



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1998/09/11
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1999/03/25
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2009/06/30
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2000/03/10
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1998/001950
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1999/013764
(30) Priorité/Priority: 1997/09/12 (FR97/11534)

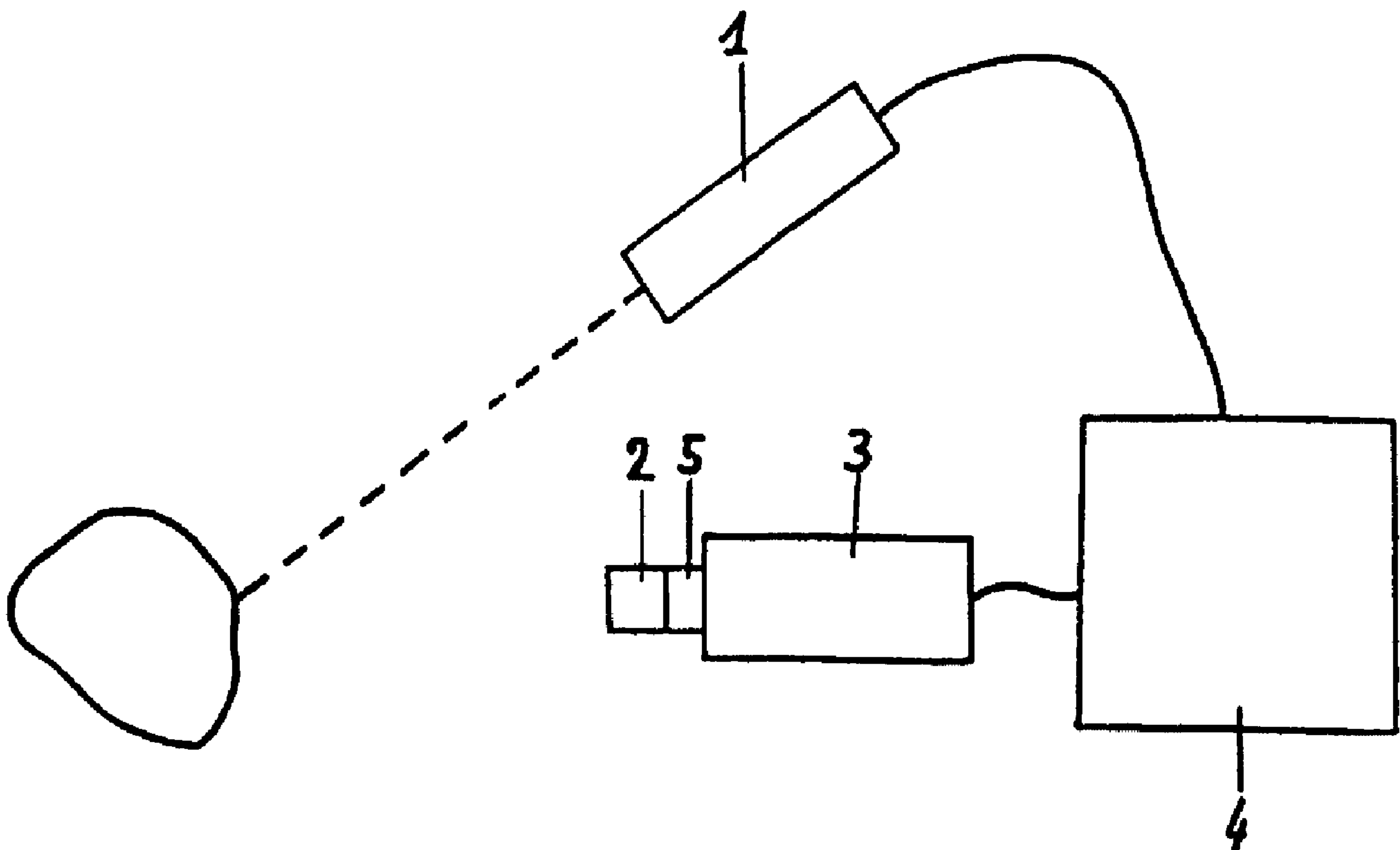
(51) Cl.Int./Int.Cl. *A61B 5/00* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
APRAHAMIAN, PIERRE MARC, FR;
HEISEL, FRANCINE, FR;
LUCIA, ALFREDO, IT;
MIEHE, JOSEPH-ALBERT, FR;
SOWINSKA, MALGORZATA, FR;
WHELAN, MAURICE, IT

(73) Propriétaire/Owner:
COMMUNAUTE EUROPEENNE, LU

(74) Agent: GOWLING LAFLEUR HENDERSON LLP

(54) Titre : DETECTION ET CARTOGRAPHIE DE ZONES ENFLAMMEES DE TISSUS VIVANTS
(54) Title: DETECTING AND MAPPING INFLAMED ZONES IN A LIVING TISSUE



(57) Abrégé/Abstract:

La présente invention a pour objet un procédé de détection et de cartographie de zones enflammées de tissus vivants ainsi qu'un dispositif pour sa mise en oeuvre. Procédé caractérisé en ce qu'il consiste à soumettre les tissus à analyser à une excitation lumineuse avec un domaine spectral prédéterminé, à acquérir au moins le signal de fluorescence brute des porphyrines pour une pluralité de points de mesure, et à déterminer, pour chaque point de mesure, l'intensité de fluorescence pour les longueurs d'onde caractéristiques des porphyrines endogènes.

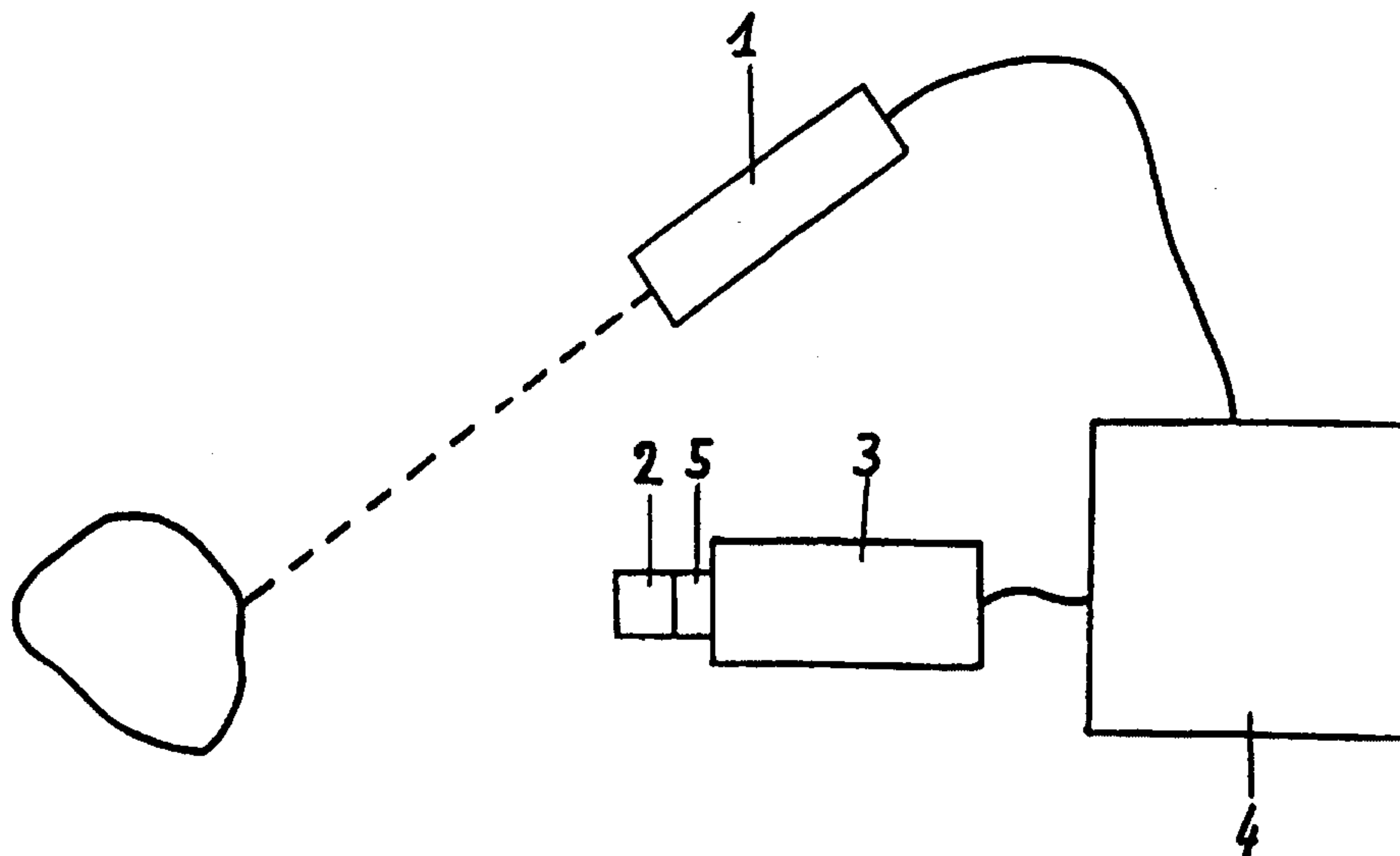
PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61B 5/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/13764 (43) Date de publication internationale: 25 mars 1999 (25.03.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01950 (22) Date de dépôt international: 11 septembre 1998 (11.09.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/11534 12 septembre 1997 (12.09.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMUNAUTE EUROPEENNE [-/LU]; Bâtiment Jean Monnet, Plateau du Kirchberg, L-2920 Luxembourg (LU). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): APRAHAMIAN, Pierre, Marc [FR/FR]; 6, rue des Noyers, F-67150 Limersheim (FR). HEISEL, Francine [FR/FR]; 26, rue du Champ des Manoeuvres, F-67200 Strasbourg (FR). LUCIA, Alfredo [IT/IT]; Via Marconi, 14, I-21020 Osmate (IT). MIEHE, Joseph-Albert [FR/FR]; 9, rue Curie, F-67200 Strasbourg (FR). SOWINSKA, Malgorzata [FR/FR]; 3, rue Albert Schweitzer, F-67117 Ittenheim (FR). WHELAN, Maurice [IT/IT]; Via Alberto, 49, I-21020 Ranco (IT). (74) Mandataire: CABINET NUSS; 10, rue Jacques Kablé, F-67080 Strasbourg Cedex (FR).	(81) Etats désignés: CA, JP, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale.	

