
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة فرحات عباس - سطيف 1
Université Ferhat ABBAS Sétif 1



THESE

Présentée à l'Institut d'Optique et Mécanique de Précision

Pour l'Obtention du Diplôme de

DOCTORAT 3^{ème} cycle LMD

Spécialité: Matériaux pour l'Optique et l'Optoélectronique

Par

CHORFI Hichem

THEME

Contribution à l'étude des milieux biologiques par diffusion de lumière

Soutenu le: 25 / 02 / 2019

Devant le jury composé de:

Mr. DEMAGH Nacer-Eddine	Prof.	Université de Sétif 1	Président
Mr. AYADI Khaled	Prof.	Université de Sétif 1	Rapporteur
Mr. BOUFENDI Laïfa	Prof.	Université d'Orléans. France	Co-Rapporteur
Mr. ZIANE Omar	Prof.	USTHB – Alger	Examineur
Mr. GUESSAS Hocine	Prof.	Université de Sétif 1	Examineur

Laboratoire d'Optique Appliquée

Sommaire

REMERCIEMENTS	V
INTRODUCTION GENERALE.....	1
<i>Chapitre 01</i>	<i>1</i>
LA DIFFUSION DE LA LUMIERE.....	1
1.1. Introduction.....	1
1.2. La diffusion de la lumière.....	2
1.2.1. Généralités	3
1.2.2. Diffusion élastique	3
1.2.3. Diffusion inélastique.....	4
1.2.4. Diffusion simple.....	4
1.2.5. Diffusion multiple	4
1.2.6. Diffusion directe et rétrodiffusion de la lumière	4
1.2.7. L’historique de diffusion de la lumière.....	5
1.2.8. Les différentes théories de diffusion de la lumière.....	6
1.3. La polarisation de la lumière	10
1.3.1. Polarisation dans le modèle de diffusion avec centre diffusant sphérique	11
1.3.2. Etude de la morphologie des particules	12
1.4. L’utilisation de la diffusion de la lumière pour l’étude des milieux biologiques.....	13
1.5. L’état de l’art	14
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	20
<i>Chapitre 02</i>	<i>23</i>
OPTIQUE DES MILIEUX BIOLOGIQUES.....	23
2.1. Introduction.....	23
2.2. Les tissus biologiques: description histologique et propriétés optiques.....	24
2.2.1. Description histologique	24
2.3. Les propriétés optiques des tissus biologiques	26
2.3.1. L’indice de réfraction.....	27
2.3.2. L’absorption	28
2.3.3. Le facteur d’anisotropie	30
2.3.4. Coefficient de diffusion	30
2.3.5. Le coefficient d’Extinction	31

2.4. Protocoles de préparation des échantillons pour les expériences de diffusion de la lumière	31
2.4.1. Objectif du travail	31
2.4.2. Choix du milieu diffusant :	31
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	38
<i>Chapitre 03</i>	<i>41</i>
CALCUL DE DIFFUSION DE LA LUMIERE	41
3.1. Introduction.....	41
3.2. La théorie de Mie.....	42
3.2.1. Modèle mathématique de la théorie de Mie.....	42
3.3. L'importance de l'étude des signaux diffusés	43
3.4. Diffusion spectrophotométrique appliquée à la biologie.....	44
3.4.1. Introduction.....	44
3.4.2. Limite de la loi de Beer-Lambert-Bouger.....	45
3.5. Etude préliminaire des signaux diffusés	46
3.5.1. Analyse des résultats.....	47
3.5.2. L'utilisation de la polarisation	48
3.6. Méthodes d'analyse des signaux	49
3.7. Algorithme de phénomène.....	50
3.8. Création de bases des données.....	53
3.9. Validation de la méthode proposée.....	54
3.9.1. Dispositif expérimental nommé "Marguerite"	54
3.9.2. Dispositif optique de détection	57
3.9.3. Protocole expérimental suivi.....	57
3.9.4. Résultats obtenus.....	58
3.10. Etude de la morphologie	59
3.10.1. Analyse des résultats.....	59
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	61
<i>Chapitre 04</i>	<i>63</i>
TECHNIQUES EXPERIMENTALES	63
4.1. Introduction.....	63
4.2. Dispositif expérimental, matériels et protocoles	64
4.2.1. L'ajustage du montage :	64

4.3. Barrette de détection hémisphérique	66
4.4. Résultats et discussions.....	69
4.5. Etude de la morphologie	78
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	83
ANNEXE	85

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu : DIEU puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour accomplir ce travail.

Je tiens, ici, à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu durant ces trois années de thèse. Je remercie, chaleureusement mon directeur de thèse, le Pr. AYADI Khaled pour la confiance qu'il m'a accordée. J'ai pu apprécier ses qualités scientifiques et humaines ainsi que son enthousiasme pour ce sujet qu'il a su me transmettre tout au long de cette thèse.

Je remercie également mon co-directeur de thèse, le Pr. BOUFENDI Laïfa pour ses conseils avisés et pour m'avoir accueillie durant deux stages de formation dans son laboratoire GREMI.

Je remercie Pr. DEMAGH Nacer-Eddine d'avoir accepté de rapporter sur ce manuscrit, ainsi que Pr. GUESSAS Hocine et Pr. ZIANE Omar qui m'ont fait l'honneur d'examiner mon travail.

Je remercie en particulier Pr. BOUAMMAMA. L pour ses qualités scientifiques, son écoute et sa disponibilité, aussi Pr. Shmatov. M, Dr. Belkhir. A, Dr. Manaa. H ... etc, pour leur aide et pour les conseils avisés.

Je remercie, bien évidemment, Mr. HAMMOUDI. A, Mr. KHITAS. M, Mr. KHITAS. M et Mr. BELHADJ. G pour leur gentillesse, leur humour, leur aide illimitée et tous les bons moments qu'on a passés ensemble.

Je remercie le Service d'Anatomie Pathologique du CHU Sétif, dirigé par Pr. ABDELOUCHE. D, qui a bien voulu m'accueillir durant ma thèse.

