sandrine Villette est née en 1976, dans la Sarthe. Elle est titulaire d'un diplôme d'ingénieur en optique (École Supérieure d'Optique, Orsay). Elle a obtenu le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris 6) en 2004. Après un premier stage postdoctoral aux Pays-Bas, dans le groupe « Biophysical Engineering » de l'Université de Twente et le « Laser Centre » de l'Academic Medical Center d'Amsterdam, elle travaille actuellement au Service de Bioénergétique du CEA de Saclay, dans l'équipe de Klaus Brettel. Ses travaux de recherches sont orientés vers les applications de l'optique dans le domaine biomédical, avec une spécialisation en spectroscopie (autofluorescence, Raman, absorption).



Rosebet **Miranda-Luna**

Rosebet Miranda Luna est né en 1973 au Mexique. Il est titulaire d'un diplôme d'ingénieur en électronique (Instituto Tecnológico de San Luis Potosi). Il a obtenu le titre de « Master in Science » (MS) du « Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del IPN » (Mexique) en 2000, et le grade de Docteur en 2005 à l'Institut National Polytechnique de Lorraine (Nancy, France). Ses sujets d'intérêt sont le traitement des signaux et d'images avec application médicale, au même titre que l'automatisation et l'instrumentation.



Yahir **Hernandez-Mier**

Yahir Hernandez Mier est né en 1977 à Durango, Mexique. Il est ingénieur en électronique par l'ITCV (Mexique, 1999) et il a obtenu le Master of Science (Msc) en bioélectronique au Centre de Recherche et d'études Avancées de l'Institut Polytechnique National (CINVESTAV-IPN) (Mexique, 2003). Il fait actuellement des études de doctorat au sein du groupe Ingénierie Pour la Santé du Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN UMR CNRS 7039), où il travaille dans le domaine du traitement d'images, spécifiquement dans le mosaïquage d'images.



Geneviève **Bourg-Heckly**

Geneviève Bourg-Heckly est née en 1948 à Metz. Titulaire d'un doctorat en physique de l'université Paris 6 et HDR, elle a commencé sa carrière comme chercheur en physique de l'atmosphère. Elle a ensuite travaillé une dizaine d'années dans l'industrie du laser puis de l'imagerie médicale, avant de rejoindre l'université Paris 6 en tant que Maître de Conférences. Depuis 1996 elle développe au sein du BioMoCeTi (UMR CNRS 7033) une activité de recherche en optique biomédicale. Responsable de l'équipe « Applications Biomédicales », ses travaux concernent les nouvelles méthodes de diagnostic précoce fondées sur l'exploitation de la spectroscopie tissulaire de fluorescence et la thérapie photodynamique. Les études menées vont de l'aspect fondamental au niveau cellulaire et tissulaire à l'application clinique.



Didier **Wolf**

Didier Wolf est professeur d'Automatique à l'ENSEM-INPL, responsable du thème « Ingénierie pour la Santé » et directeur adjoint du CRAN-UMR 7039. Ses activités de recherche concernent le traitement du signal et de l'image appliqué à la radiothérapie, au photodiagnostic pré-cancéreux et à l'analyse des signaux physiologiques (EEG)