(54) Title: DETECTING AND MAPPING INFLAMED ZONES IN A LIVING TISSUE

(54) Titre: DETECTION ET CARTOGRAPHIE DE ZONES ENFLAMMEES DE TISSUS VIVANTS



(57) Abstract

The invention concerns a method for detecting and mapping inflamed zones in living tissues and a device for implementing said method. The method is characterised in that it consists in subjecting the tissues to be analysed to a luminous excitation with a predetermined spectral domain, acquiring at least the raw fluorescence signal of the porphyrins for a plurality of measurement points, and in determining, for each measurement point, the intensity of the fluorescence for the wavelengths characteristic of endogenous porphyrins.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet un procédé de détection et de cartographie de zones enflammées de tissus vivants ainsi qu'un dispositif pour sa mise en oeuvre. Procédé caractérisé en ce qu'il consiste à soumettre les tissus à analyser à une excitation lumineuse avec un domaine spectral prédéterminé, à acquérir au moins le signal de fluorescence brute des porphyrines pour une pluralité de points de mesure, et à déterminer, pour chaque point de mesure, l'intensité de fluorescence pour les longueurs d'onde caractéristiques des porphyrines endogènes.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

DETECTION ET CARTOGRAPHIE DE ZONES ENFLAMMEES DE TISSUS VIVANTS

La présente invention concerne le domaine de l'examen et de l'analyse de tissus vivants, et a pour objet un procédé de détection et de cartographie de zones enflammées de tissus vivants, ainsi qu'un dispositif pour sa mise en oeuvre.

5 Le terme "Inflammation" désigne généralement, et notamment dans la présente, l'ensemble des processus développés par un organisme vivant en réponse à une agression d'origine interne ou externe.

L'inflammation fait intervenir le système majeur d'histocompatibilité cellulaire comportant les leucocytes, les lymphocytes, les monocytes, les
10 histocytes, les macrophages, etc..., ainsi que leurs produits de sécrétion, telles que prostaglandines, histamines, sérotonines et cytokines (interférons, interleukines, facteurs de nécrose tumorale...).

Il est déjà connu d'utiliser la fluorescence d'un chromophore exogène du type dérivé d'hématoporphyrine ou du type précurseur de la protoporphyrine IX
15 (acide 5-amino-lévulinique) pour détecter des lésions inflammatoires ou cancéreuses.

En effet, il a été montré que ces chromophores exogènes se concentrent, après injection, plus particulièrement au niveau des lésions inflammatoires ou cancéreuses.

20 En outre, il est également connu des méthodes de dépistage de cancers basées sur les variations de l'autofluorescence dans la bande spectrale de lumière bleue.

Dans ces dernières méthodes sont pris en compte les chromophores endogènes dérivés des nicotinamides (NAD, NADH), ou constituants de la
25 matrice extracellulaire tels que les collagènes, les élastines ou des dérivés des flavines.

Par ailleurs, la présence de porphyrines dans les tissus est connue depuis les années 1920. Elle a été observée dans un premier temps au niveau des tumeurs, puis de la glande de Harder (située en arrière des muscles de l'oeil) des
30 rongeurs et enfin en très faible quantité au niveau des tissus normaux. Il s'agit majoritairement de la protoporphyrine IX synthétisée au niveau cellulaire à partir de l'acide 5-amino-lévulinique, étape préliminaire à la synthèse de l'hémoglobine.

La raison de la présence de cette voie enzymatique (normalement exprimée au seul niveau de la moelle osseuse) dans les tissus normaux ou

- 2 -

tumoraux reste pour l'instant inconnue, bien qu'il ait été montré récemment que cette synthèse est sous le contrôle de certaines hormones hypophysaires.

Or, les inventeurs de la présente invention ont constaté, de manière inattendue et surprenante, la présence d'une quantité anormalement élevée de porphyrines dans de nombreuses situations dont le caractère commun est l'existence d'une inflammation. Présentes à des niveaux très faibles dans les tissus sains qui ont été étudiés (muscles, oesophage, pancréas et foie, à un niveau légèrement plus élevé dans ce dernier, lieu de destruction partielle des globules rouges), ces porphyrines endogènes deviennent très abondantes dans ces mêmes tissus après agression par un traumatisme (muscle), par un produit irritant (foie), par le développement d'un cancer (oesophage, pancréas) ou d'une pancréatite expérimentale aiguë ou chronique.

La présente invention a donc pour principal objet un procédé de détection et de cartographie de zones enflammées de tissus vivants, caractérisé en ce qu'il consiste à soumettre les tissus à analyser à une excitation lumineuse avec un domaine spectral prédéterminé, à acquérir au moins le signal de fluorescence brute des porphyrines pour une pluralité de points de mesure, et à déterminer, pour chaque point de mesure, au moins l'intensité de fluorescence pour les longueurs d'onde caractéristiques des porphyrines endogènes.

L'invention a également pour objet un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé précité, principalement constitué par une unité d'excitation lumineuse de faible intensité dans les bandes spectrales centrées sur environ 400 nm et sur environ 590 nm, un module de filtrage comprenant un jeu de filtres passe-bande adaptés pour la sélection des fluorescences spécifiques aux différents chromophores recherchés, une unité de détection et d'enregistrement d'images de la fluorescence de la surface des tissus examinés et, enfin, une unité informatique pour le traitement point par point, ou pixel par pixel, des images recueillies et le contrôle et la gestion de l'ensemble du dispositif, associé à des moyens de stockage et d'édition d'images.

L'invention sera mieux comprise grâce à la description ci-après, qui se rapporte à un mode de réalisation préféré, donné à titre d'exemple non limitatif, et expliqué avec référence aux dessins schématiques annexés, dans lesquels :

la figure 1 représente des spectres de fluorescence, d'une part, de muscles en cours de réparation cicatricielle (lors de la phase dite "inflammatoire") et, d'autre part, d'un muscle indemne (en ligne pointillée) ;

- 3 -

la figure 2 représente les spectres de fluorescence, d'une part, d'un foie lésé par injection rétrograde de taurocholate (pour reproduire une lésion de type hépatite) et, d'autre part, d'un foie indemne (en ligne pointillée) ;

la figure 3 représente les spectres de fluorescence, d'une part, d'oesophages porteurs d'adénocarcinomes et, d'autre part, d'un oesophage indemne (en ligne pointillée fine) ;

la figure 4 représente les spectres de fluorescence, d'une part, de pancréas présentant des stades d'intensité croissante de pancréatite aiguë nécrotico-hémorragique et, d'autre part, d'un pancréas indemne (en ligne pointillée) ;

la figure 5 représente les spectres de fluorescence, d'une part, de pancréas porteurs d'adénocarcinomes de phénotype ductal et, d'autre part, d'un pancréas indemne (en ligne pointillée) ;

la figure 6 représente les spectres de fluorescence, d'une part, de zones saines de pancréas porteurs d'adénocarcinomes et, d'autre part, d'un pancréas indemne (en ligne pointillée) ;

la figure 7 représente les spectres de fluorescence, d'une part, de pancréas atteints de pancréatites chroniques et, d'autre part, d'un pancréas indemne (en ligne pointillée) ;

les figures 8 et 9 représentent des images de fluorescence d'un pancréas de rat atteint de pancréatite aiguë recueillies à 630 nm, à 680 nm (en remplacement d'une valeur idéale de 600 nm) et à 470 nm, les images obtenues après traitement par soustraction et par division point par point selon le procédé conforme à l'invention et les images finales utilisées pour la localisation (marquées Photo + Traitée), et,

la figure 10 est une représentation schématique d'un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé décrit ci-dessus.

Conformément à l'invention, le procédé de détection et de cartographie de zones enflammées de tissus vivants, consiste essentiellement à soumettre les tissus à analyser à une excitation lumineuse avec un domaine spectral prédéterminé, à acquérir au moins le signal de fluorescence brute des porphyrines pour une pluralité de points de mesure, et à déterminer, pour chaque point de mesure, l'intensité de fluorescence pour les longueurs d'onde caractéristiques des porphyrines endogènes.

Par porphyrines endogènes, les inventeurs entendent les porphyrines normalement présentes dans les tissus sans aucun apport exogène, notamment sans apport d'agent externe entraînant un accroissement de la formation de

- 4 -

porphyrines, tel que par exemple l'acide δ -aminolévulinique (ALA) précurseur de la protoporphyrine IX.

Les figures 1 à 7 représentent des exemples de spectres de fluorescence de différents tissus sains et des mêmes tissus présentant des inflammations d'origines diverses.

Il convient de noter qu'on peut observer, sur tous ces spectres, une bande d'émission fluorescente dans le rouge (sensiblement comprise entre 600 et 800 nm) d'intensité plus ou moins élevée et qui présente systématiquement deux pics d'émission aisément reconnaissables, à savoir un pic majeur à 630 nm et un pic mineur à 690 nm, ce double pic étant caractéristique de la fluorescence des porphyrines.

Il ressort également de ces figures que dans tous les cas d'inflammations représentés, le maximum de la bande de fluorescence dans le bleu présente un décalage vers le vert d'environ 50 nm.

Par ailleurs, il a également été constaté, indépendamment de la valeur absolue de la fluorescence (très difficile à estimer pour des tissus denses), une augmentation du rapport des intensités de fluorescence émises dans le rouge (porphyrines) sur celles émises dans le bleu (constituants de la matrice cellulaire et extra cellulaire), en relation avec une augmentation correspondante de la gravité de l'inflammation.

Cette relation de dépendance indique l'existence d'une corrélation directe entre, d'une part, la concentration des porphyrines, et donc la valeur de l'intensité de fluorescence pour les longueurs d'onde caractéristiques de la porphyrine et, d'autre part, l'importance et l'intensité des lésions inflammatoires, permettant la gradation du caractère inflammatoire d'une lésion tissulaire.

Cette possibilité de réaliser une gradation de la gravité du processus inflammatoire a été vérifiée par les inventeurs par comparaison entre les phénomènes macroscopiques observés à l'autopsie d'animaux porteurs de pancréatite et les mesures de fluorescence des porphyrines endogènes effectuées sur les pancréas correspondants.

Il apparaît ainsi qu'en cas de pancréatite réduite (simple oedème de la glande) cette fluorescence est multipliée par deux en comparaison de celle du tissu pancréatique normal (sain). Une pancréatite sévère, conduisant à la mort de l'animal, avec à l'autopsie une glande pancréatique nécrosée, est corrélée à une fluorescence des porphyrines endogènes cinq fois plus élevée qu'en cas de pancréatite oedémateuse simple.

- 5 -

La figure 4 présente les spectres correspondant à ces situations cliniques - à savoir pancréas sain, pancréatite oedémateuse simple, pancréatite nécrotico-hémorragique - avec en plus le spectre d'un pancréatite intermédiaire.

5 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le procédé consiste à former une image de fluorescence des tissus à analyser sur laquelle apparaît la ou les zones enflammées, en utilisant au moins les valeurs déterminées de l'intensité de fluorescence propres aux porphyrines endogènes pour les différents points de mesure considérés.

10 Ainsi, le procédé conforme à l'invention permet notamment d'apprécier, par mesure de la fluorescence des porphyrines, le caractère inflammatoire d'un épithélium (peau et muqueuses), et d'établir un facteur prédictif de son évolution ultérieure (par exemple cicatrice chéloïde ou transformation maligne d'un naevus pigmentaire).

15 Il permet également d'apprécier les inflammations au niveau des épithéliums ou endothéliums des voies aériennes, digestives, urinaires ou génitales par mesure endoscopique de la fluorescence des porphyrines et d'établir un facteur de gradation des lésions (par exemple, oesophage de Barret : lésion inflammatoire de l'oesophage évoluant progressivement vers la cancérisation) ou de suivre leur évolution (par exemple, ulcère peptique de l'estomac pouvant évoluer vers la guérison, la cicatrice fibreuse ou la cancérisation).