Je remercie tous les membres du laboratoire GREMI qui m'ont entourée et encouragée au long des périodes de stage en France: Marie Hénault, Thomas Lecas, Mokache... etc.

Je remercie, sans aucune exception, tous les membres de laboratoire d'Optique Appliquée et les autres laboratoires d'IOMP, ingénieurs, chercheurs, techniciens, doctorants, pour leur savoir-faire, leur bonne humeur et leur aide.

Enfin je remercie tous mes amis pour leur soutien et leur présence : tout particulièrement les membres du club scientifique HOLOVISION, Khalil, Lina, Sari, Yaccoub, Rayan, Abir, Younes, Milou, Motia, Makhlouf, Mostafa, Takoua, Rokia, Houda...etc. Mes amis, Belgacem, Brahim, Jacob, Lazhar, Farouq, Mouataz, Abdelbasset, Walid, Antar, Messaoud...etc.

A ceux qui me sont les plus chers au monde....

Mes très chers parents pour tout ce qu'ils ont investis

comme sacrifices pour me voir un jour ce que je suis.

A mes très chères sœurs : Fatiha, Hayat et Amel et leurs maris

A mes très chers frères : Abdelhakim, Kamel, Omar, Walid et Zouhir et leurs femmes

A toute ma famille.

INTRODUCTION GENERALE

La diffusion élastique de la lumière est une technique prometteuse dans une application clinique car elle est totalement non invasive. Cette technique consiste à analyser la lumière diffusée par le tissu biologique via des modèles de calcul des intensités diffusées par un milieu. Les variations angulaires mais également spectrales (comme nous le montrerons par la suite) dépendent fortement de la structure et de la composition du tissu [1].

L'analyse des intensités diffusées nécessite aucune addition de molécules exogènes comme dans le cas de la spectroscopie de fluorescence, et par conséquent représente l'une des techniques les plus facilement envisageables dans une application clinique car totalement non invasive. [2]. Cette technique a été utilisée avec un certain succès dans le diagnostic de dysplasie cervicale et de dysplasie de la vessie à partir des variations du spectre d'absorption et de diffusion. Des changements morphologiques nucléaires, ainsi que du contenu en ADN au cours de la progression des lésions dysplasiques du col utérin, ont quant à eux pu être détectés par variation du spectre de diffusion [3, 4]. En effet il a été montré que la dysplasie entraînait des modifications morphologiques du noyau des cellules des tissus épithéliaux (tissu recouvrant les organes creux du corps humains), principalement un dédoublement de sa taille. Or les noyaux, du fait de leur taille comparable à la longueur d'onde, sont les principaux diffuseurs de la lumière dans les tissus. On s'attend donc à avoir une réponse optique différente entre les flux diffusés par un ensemble de cellules tumorales et ceux diffusés par un ensemble de cellules saines, du fait de l'augmentation de la taille des noyaux et aussi de la variation de l'indice de réfraction [5, 6].

Le travail proposé pour cette thèse se trouve motivé par cet enjeu : être discriminant à partir de la diffusion de la lumière spectrale et angulaire. Un examen attentif de la littérature suivi de quelques expériences optiques préliminaires nous fait augurer qu'il serait utile, voire indispensable d'adjoindre ces mesures autres de polarisation pour espérer être réellement discriminant. Pour réaliser cet objectif nous proposons notre travail sous deux aspects : un aspect calcul et un aspect expérimental. Le calcul porte sur l'analyse des signaux diffusés par les tissus biologiques avec prise en compte des caractéristiques histologiques du tissu.

L'objectif de ce travail de thèse est multiple.

Le premier consiste en un développement d'un dispositif optoélectronique (étude,

conception et réalisation) afin de l'adapter à l'étude des milieux hétérogènes et de déterminer la taille et la morphologie des micros particules, une méthode sans contact à base de diffusion de la lumière. Cette approche nécessite la connaissance des lois d'interaction de la lumière avec la matière. Un dispositif qui peut suivre l'évolution des tailles et les changements morphologiques de certains milieux actifs. Cette approche a également nécessite des calculs de simulation des intensités diffusées en fonction de plusieurs paramètres optiques, ils sont nécessaires à la résolution du problème direct, qui consiste à déterminer la distribution spatiale des signaux optiques diffusés.

Le deuxième objectif de ce travail est le traitement numérique de la réponse optique en créant nos propres bases de données qui définissent les milieux étudiés et mémorisent leurs réponses optiques dans des conditions bien fixées.

Le troisième objectif est de faire valider notre méthode optique en l'appliquant sur un système étalon afin de tester sa fiabilité.

Le quatrième objectif de cette thèse est de faire orienter nos études vers les milieux biologiques afin de déterminer des indicateurs permettant de différencier les tissus sains et pathologiques d'un organe humain.

Le dernier objectif de cette thèse est de préparer notre dispositif afin d'étudier certains milieux actifs (en régime dynamique).

Le plan de cette thèse s'articule de la façon suivante :

- ✓ Le premier chapitre est consacré à quelques notions sur la diffusion de la lumière.
 - ✓ Le second chapitre se rapporte à l'interaction de la lumière avec les milieux biologiques
 - ✓ Le troisième chapitre est consacré au calcul mathématique de la diffusion de la lumière
 - ✓ Le quatrième chapitre est réservé à la description de la partie expérimentale et à la discussion des résultats obtenus.
 - ✓ Et enfin, nous terminerons ce manuscrit par une conclusion générale et perspective.
-

Chapitre 01

LA DIFFUSION DE LA LUMIERE

1.1. Introduction

Le phénomène de diffusion de la lumière se rencontre partout dans notre vie quotidienne. En effet, le bleu du ciel (Figure 1.1), la couleur blanche du lait, le scintillement des étoiles, l'absorption de la peinture sont des exemples de situation où la diffusion de la lumière est responsable de l'effet observé [7,8].

La figure 1.1 représente le mécanisme de diffusion en fonction de la longueur d'onde par des particules nanométriques.

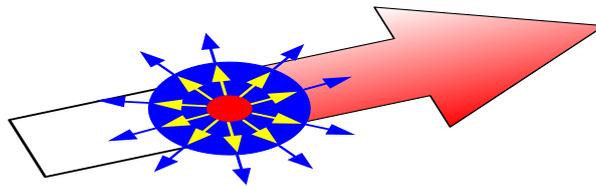


Figure 1.1 : **Diffusion de la lumière; La composante bleue est la plus diffusée**

La lumière et plus généralement les ondes électromagnétiques sont un moyen privilégié pour sonder et observer le monde qui nous entoure. Cependant pour que le scientifique puisse extraire à partir de ses mesures optiques une information objective sur le milieu qu'on veut étudier, il est nécessaire qu'il connaisse les lois d'interaction de la lumière avec la matière. Au cours de l'histoire [9], afin d'en déterminer les lois, ces interactions ont été divisées en sous-familles dont les principales sont la réfraction, la diffraction et la diffusion. Cette dernière, la diffusion, est sans aucun doute la plus générale car elle englobe les deux autres [10].

1.2. La diffusion de la lumière

La diffusion est la propriété de la matière au cours de laquelle l'onde électromagnétique résultante sera déviée dans toutes les directions. Cette diffusion ou étalement spatial se fait sans ou avec changement de longueur d'onde (sans / avec perte de l'énergie), par opposition à l'absorption des couleurs chimiques (pigments) à laquelle elle est toujours associée [11]. Elle dépend fortement de la forme des particules dites diffusantes et de leurs tailles.

Dans tous les cas, le champ électromagnétique associé à l'onde lumineuse incidente met en mouvement les électrons de la matière. La particule éclairée se comporte alors comme un dipôle ou un multipôle placé dans un champ électrique qui réémet une onde lumineuse de même longueur d'onde dont l'énergie se répartit dans toutes les directions [12].

La diffusion est le phénomène par lequel un rayonnement, comme la lumière, le son ou un faisceau de particules, est dévié dans diverses directions par une interaction avec d'autres objets. La diffusion peut être isotrope, c'est-à-dire répartie uniformément dans toutes les directions, ou anisotrope, c'est-à-dire répartie aléatoirement dans toutes les directions. En particulier, la fraction de l'onde incidente qui est retournée dans la direction d'où elle provient est appelée rétrodiffusion (Backscattering en anglais). La diffusion peut s'effectuer avec ou sans variation de fréquence [13]. On parle de diffusion inélastique et élastique. La polarisation du rayonnement incident peut être modifiée totalement ou partiellement par la diffusion à cause de plusieurs phénomènes comme l'absorption, la réémission générant des interférences et des phénomènes de rotation des plans de vibration [14].

Les premières études de la diffusion lumineuse ont été faites dans le cadre de l'observation astronomique [11]. En effet, le flux lumineux qui vient des étoiles jusque dans nos télescopes subi une atténuation due à la lumière diffusée dans les nuages de poussières qu'il a rencontrés sur son parcours. Ce phénomène apparaîtra donc là comme un défaut que les astronomes ont voulu éliminer. Mais les physiciens se sont très vite rendu compte que cette diffusion n'avait pas seulement atténué le faisceau de lumière mais avait changé ses propriétés, entre autre la polarisation. A partir de là, la diffusion n'était plus vue comme un défaut [15].

1.2.1. Généralités

Les atomes et les molécules d'un milieu traversé par un champ électromagnétique se comporteront comme des dipôles oscillant et émettant à leur tour des ondes électromagnétiques. Ces ondes vont être émises dans des directions différentes de l'onde excitatrice [10, 16].

Une onde est diffusée quand sa direction de propagation est redistribuée dans toutes les directions de propagation [17].

Il existe quatre types de diffusion de la lumière (Figure 1.2), la diffusion élastique, la diffusion inélastique, diffusion simple et diffusion multiple [5].

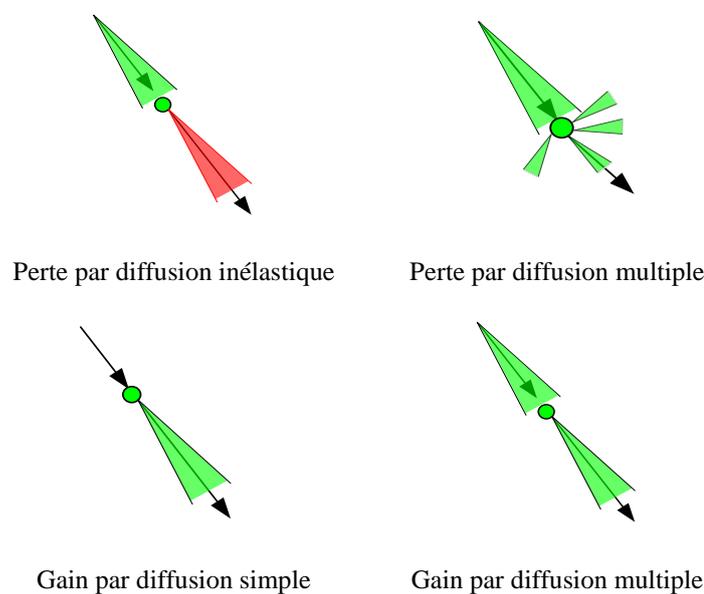


Figure 1.2 : Types de diffusion de la lumière

1.2.2. Diffusion élastique

Par définition, une onde est dite diffusée élastiquement, lorsque suite à une interaction avec un diffuseur, sa direction de propagation est modifiée et sa fréquence reste identique [18].