20 Il permet également d'apprécier, par exemple, au cours d'une intervention chirurgicale ou d'une ERCP (endoscopie rétrograde cholédocho-pancréatique), le niveau d'inflammation des pancréatites aiguës ou chroniques par mesure de la fluorescence des porphyrines au niveau de la glande pancréatite ou de ses canaux excréteurs.

25 Dans ce dernier cas, le caractère prédictif en terme de gravité de la pancréatite des résultats découlant du procédé selon l'invention, pourra être additionné aux critères actuels de pronostics médicaux tels que le score de Ranson (gravité croissante chiffrée de 3 à 11) ou la tomodensitométrie pancréatique (stades D et E).

30 Selon une caractéristique de l'invention, l'excitation lumineuse est de faible intensité, avec une densité de puissance de l'énergie délivrée préférentiellement au plus égale à 0,5 W/cm² (de manière à ne pas entraîner une élévation de la température locale de plus de 1°C).

35 De plus, ladite excitation lumineuse est préférentiellement constituée de deux longueurs d'onde ou de deux bandes spectrales, à savoir l'une d'environ 590 nm ou centrée sur 590 nm et destinée à l'excitation des porphyrines et l'autre

- 6 -

d'environ 400 nm ou centrée sur 400 nm (ou éventuellement d'environ 355 nm), destinée à l'excitation des autres chromophores endogènes.

Le procédé conforme à l'invention consiste plus précisément, après la phase d'excitation, à acquérir, pour les mêmes tissus à analyser, des signaux de fluorescence dans des bandes spectrales centrées, respectivement, sur environ 600 nm (ou à défaut environ 680 nm) et sur environ 630 nm et/ou 680-690 nm, et, le cas échéant, sur environ 470 nm et/ou 510-520 nm, pour chacun des points de mesure, à former pour chaque bande spectrale précitée, une image de fluorescence à partir des valeurs des intensités de fluorescence relevées dans la bande spectrale considérée pour les différents points de mesure, à effectuer une normalisation des valeurs moyennes des intensités de chaque image obtenue et à réaliser un traitement point par point de l'image ou des images obtenue(s) pour la ou les bande(s) spectrale(s) centrée(s) sur environ 630 nm et/ou sur environ 680-690 nm en utilisant les informations contenues dans l'image normalisée obtenue pour la bande passante centrée sur 600 nm et, le cas échéant, un traitement supplémentaire en utilisant les informations contenues dans l'image ou les images obtenue(s) pour la ou les bande(s) spectrale(s) centrée(s) sur environ 470 nm et/ou sur environ 510-520 nm.

Dans les bandes de fréquence indiquées ci-dessus, il convient de noter que : 470 nm correspond à la position spectrale du pic de l'autofluorescence dans les tissus sains ; 510 nm correspond à la position spectrale du pic de l'autofluorescence bleue dans les tissus inflammatoires ; 600 nm (associé à une excitation à 510 nm) correspond à l'autofluorescence dans la bande spectrale rouge considérée comme ligne de base (bruit de fond) pour la fluorescence des porphyrines ; 630 nm et 690 nm correspondent aux positions spectrales des pics d'émission majeur et mineur des porphyrines endogènes.

Conformément à une caractéristique de l'invention, il peut être avantageusement prévu d'utiliser un facteur de normalisation d'une valeur donnée pour les images recueillies à 470 nm et/ou à 510 nm et un autre facteur de normalisation de valeur différente pour les images recueillies à 600 nm et 630 nm et/ou 690 nm, les valeurs de ces deux facteurs étant définies de manière à obtenir une gradation optimale des couleurs ou des niveaux de gris sur l'image finale après traitement.

Afin d'isoler le signal de fluorescence généré par les porphyrines, il est procédé à une soustraction point par point, ou pixel par pixel, des intensités de l'image normalisée recueillie à 600 nm de celles de l'image ou des images normalisée(s) recueillie(s) à 630 et/ou 690 nm.

- 7 -

Par ailleurs, en vue de s'affranchir des problèmes de collection de la fluorescence dus, entre autres, aux hétérogénéités tissulaires, il peut être procédé, après soustraction des intensités de l'image normalisée recueillie à 600 nm, à une division point par point, ou pixel par pixel, des intensités de l'image ou des images normalisée(s) recueillie(s) à 630 et/ou 690 nm par les intensités de l'image normalisée recueillie à 470 nm ou 510 nm.

En variante, il peut être procédé, après soustraction des intensités de l'image normalisée recueillie à 600 nm, à une division point par point, ou pixel par pixel, des intensités de l'image ou des images normalisée(s) recueillie(s) à 630 et/ou 690 nm par les intensités de l'image obtenue par soustraction point par point des intensités de l'image normalisée recueillie à 510 nm de celles de l'image normalisée recueillie à 470 nm, cette manière d'opérer améliorant le contraste entre tissus sains et tissus enflammés.

Ainsi, selon un mode de réalisation préférentiel, les opérations de traitement d'images peuvent consister plus particulièrement à faire le rapport pixel à pixel entre l'image de fluorescence des porphyrines endogènes ($I_{630} + I_{680}$, après soustraction du "bruit de fond" relevé à 600 nm) et celle de la fluorescence du NADPH (I_{470}), qui est plus intense dans les tissus sains que dans les tissus malades.

Afin d'augmenter, si nécessaire, le contraste entre les différents états du tissu, le procédé peut également mettre à profit l'augmentation de l'autofluorescence à 510-520 nm en présence de processus inflammatoires, augmentation mise en évidence par les inventeurs. Dans cette éventualité, une multiplication de l'image rapport $[(I_{630} + I_{680} - \text{bruit de fond}) / I_{470}]$ par l'image recueillie à 510-520 nm ($I_{510-520}$) est préconisée.

L'objectif de la normalisation des images enregistrées aux différentes longueurs d'onde (470, 510-520, 630 et 680, après soustraction du bruit) est d'augmenter le contenu des pixels de l'image finale résultant du procédé décrit précédemment, de façon à augmenter la dynamique de l'image finale et avoir ainsi une meilleure localisation et visualisation de la partie enflammée.

Grâce aux dispositions de traitement d'images mentionnées ci-dessus, le procédé selon l'invention permet d'obtenir une image finale sur laquelle n'est ou ne sont visible(s) que la ou les zone(s) enflammée(s).

Les figures 8 et 9 illustrent deux exemples de localisation de zones de lésions inflammatoires dues à une pancréatite aiguë (faible ou modérée) chez le rat, par la mise en oeuvre du procédé selon l'invention.

- 8 -

Ces figures montrent ainsi les images de fluorescence de la région duodeno-pancréatique recueillies par une caméra numérique CCD. Ces images ont été obtenues sous excitation laser à travers des filtres passe-bande permettant de sélectionner les émissions fluorescentes dans les domaines spectraux caractéristiques des porphyrines (I 630 nm), de l'autofluorescence dans le rouge (I 680 nm) et de l'autofluorescence dans le bleu (I 470 nm).

Les opérations de traitement d'images selon l'invention ont permis d'obtenir tout d'abord l'image de la fluorescence des porphyrines proprement dites (I 630 nm - 680 nm), puis d'éliminer la contingente rendement de fluorescence en divisant cette dernière image par celle de l'autofluorescence bleue (obtention de l'image marquée I 630 nm - 680 nm / 470 nm).

La superposition de cette dernière image avec une image photographique normale permet de localiser précisément la zone d'inflammation (Photo + Traitée).

L'invention a également pour objet un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé décrit ci-dessus, représenté à la figure 10 des dessins annexés.

Ce dispositif est principalement constitué par une unité 1 d'excitation lumineuse de faible intensité dans les bandes spectrales centrées sur environ 400 nm et sur environ 590 nm, un module de filtrage 2 comprenant un jeu de filtres passe-bande adaptés pour la sélection des fluorescences spécifiques aux différents chromophores recherchés, une unité 3 de détection et d'enregistrement d'images de la fluorescence de la surface des tissus examinés et, enfin, une unité informatique 4 pour le traitement point par point, ou pixel par pixel, des images recueillies et le contrôle et la gestion de l'ensemble du dispositif, associé à des moyens de stockage et d'édition d'images (non représentés).

L'unité 1 d'excitation lumineuse pourra être composée soit de lasers de longueurs d'onde adaptées, soit de lampes équipées de filtres passe-bande centrés sur les longueurs d'onde d'excitation précitées.

De manière avantageuse, l'unité 3 de détection et d'enregistrement des images, en fausses couleurs, consiste en une caméra numérique CCD.

Selon une caractéristique de l'invention, l'unité d'excitation, le module de filtrage et l'unité de détection et d'enregistrement d'images sont préférentiellement adaptés pour coopérer avec des moyens optiques utilisés en endoscopie.

Dans les situations où les signaux de fluorescence seraient peu intenses (excitation ou rendement de fluorescence faible), il peut être prévu

- 9 -

d'adjoindre à la caméra CCD un intensificateur d'images 5 à gain variable (typiquement jusqu'à 10^3).

Pour une utilisation dans les conditions cliniques standards, c'est-à-dire en lumière ambiante, cet intensificateur 5 sera préférentiellement obturable et utilisé en conjonction avec un laser impulsif 1. L'ouverture de l'intensificateur devra être synchronisée avec les impulsions du laser d'excitation et la durée d'ouverture inférieure à 100 ns. Ceci aura pour avantage d'une part d'éviter une éventuelle saturation de la caméra par la lumière ambiante et d'autre part d'améliorer le rapport signal/bruit.

Si la durée de vie de la fluorescence des porphyrines endogènes s'avérait nettement plus grande que celle de la fluorescence tissulaire normale, une amélioration du contraste tissu sain / tissu enflammé pourrait être obtenue en ouvrant l'intensificateur avec un certain retard par rapport à l'excitation pour l'enregistrement des images de fluorescence des porphyrines. On diminuerait ainsi de façon drastique la contribution de la fluorescence en provenance de molécules autres que les porphyrines et dont la plus grande partie de l'émission aurait eu lieu avant l'ouverture de l'intensificateur.

Grâce à l'invention, il est donc possible d'effectuer une détection et une cartographie de zones enflammées de tissus vivants, ainsi qu'une évaluation de l'intensité de l'inflammation, selon un procédé d'évaluation non invasif et sans aucune adjonction de drogue ou injection de chromophore.

En outre, le procédé selon l'invention préserve l'intégrité du patient puisqu'il ne nécessite aucune piqûre ou prélèvement de tissu, ni aucun contact direct de l'appareillage avec les tissus à examiner au cours de l'acquisition des données.

Par ailleurs, la mise en oeuvre de ce procédé pourra s'inscrire soit dans la pratique d'un examen externe d'un patient, soit dans le cadre de la réalisation d'un mode d'investigation déjà validé auquel il n'ajoutera aucun caractère nocif pour le patient.

Bien entendu, l'invention n'est pas limitée au mode de réalisation décrit et représenté aux dessins annexés. Des modifications restent possibles, notamment du point de vue de la constitution des divers éléments ou par substitution d'équivalents techniques, sans sortir pour autant du domaine de protection de l'invention.