La diffusion élastique de la lumière est le type le plus dominant de l'interaction lumière-tissu. Elle provient de l'hétérogénéité spatiale de l'indice de réfraction optique. Dans les milieux biologiques, l'indice de réfraction dépend de la concentration et du type de circonscription des tissus [19]. Divers structures des tissus telles que des organites cellulaires et la matrice extracellulaire donnent lieu à la distribution spatialement hétérogène de l'indice de réfraction et peut aussi affecter la propagation de la lumière dans les tissus, y compris

l'absorbance, la polarisation, ou les caractéristiques angulaires de la lumière diffusée à partir de tissus émergents. En principe, une structure de tissu d'une taille quelconque peut donner lieu à la diffusion de la lumière. Toutefois, elles ont des structures comparables à la longueur d'onde de la lumière qui sont principalement responsables de la diffusion de la lumière. Le terme «comparable», toutefois, doit être utilisé avec prudence, car il couvre une gamme très large de tailles indéfinies qui, en fonction de la propriété observable la lumière diffusée peut varier de quelques dizaines de nanomètres à quelques dizaines de microns [20].

1.2.3. Diffusion inélastique

Une onde est diffusée inélastiquement, lorsque suite à une interaction avec un diffuseur, sa direction de propagation et sa fréquence sont modifiées. En effet; l'onde qui interagit avec le milieu perd de son énergie par absorption (paramètre indissociable de la diffusion) et qui permet de faire varier la longueur d'onde [18].

1.2.4. Diffusion simple

Dans le cadre de la diffusion simple, les distances entre les particules constituant le milieu sont suffisamment grandes pour que le rayonnement diffusé par une particule n'atteigne pas une autre, c'est à dire que les photons reçus sont des photons incidents ayant subi une seule interaction avec le milieu [21].

1.2.5. Diffusion multiple

Le phénomène de diffusion multiple apparaît, dès que, la distance entre les particules est faible. Dans ce cas, si la diffusion simple permet la description de milieu dilué, la diffusion multiple doit être envisagée pour des milieux où la densité particulaire est élevée (nuages, verre opaque, solutions concentrées, atmosphères stellaires, pigments, poudres, etc.) [21].

1.2.6. Diffusion directe et rétrodiffusion de la lumière

La rétrodiffusion correspond à la diffusion par la surface d'entrée du milieu sans pénétration à l'intérieure [22], On dit qu'un milieu diffusant en volume est un milieu contenant des objets aléatoirement disposés dans l'espace. Un exemple familier est le brouillard composé de gouttelettes d'eau aléatoirement disposées dans l'air, les poussières interstellaires, l'atmosphère et les nuages.

La figure 1.3 représente les deux aspects de diffusion : par la surface (photons rétro-diffusés) et par le volume (photons diffusés) à une longueur parcourue L donnée.

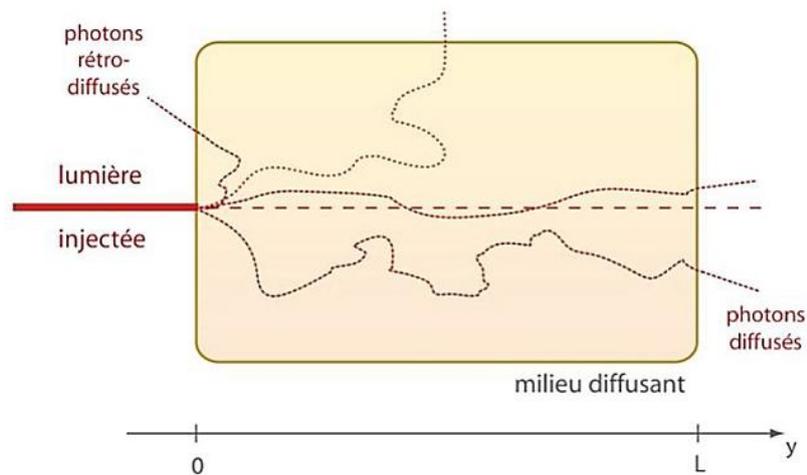


Figure 1.3 : La diffusion de la lumière [22]

1.2.7. L'histoire de diffusion de la lumière

Les théories de diffusion de la lumière sont développées (vers la fin du XIX et début du XX siècle), pour traiter la distribution aléatoire angulaire et spectrale des intensités par un milieu [20, 21]. Les signaux lumineux diffusés portent en effet une empreinte de l'interaction avec la matière, qu'il est possible de l'utiliser pour en déduire certaines ses propriétés [19].

La figure 1.4 illustre l'exploitation de ce phénomène afin d'étudier la topographie des surfaces en mesurant la rugosité et le facteur d'uniformité, et la figure montre aussi la relation directe entre l'état de surface et la quantité des rayons lumineux diffusés.

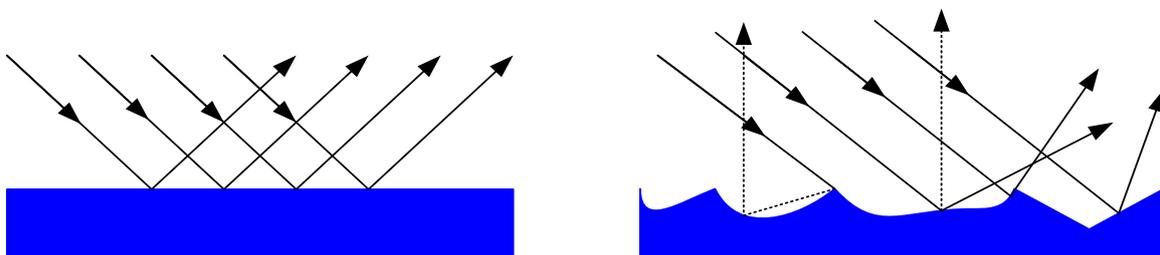


Figure 1.4 : Diffusion de la lumière par des surfaces [23]

1.2.8. Les différentes théories de diffusion de la lumière par les particules

Lorsque la lumière interagit avec un agrégat de particule (Un agrégat est une masse en cohésion constituée de particules primaires), la lumière diffusée dépend de nombreux paramètres: la taille des particules par rapport à la longueur d'onde, leurs formes, leurs propriétés optiques (indice de réfraction, conductivité...etc.), et de leurs orientations [24].

Les différentes tailles des particules sont responsables de la diffusion dans les milieux matériels conduisent à la définition de deux régimes de diffusion en fonction de la longueur d'onde.