REVENDICATIONS

1) Procédé de détection et de cartographie de zones enflammées de tissus vivants, caractérisé en ce qu'il consiste à soumettre les tissus à analyser à une excitation lumineuse avec un domaine spectral prédéterminé, à acquérir le signal de fluorescence brute de porphyrines endogènes pour une pluralité de
5 points de mesure, et à déterminer, pour chaque point de mesure, l'intensité de fluorescence pour des longueurs d'onde d'environ 510-520 nm.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à former une image de fluorescence des tissus à analyser sur laquelle apparaît la
10 ou les zones enflammées, en utilisant au moins les valeurs déterminées de l'intensité de fluorescence propres aux porphyrines endogènes pour les différents points de mesure considérés.

3) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il consiste à déterminer une gradation du caractère inflammatoire
15 de zones de lésions par corrélation avec l'intensité de la fluorescence pour les longueurs d'ondes caractéristiques des porphyrines.

4) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'excitation lumineuse est de faible intensité, avec une densité de puissance de l'énergie délivrée préférentiellement au plus égale à $0,5 \text{ W/cm}^2$, et en
20 ce qu'elle est éventuellement constituée de deux longueurs d'onde ou de deux bandes spectrales, à savoir l'une d'environ 590 nm destinée à l'excitation des porphyrines et l'autre d'environ 400 nm ou d'environ 355 nm destinée à l'excitation d'autres chromophores endogènes.

5) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il consiste à acquérir, pour les mêmes tissus à analyser, des signaux
25 de fluorescence dans des bandes spectrales centrées, respectivement, sur environ 510-520 nm, sur environ 600 nm et soit sur environ 630 nm, soit sur environ 680-690 nm, ou sur les deux, et, le cas échéant, sur environ 470 nm, pour chacun des points de mesure, à former pour chaque bande spectrale précitée, une image de

fluorescence à partir des valeurs des intensités de fluorescence relevées dans la bande spectrale considérée pour les différents points de mesure, à effectuer une normalisation des valeurs moyennes des intensités de chaque image obtenue et à réaliser un traitement point par point de l'image ou des images obtenue(s) pour la
5 ou les bande(s) spectrale(s) centrée(s) soit sur environ 630 nm, soit sur environ 680-690 nm, ou sur les deux, en utilisant les informations contenues dans l'image normalisée obtenue pour la bande passante centrée sur 600 nm et un traitement supplémentaire en utilisant les informations contenues dans l'image ou les images obtenue(s) pour la ou les bande(s) spectrale(s) centrée(s) sur environ 510-520 nm
10 et, le cas échéant, sur environ 470 nm .

6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il consiste à utiliser un facteur de normalisation d'une valeur donnée pour les images recueillies à 470 nm et/ou à 510 nm et un autre facteur de normalisation de valeur différente pour les images recueillies à 600 nm et soit à 630 nm, soit à 690 nm, ou
15 aux deux, les valeurs de ces deux facteurs étant définies de manière à obtenir une gradation optimale des couleurs ou des niveaux de gris sur l'image finale après traitement.

7) Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 et 6, caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer une soustraction point par point, ou pixel par
20 pixel, des intensités de l'image normalisée recueillie à 600 nm de celles de l'image ou des images normalisée(s) recueillie(s) soit à 630 nm, soit à 690 nm, ou aux deux.

8) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer, après soustraction des intensités de l'image normalisée recueillie à 600
25 nm, une division point par point, ou pixel par pixel, des intensités de l'image ou des images normalisée(s) recueillie(s) soit à 630, soit à 690 nm, ou aux deux, par les intensités de l'image normalisée recueillie à 510 nm et éventuellement à 470 nm.

9) Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il consiste à
30 effectuer, après soustraction des intensités de l'image normalisée recueillie à 600 nm, une division point par point, ou pixel par pixel, des intensités de l'image ou

des images normalisée(s) recueillie(s) soit à 630 nm, soit à 690 nm, ou aux deux, par les intensités de l'image obtenue par soustraction point par point des intensités de l'image normalisée recueillie à 510 nm de celles de l'image normalisée recueillie à 470 nm.

5 10) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il consiste à faire le rapport, pixel à pixel, entre l'image de fluorescence des porphyrines endogènes ($I_{630} + I_{680}$ - bruit de fond à 600 nm) et celle de la fluorescence du NADPH (I_{470}) et, le cas échéant, à effectuer une multiplication de l'image rapport obtenue $[(I_{630} + I_{680} - \text{bruit de fond}) / I_{470}]$ par l'image de fluorescence recueillie à
10 510-520 nm ($I_{510-520}$).

11) Dispositif pour la mise en œuvre du procédé selon l'une quel-
conque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est principalement
constitué par une unité (1) d'excitation lumineuse de faible intensité, préférentiel-
lement au plus égale à $0,5 \text{ W/cm}^2$, dans les bandes spectrales centrées sur environ
15 400 nm et sur environ 590 nm, par un module de filtrage (2) comprenant un jeu de
filtres passe-bande adaptés notamment pour la sélection des fluorescences de
longueurs d'onde d'environ 510-520 nm,

par une unité (3) de
détection et d'enregistrement d'images de la fluorescence de la surface des tissus
20 examinés et, enfin, par une unité informatique (4) pour le traitement point par
point, ou pixel par pixel, des images recueillies et le contrôle et la gestion de
l'ensemble du dispositif, associé à des moyens de stockage et d'édition d'images,
pour détecter et cartographier les zones enflammées des tissus examinés.

12) Dispositif selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'uni-
té (3) de détection et d'enregistrement des images, en fausses couleurs, consiste en
25 une caméra numérique CCD et en ce que l'unité (1) d'excitation, le module de
filtrage (2) et l'unité (3) de détection et d'enregistrement d'images sont adaptés
pour coopérer avec des moyens optiques utilisés en endoscopie.

13) Dispositif selon la revendication 12, caractérisé en ce que la
30 caméra numérique CCD (3) est pourvue d'un intensificateur d'images (5) à gain

variable, le cas échéant obturable et utilisé en conjonction avec un laser impulsionnel (1), dont l'ouverture peut être retardée.

14) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce qu'il réalise l'acquisition, pour les mêmes tissus à analyser, des signaux de fluorescence dans des bandes spectrales centrées, respectivement, sur environ 510-520 nm, sur environ 600 nm et soit sur environ 630 nm, soit sur environ 680-690 nm, ou sur les deux, et, le cas échéant, sur environ 470 nm, pour chacun des points de mesure, puis la formation, pour chaque bande spectrale précitée d'une image de fluorescence à partir des valeurs des intensités de fluorescence relevées dans la bande spectrale considérée pour les différents points de mesure, ensuite, au moyen de l'unité informatique (4), une normalisation des valeurs moyennes des intensités de chaque image obtenue et un traitement point par point de l'image ou des images obtenue(s) pour la ou les bande(s) spectrale(s) centrée(s) soit sur environ 630 nm, soit sur environ 680-690 nm, ou sur les deux, en utilisant les informations contenues dans l'image normalisée obtenue pour la bande passante centrée sur 600 nm et enfin, le cas échéant, un traitement supplémentaire en utilisant les informations contenues dans l'image ou les images obtenue(s) pour la ou les bande(s) spectrale(s) centrée(s) sur environ 510-520 nm et, le cas échéant sur environ 470 nm.

15) Dispositif selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'unité informatique (4) utilise un facteur de normalisation d'une valeur donnée pour les images recueillies à 470 nm et/ou à 510 nm et un autre facteur de normalisation de valeur différente pour les images recueillies à 600 nm et 630 nm et/ou 690 nm, les valeurs de ces deux facteurs étant définies de manière à obtenir une gradation optimale des couleurs ou des niveaux de gris sur l'image finale après traitement.

16) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 14 et 15, caractérisé en ce que l'unité informatique (4) effectue une soustraction point par point, ou pixel par pixel, des intensités de l'image normalisée recueillie à 600 nm de celles de l'image ou des images normalisée(s) recueillie(s) soit à 630 nm, soit à 690 nm, soit aux deux.

17) Dispositif selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'unité informatique (4) effectue, après soustraction des intensités de l'image normalisée recueillie à 600 nm, une division point par point, ou pixel par pixel, des intensités de l'image ou des images normalisée(s) recueillie(s) soit à 630 nm, soit à 690 nm, ou aux deux, par les intensités de l'image normalisée recueillie à 510 nm et éventuellement à 470 nm.

18) Dispositif selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'unité informatique (4) effectue, après soustraction des intensités de l'image normalisée recueillie à 600 nm, une division point par point, ou pixel par pixel, des intensités de l'image ou des images normalisée(s) recueillie(s) soit à 630 nm, soit à 690 nm, soit aux deux, par les intensités de l'image obtenue par soustraction point par point des intensités de l'image normalisée recueillie à 510 nm de celles de l'image normalisée recueillie à 470 nm.

19) Dispositif selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'unité informatique (4) effectue un rapport, pixel à pixel, entre l'image de fluorescence des porphyrines endogènes ($I_{630} + I_{680}$ - bruit de fond à 600 nm) et celle de la fluorescence du NADPH (I_{470}) et, le cas échéant, une multiplication de l'image rapport obtenue $[(I_{630} + I_{680} - \text{bruit de fond}) / I_{470}]$ par l'image de fluorescence recueillie à 510-520 nm ($I_{510-520}$).

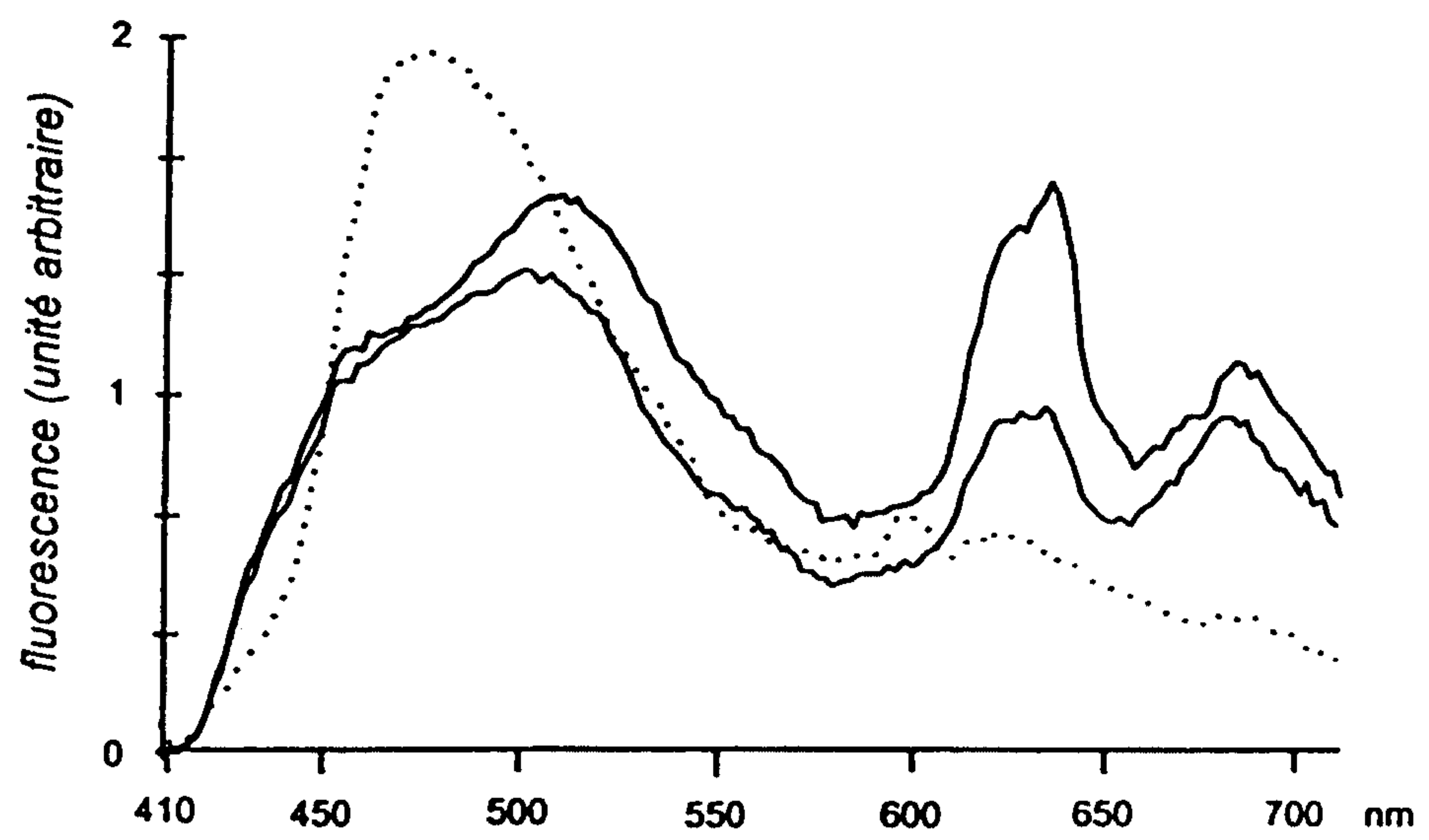


Fig. 1

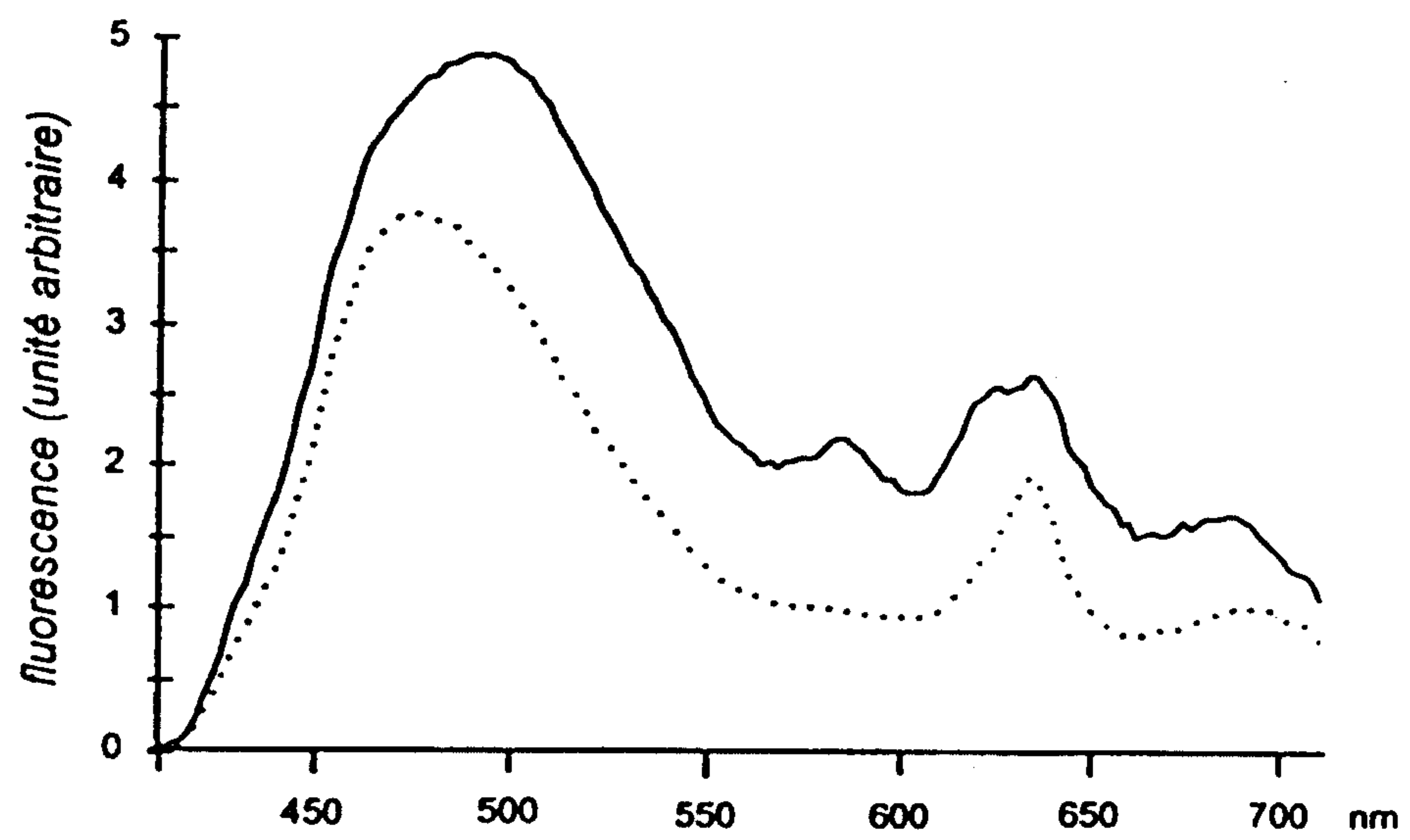


Fig. 2

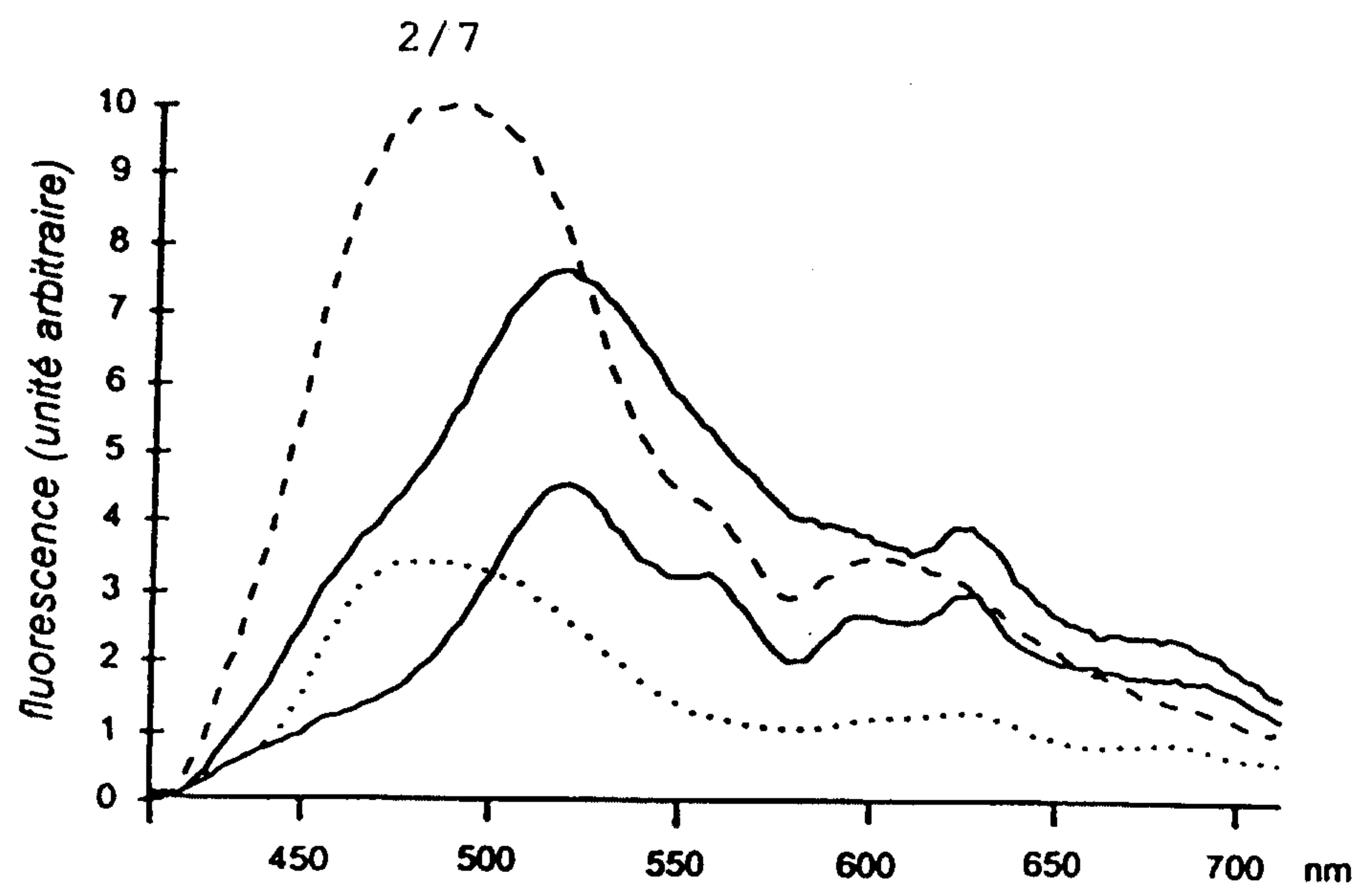