- ✓ Lorsque la taille des particules est nettement inférieure à la longueur d'onde, on parle de la diffusion de Rayleigh (Figure 1.5). En 1871, Rayleigh fut en effet le premier à formuler la théorie de la diffusion isotrope produite par ces particules [25].
- ✓ Lorsque la taille des particules est voisine de la longueur d'onde, on parle de régime de Mie (Figure 1.5). En 1908, Mie a généralisé la théorie de la diffusion par des particules dont la taille est de l'ordre de la longueur d'onde [25]. A mesure que la taille des particules augmente, la diffusion devient anisotrope. Elle est préférentiellement dirigée vers l'avant et dépend moins fortement de la longueur d'onde [21].

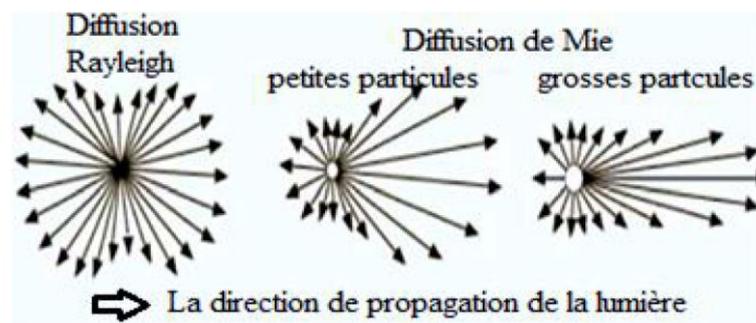


Figure 1.5: Observation du phénomène de diffusion en fonction de la taille de la particule; Diffusion de Rayleigh et diffusion de Mie.

De gauche à droite (Figure 1.5): intensité de la diffusion de Rayleigh pour des petites particules,

La diffusion Mie pour de grosses particules, en fonction de la direction. L'onde incidente arrive par la gauche.

1.2.8.1. Théorie de Rayleigh

La diffusion de Rayleigh concerne la diffusion de la lumière par des particules très

petites comparées à la longueur d'onde. En raison de la petite taille de particule, on assume que la forme de la particule n'a pas d'influence [18].

En effet, lorsque la particule est soumise à une onde plane monochromatique, de longueur d'onde λ , le champ électrique de cette onde induit dans la particule à un moment dipolaire oscillant [19]. Donc toutes les molécules oscillent en phase sous l'effet du champ électrique incident. Le vecteur du champ électrique diffusé par la particule dans une direction est la somme des champs dus aux molécules. Ces interférences nécessairement constructives font que l'intensité en diffusion de la particule est le produit de l'intensité d'une de ses molécules par le carré de leur nombre [12].

La section efficace en diffusion angulaire d'une petite particule de rayon « r », de volume « V » et comportant « N » molécules par unité de volume, est donc égale à :

$$\zeta_p(\theta) = (N_m V)^2 \cdot \zeta_{mol}(\theta) \quad (1.1)$$

$$\zeta_p(\theta) = \frac{(16\pi^4 r^6)}{\lambda^4} \left(\frac{(n^2 - 1)}{n^2 + 2} \right)^2 \cdot \sin^2 \theta \quad (1.2)$$

$$\zeta_p = \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \quad (1.3)$$

Où :

ζ_p : Section efficace en diffusion angulaire de la particule.

θ : Angle entre l'axe du dipôle et la direction d'émission.

N_m : Nombre de molécules.

V : Volume de la particule.

λ : Longueur d'onde.

n : Indice de réfraction de la particule.

$\zeta_{mol}(\theta)$: Section efficace en diffusion angulaire de la molécule donnée par :

$$\zeta_{mol}(\theta) = \frac{9\pi^2}{N^2\lambda} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \cdot \sin^2 \theta \quad (1.4)$$

Dans le cas de la diffusion Rayleigh de la lumière naturelle, si les particules du milieu sont électriquement isotropes et n'absorbent pas de lumière, l'intensité de la lumière diffusée par une unité de volume du milieu sous un angle par rapport à la propagation de la lumière incidente, est donnée par [12] :

$$I_\theta = \alpha \frac{N_0 V^2}{D^2 \lambda^2} (1 + \cos^2 \theta) i_0 \quad (1.5)$$

Où:

I_θ : Intensité de la lumière diffusée.

λ : Longueur d'onde de la lumière incidente.

D : Distance entre le volume diffusant et le point d'observation.

N_0 : Nombre de particules par unité de volume du milieu.

V : Volume d'une particule.

α : Paramètre de taille.

A partir de cette formule, il en résulte que l'intensité de la lumière diffusée est inversement proportionnelle à la puissance quatre de la longueur d'onde.

Dans la lumière diffusée (Figure 1.6), la radiation de petites longueurs d'ondes prédomine (Bleu), alors que pour la lumière transmise, c'est la radiation des grandes longueurs d'onde qui prédomine (Rouge). La lumière Bleue est à peu près diffusée avec une intensité 10 fois plus grande que la lumière Rouge. C'est la raison qui explique que nous pouvons voir le ciel avec une couleur bleue [15].

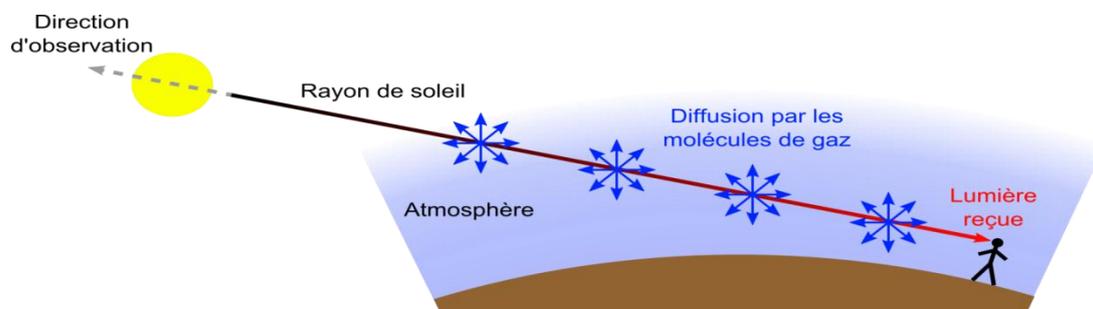


Figure 1.6 : Diffusion de Rayleigh

1.2.8.2. Théorie de Mie

Le premier à avoir résolu le problème de la diffusion de la lumière par une particule sphérique en utilisant la théorie de l'électromagnétisme de Maxwell est Gustav Mie en 1908 [19].

La diffusion de Mie désigne la diffusion par des particules dont le rayon oscille entre 0.1 et 10 fois la longueur d'onde. Cette théorie est complexe et les résultats quantitatifs ne peuvent être obtenus qu'avec des particules de géométries symétriques (Figure 1.7) [15]. On note que la puissance diffusée est maximale lorsque la particule est grande devant la longueur d'onde.

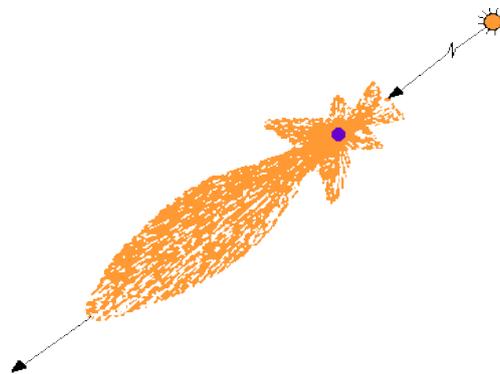


Figure 1.7 : **Diffusion de Mie**

Cette théorie montre que l'intensité de la lumière diffusée en fonction de la longueur d'onde, décroît fortement à partir d'une longueur d'onde environ égale à la taille de la particule. Au-dessus de cette valeur, elle ne dépend pratiquement pas de la longueur d'onde du rayonnement [24]. La théorie de Mie est beaucoup plus complexe que celle de la diffusion Rayleigh. Le rayon de la particule et la longueur d'onde de la lumière incidente déterminent le paramètre « α » qui est l'un des paramètres de base de la théorie de Mie qui est donnée par [25]:

$$\alpha = 2\pi a/\lambda \quad (1.6)$$

Avec :

α : Paramètre de taille de la particule adimensionnée.

a : Rayon de la sphère isotrope.

λ : Longueur d'onde de la lumière utilisée.

1.3. La polarisation de la lumière

Le champ électrique peut être exprimé avec le vecteur dit de Jones décrivant la composante horizontale d'amplitude E_{ox} et la composante verticale d'amplitude E_{oy} . Il peut exister un déphasage φ qui décrit le retard de la composante verticale par rapport à la composante horizontale du champ électrique (onde elliptique) (Figure 1.8) [26].

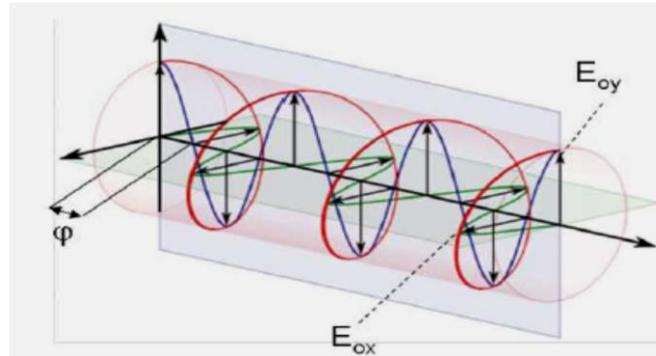


Figure 1.8 : Représentation du champ électrique avec sa composante horizontale (Verte) et sa composante verticale (Bleu). La résultante est en Rouge [26].

L'utilisation de la polarisation de la lumière permet d'extraire des informations sur le matériau d'interaction suivant les plans parallèle et perpendiculaire souvent dénommées S et P [22], la différence de phase entre les deux rend compte de l'anisotropie ou la différence géométrique du chemin parcouru. Ce paramètre peut, en supposant l'isotropie, nous informer sur la différence de taille suivant l'axe parallèle et perpendiculaire, qui donne la forme du diffuseur.

La figure 1.9 schématise les plans de polarisation de la lumière, avec :

$\vec{E}_{pi/pr}$: Vecteur champ électrique parallèle incident et réfléchi

$\vec{E}_{pi/pr}$: Vecteur champ électrique perpendiculaire incident et réfléchi

ϕ_0 : Angle d'incidence/réflexion

ϕ_1 : Angle de réfraction

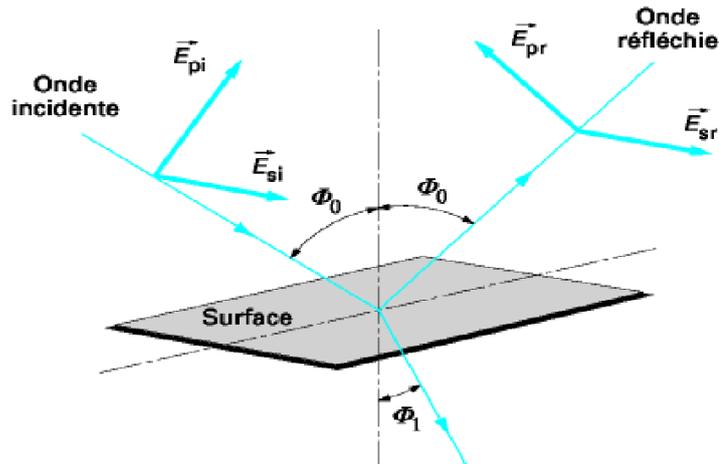


Figure 1.9 : Les plans parallèle et perpendiculaire de polarisation de la lumière

1.3.1. Polarisation dans le modèle de diffusion avec centre diffusant sphérique

Une géométrie adaptée est présentée sur la (figure 1.10). L'angle de diffusion θ_d est défini comme étant l'angle entre le vecteur de l'onde incidente k_i et celui de l'onde diffusée k_d . La lumière incidente se propage suivant l'axe des z . Elle est diffusée dans le plan de diffusion (XOZ) [28, 29].