Fig. 3

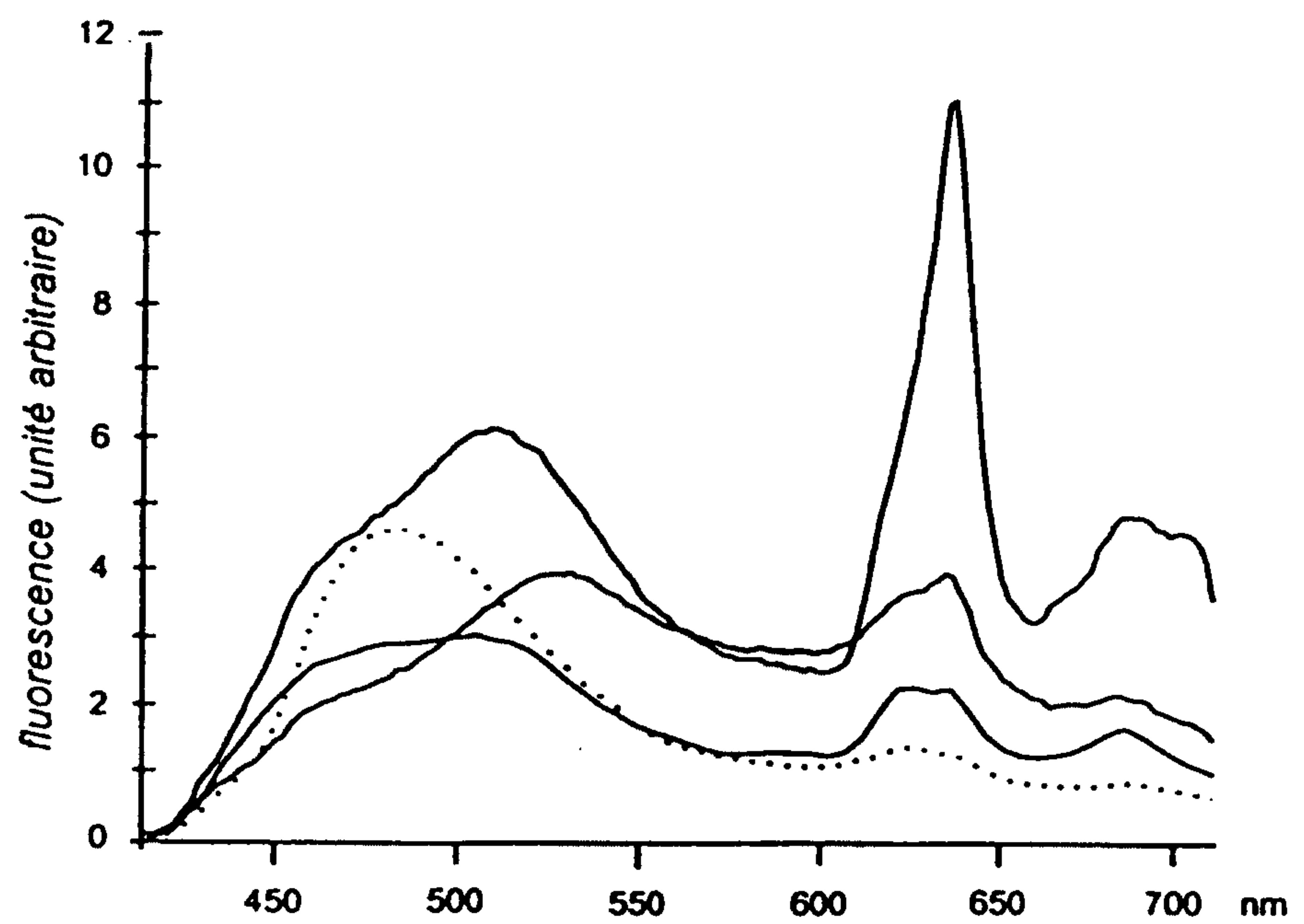


Fig. 4

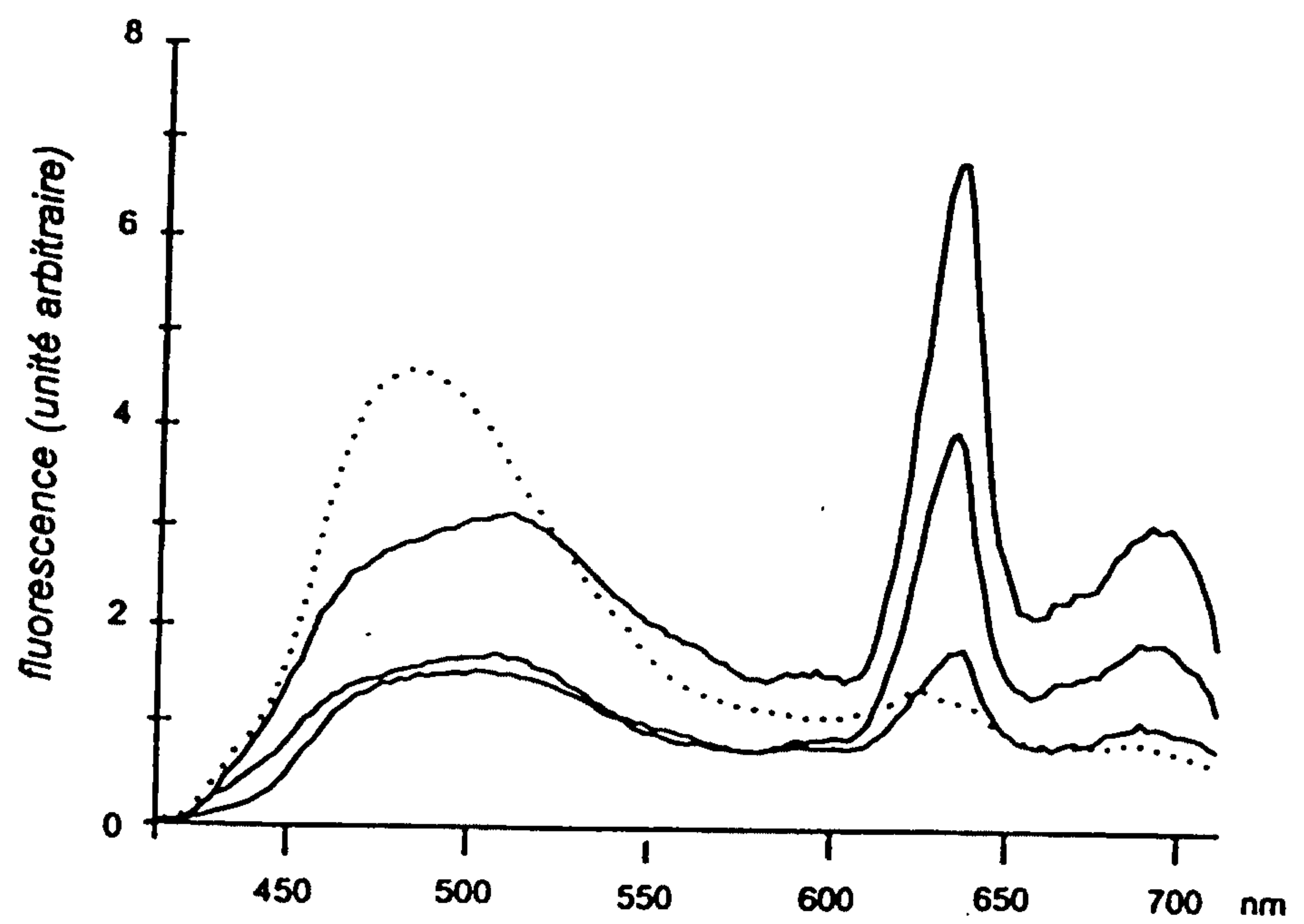


Fig. 5

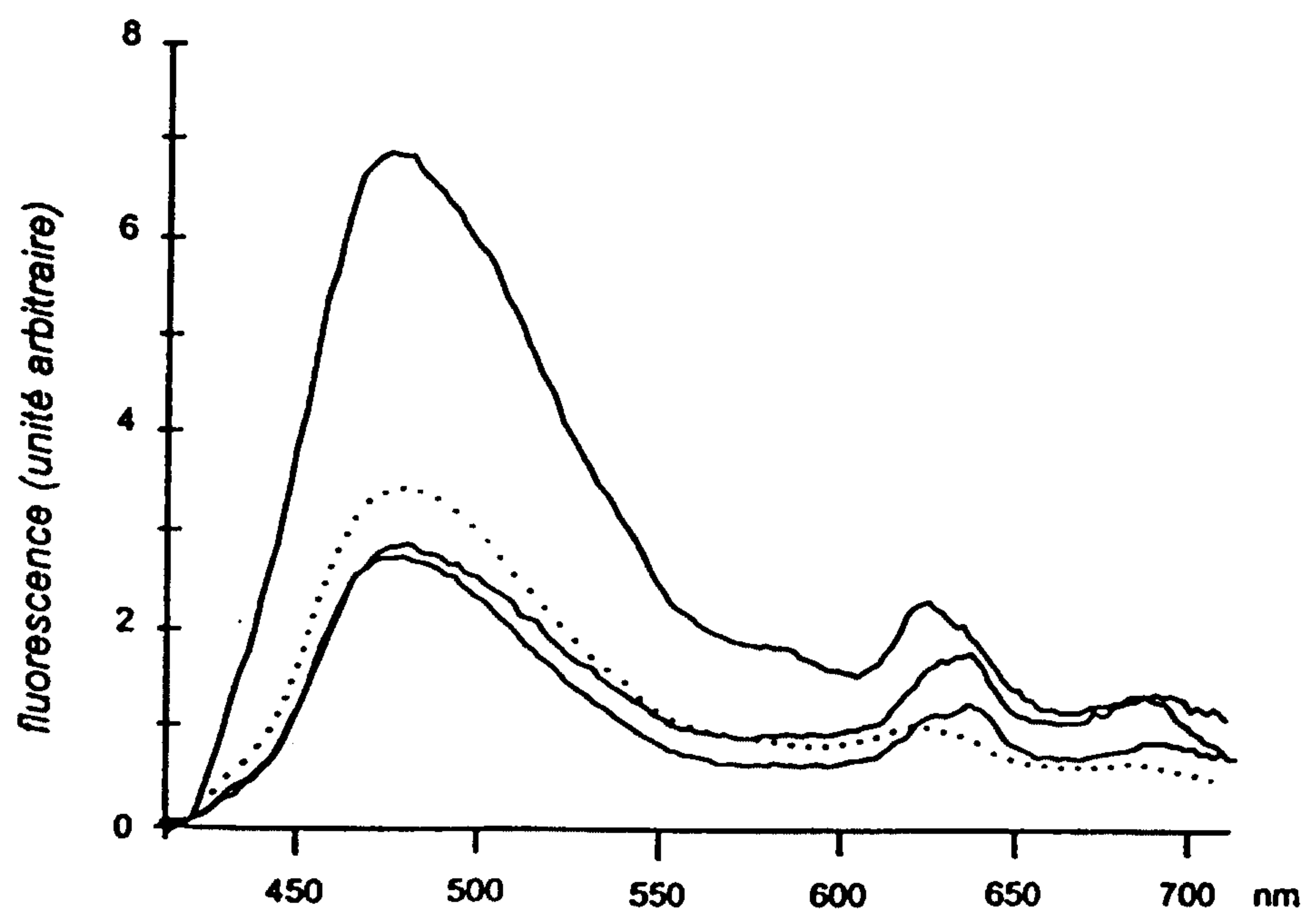