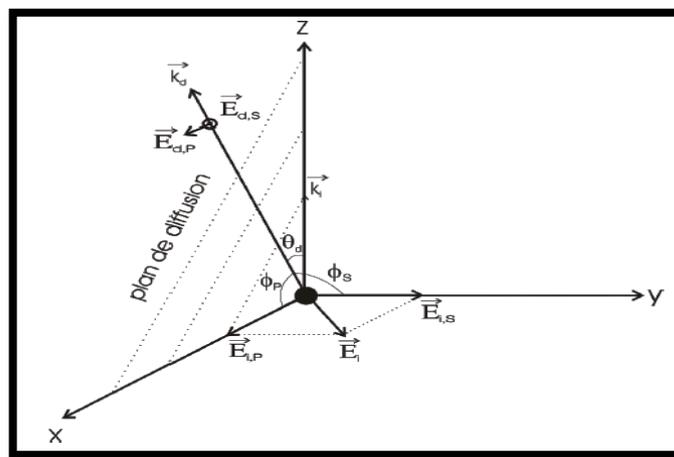


Figure 1.10 : Géométrie de la diffusion optique selon le modèle sphérique.

(XOZ) est le plan de diffusion. k_i est le vecteur d'onde incidente ;

$E_{i,P}$ et $E_{i,S}$ sont les composantes du champ électrique incident ;

k_d est le vecteur d'onde de la lumière diffusée à un angle θ ;

$E_{d,P}$ et $E_{d,S}$ sont les composantes du champ électrique incident ;

φ_p et φ_s sont les angles entre k_d et $E_{i,P}$ et $E_{i,S}$ respectivement.

Notons que la polarisation de la lumière diffusée est de même direction que celle de la lumière incidente (les champs électriques incident et diffusé sont colinéaires).

La polarisation de la lumière diffusée est déterminée à partir de la polarisation du dipôle induit qui, dans le cas d'un modèle sphérique [30], a la même direction que la polarisation incidente. Nous pouvons alors distinguer les deux cas suivants :

- La direction de la polarisation de la lumière incidente est selon l'axe des x . Dans ce cas, la lumière incidente est polarisée parallèlement au plan de diffusion (notation P).
- La direction de la polarisation de la lumière incidente est selon l'axe des y . La lumière incidente est donc polarisée perpendiculairement au plan de diffusion (notation S).

1.3.2. Etude de la morphologie des particules

Les particules dont la taille est comprise entre 1 et 100 nm possèdent des propriétés physiques particulières. Elles sont dans un état intermédiaire entre celui du solide et celui de la molécule. Dans un solide cristallin, les électrons occupent des bandes d'énergie continues [29, 31]. Le calcul de ces bandes d'énergie est simplifié par le fait que l'arrangement des atomes est périodique. C'est le domaine de l'état solide. La largeur, la séparation, l'occupation des bandes d'énergie électroniques déterminent les propriétés électriques, optiques et magnétiques du solide. Au contraire, pour des systèmes de dimension atomique, la densité d'état électronique devient discrète [32]. Les niveaux d'énergies électroniques sont calculés par des techniques bien connues de la physique atomique et moléculaire. Quant aux «agrégats», ou assemblages de quelques dizaines à plusieurs milliers de constituants, ils manifestent des propriétés intermédiaires entre celles de l'atome (ou de la molécule) et celles du solide massif.

Comme la réponse optique (diffusion, absorption et émission) de microparticules dépend fortement de leurs caractéristiques intrinsèques (taille, forme et composition) et de leur environnements local [32], ceci peut constituer une source d'élargissement hétérogène des mesures optiques réalisées sur ces matériaux nano-composites. En effet, les particules qui les composent présentent le plus souvent des distributions de taille et de forme. Les mesures sont toujours réalisées sur un grand nombre d'entre elles et reflètent uniquement une réponse moyenne.

1.4. L'utilisation de la diffusion de la lumière pour l'étude des milieux biologiques

L'imagerie médicale in-vivo utilise donc principalement les ondes électromagnétiques. Les techniques utilisées en clinique exploitent tout le spectre électromagnétique présenté dans la figure 1.11, des rayons γ dans les services de médecine nucléaire jusqu'aux radiofréquences, dans le cas de l'IRM en passant par les rayons X dans les services de radiologie. Les domaines du visible et du proche-infrarouge sont encore très peu utilisés en imagerie clinique, mais connaissent un intérêt grandissant depuis une vingtaine d'années. Plusieurs techniques d'imagerie optique ont déjà investi le domaine de la clinique, en particulier la tomographie optique cohérente (TOC) en ophtalmologie ou la spectroscopie et la topographie proche infrarouge (NIRS) en neurologie [33, 34].

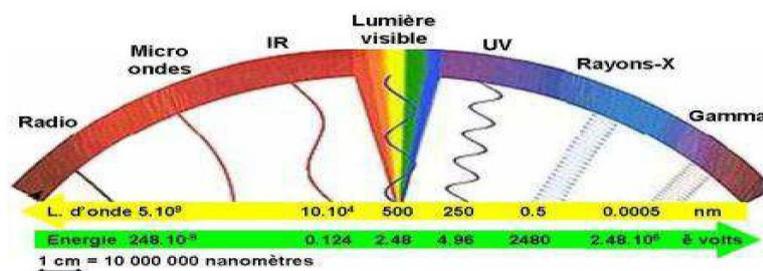


Figure 1.11 : Spectre des ondes électromagnétiques [33].

Les tissus biologiques sont bien connus pour leur caractère diffusant. Dans une approche corpusculaire de la lumière, il est possible de dire que les photons ne s'y propagent pas nécessairement en ligne droite, ils peuvent être déviés. Ces déviations sont dues aux différences d'indice de réfraction à l'échelle microscopique. Il est courant de distinguer trois régimes de propagation correspondant à différentes fréquences d'occurrence des événements de diffusion: le régime balistique, le régime serpente et le régime diffusif (figure 1.12), Ainsi le régime balistique correspond au cas où aucune diffusion n'a affecté la propagation du rayonnement. En régime serpente seuls quelques événements de diffusion se sont produits mais ceux-ci ne sont pas suffisamment nombreux pour faire perdre au rayonnement l'information de sa direction initiale. Enfin le régime diffusif correspond aux situations où le nombre d'évènements de diffusion est important, la lumière a perdu la mémoire de ses caractéristiques initiales de propagation sur une distance typique égale au millimètre [15, 21].