Fig. 6

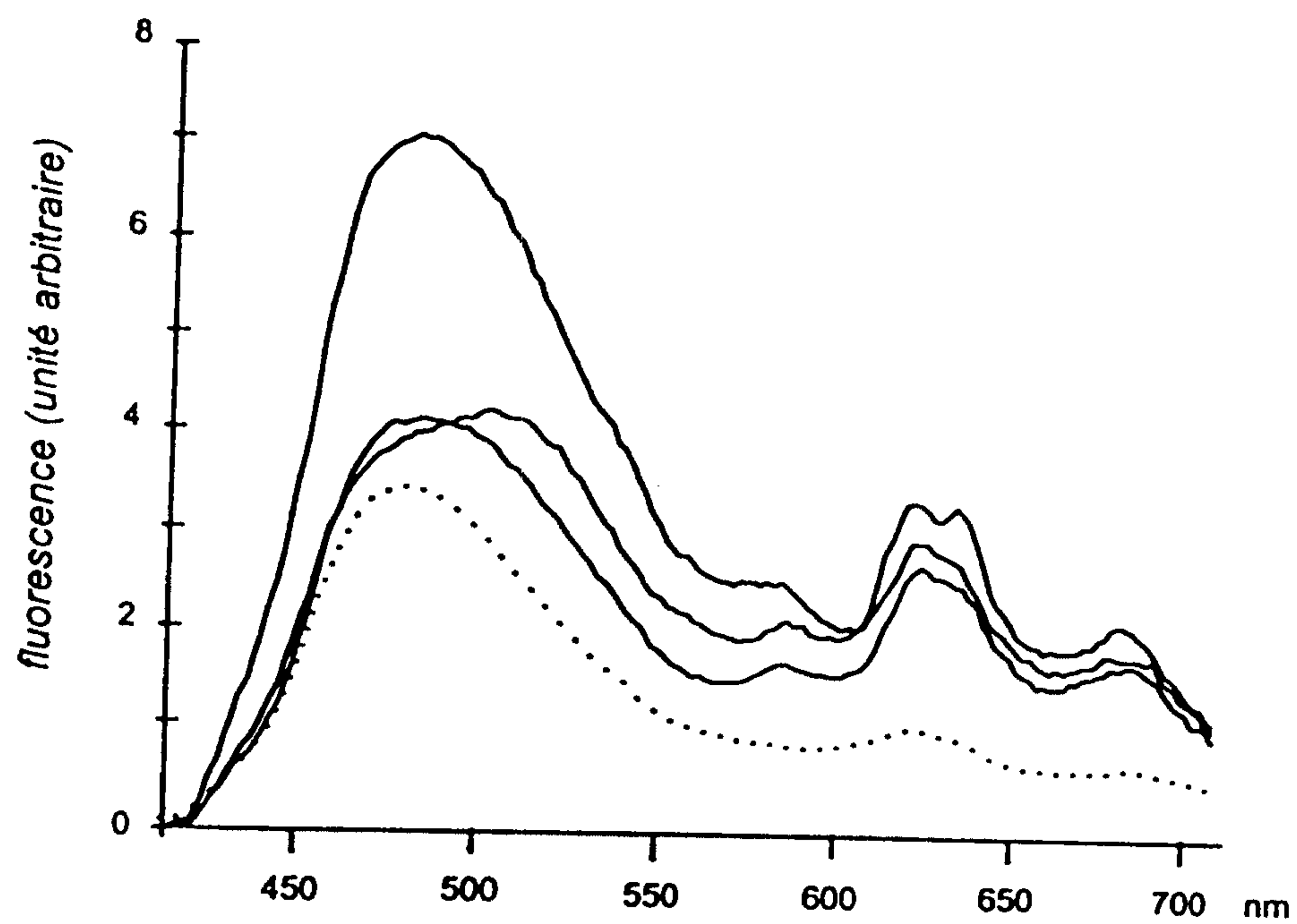


Fig-7

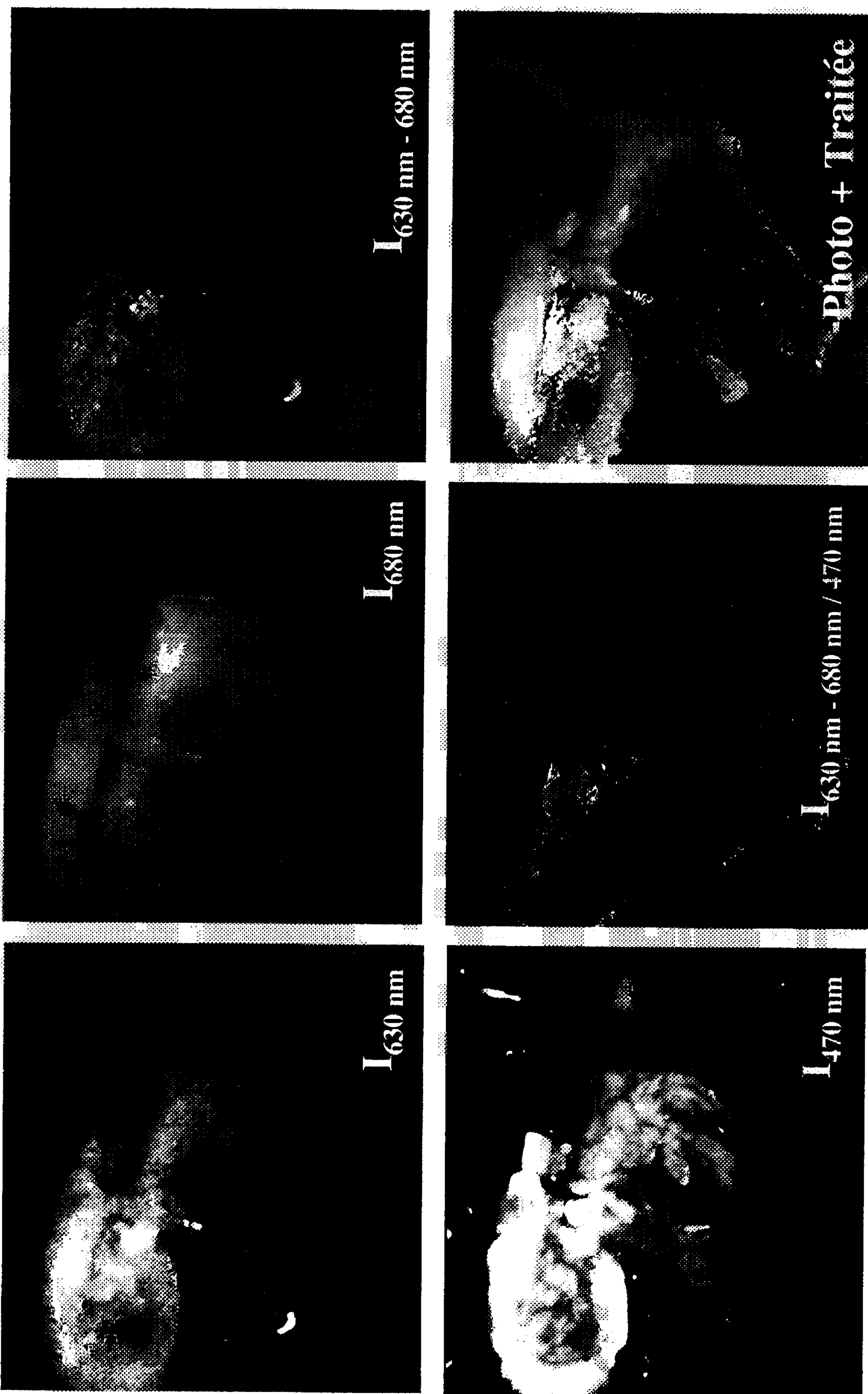


Fig. 5

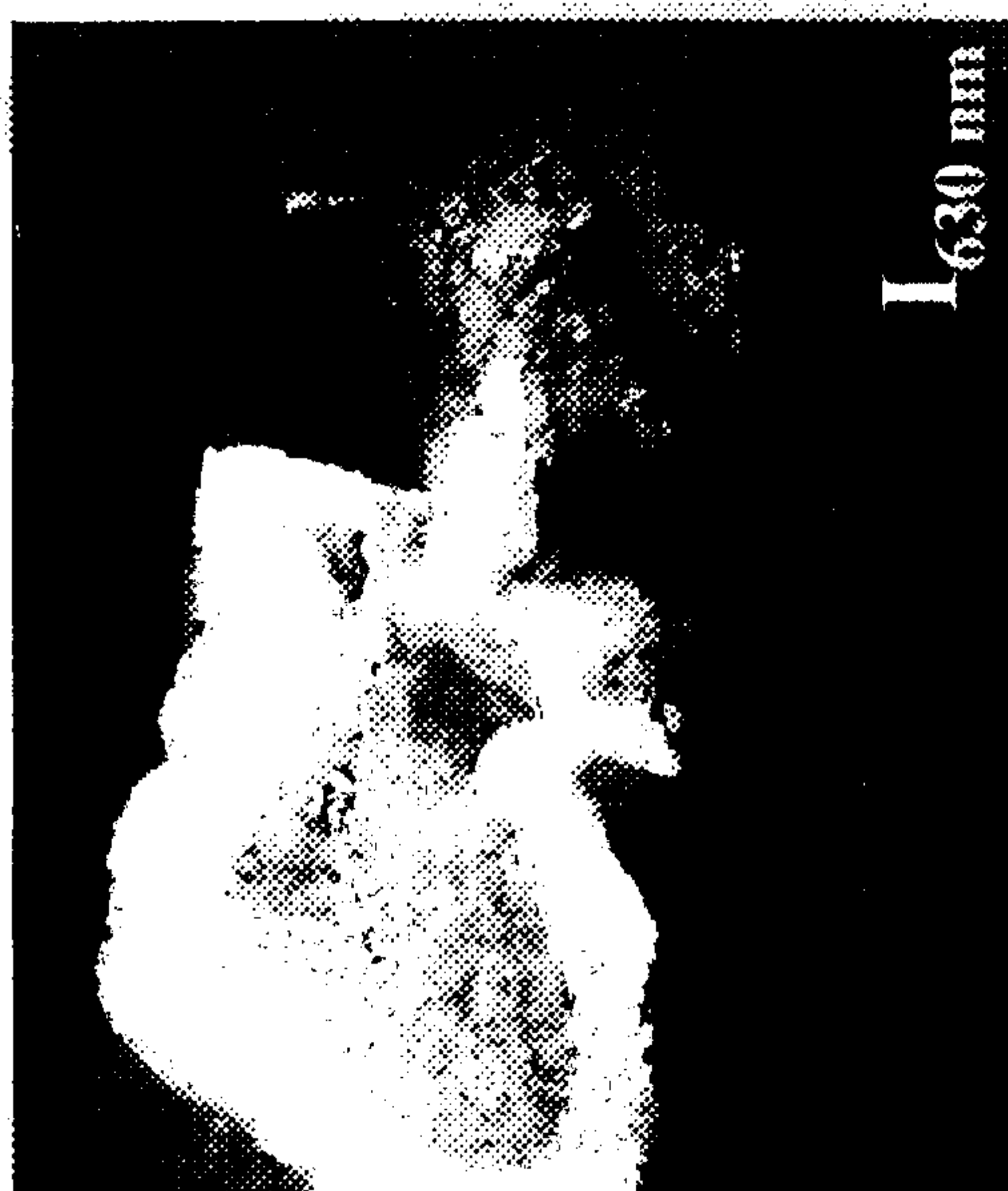
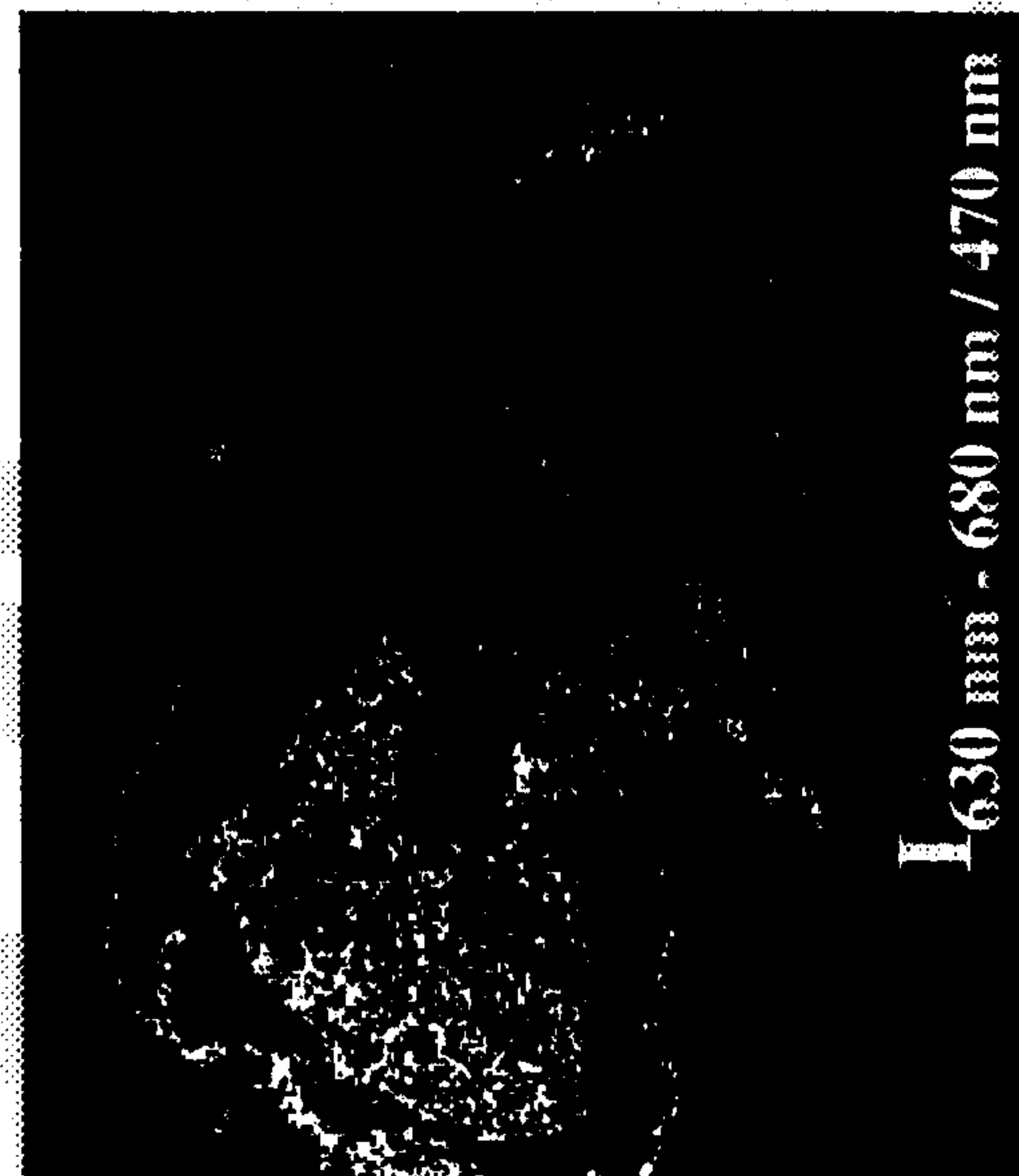
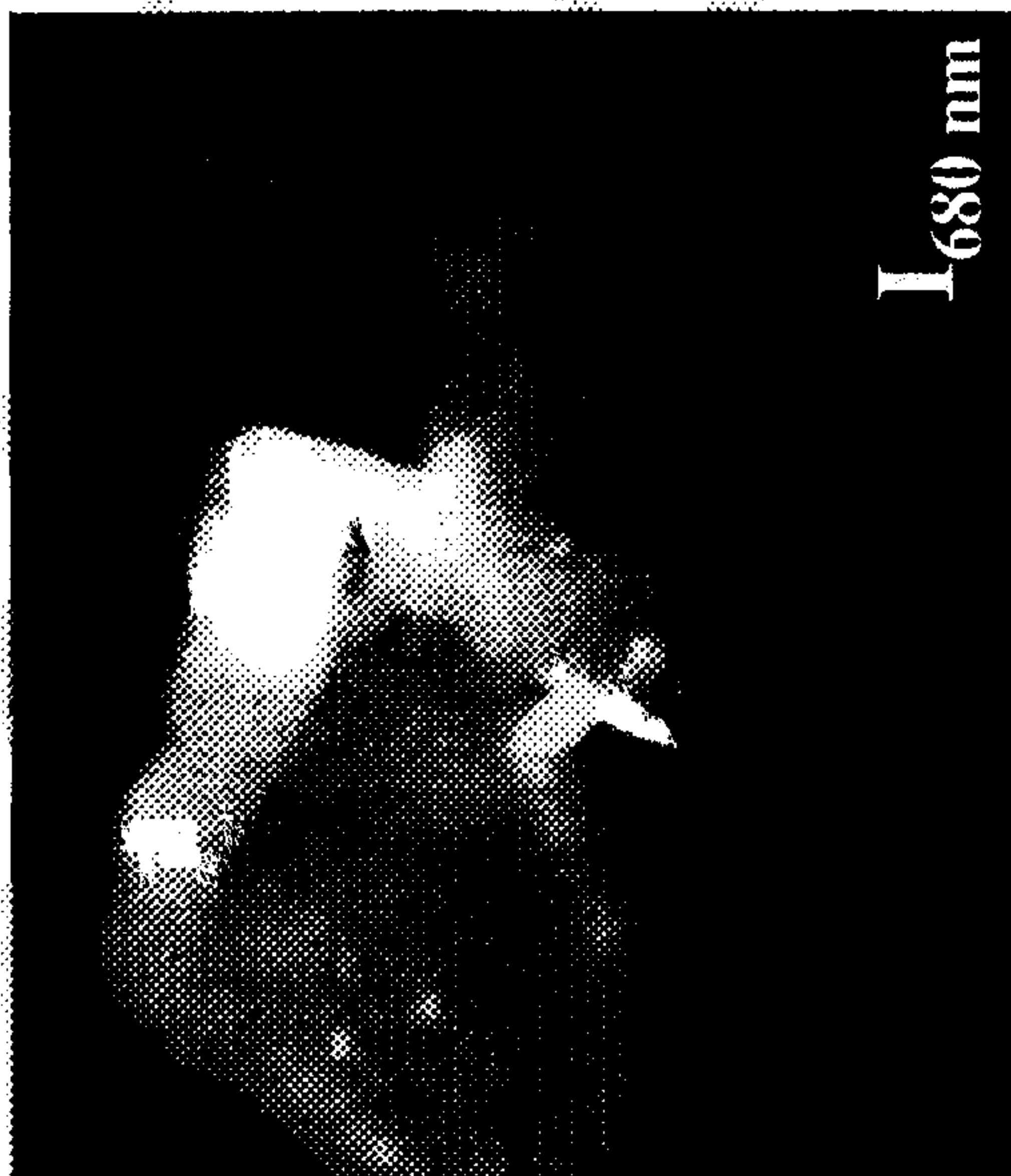
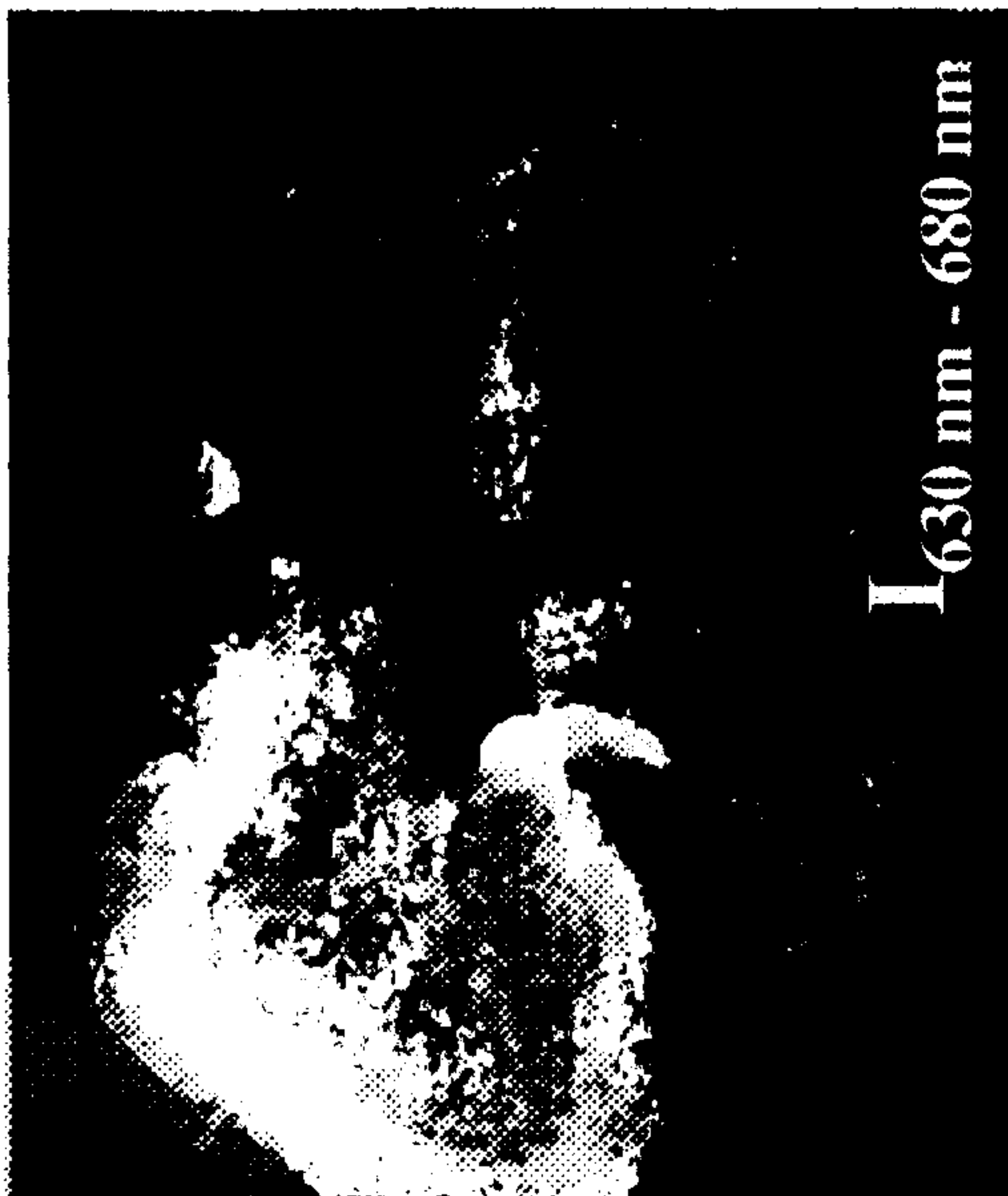


Fig. 9