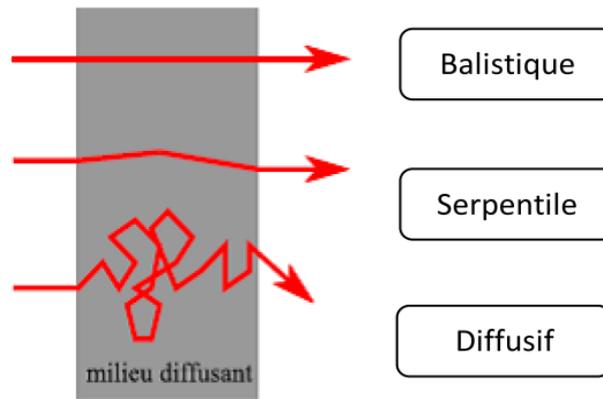


Figure 1.12 : Différents régimes de transport en milieux diffusants [21]

Comme dans toute expérience de diffusion de la lumière, il s'agit de faire passer un faisceau de lumière blanche à travers l'échantillon, c'est-à-dire à l'intérieur du noyau d'une cellule, et de recueillir sur un détecteur, dans une direction donnée, la lumière diffusée par le volume éclairé. Ensuite, il faut un système d'analyse de l'intensité de la lumière diffusée, A l'aide de ce dernier, on construit la fonction de l'intensité de la lumière diffusée [26].

1.5. L'état de l'art

L'élément de base dans un milieu biologique est la cellule, qui est connue par son caractère diffusant à cause de sa structure complexe et son anisotropie, cet élément de base est le premier lieu de développement des tumeurs. Les cellules biologiques sont considérées comme un milieu optiquement absorbant et très diffusant, cela veut dire que l'étude des propriétés optiques des cellules biologiques est une clé pour suivre l'évolution et les changements sur la morphologie et l'état cellulaire [35, 36].

La figure 1.13 schématise un principe optique d'étude spectrale de l'interaction lumière- tissu biologique en utilisant des fibres optiques excitatrices/réceptrices.

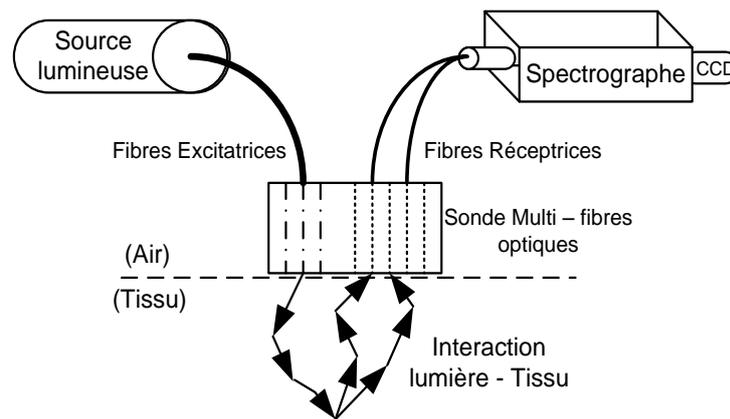


Figure 1.13 : Principe optique de l'étude d'interaction lumière-tissu biologique

La source génère une onde incidente monochromatique transportée par une fibre (Figure 1.13), l'interaction avec le milieu donne une onde modifiée en phase et en amplitude. Le spectromètre permet d'analyser l'onde et d'extraire le déphasage et l'état de polarisation.

En 1998, Judith R et al ont réalisé des mesures spectrales et angulaires en utilisant une source de lumière polychromatique (Figure 1.14) dont source et l'échantillon, qui est un tissu biologique, est illuminé par une fibre optique qui propage une lumière multi spectrale (450-1000 nm). Après propagation dans le tissu, la lumière réfléchie (Réflectance) est détectée par des fibres optiques situées dans le plan de la source. Ils ont aussi utilisé un autre montage optique utilisant une source de lumière monochromatique (Figure 1.15) basé sur la mesure de la dépendance angulaire de la lumière diffusée, c'est-à-dire la fonction de phase à l'aide d'un goniomètre. L'éclairage de l'échantillon de tissu est réalisée à l'aide d'un laser He-Ne, la lumière diffusée est mesurée en fonction de l'angle par un photomultiplicateur en rotation autour de l'échantillon, ce groupe de recherche ont calculé par ces deux méthodes le coefficient de diffusion réduit et le facteur d'anisotropie, puis ils ont tiré la distribution de taille des diffuseurs (entre 0,4 et 2.0 μm), et ils ont aussi montré que la fonction de phase est très sensible à la taille des diffuseurs [37].

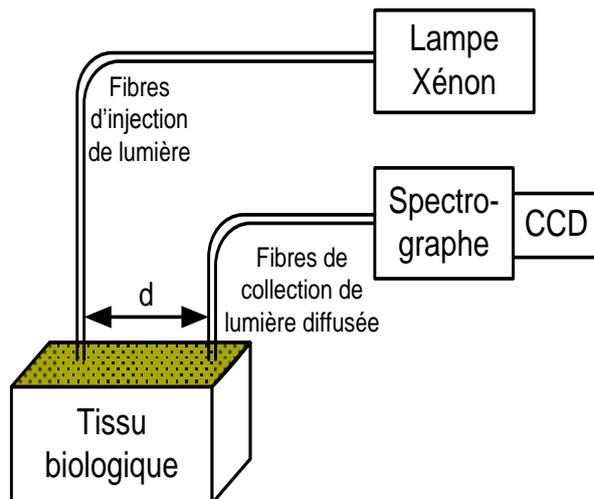


Figure 1.14 : Montage optique utilisé.

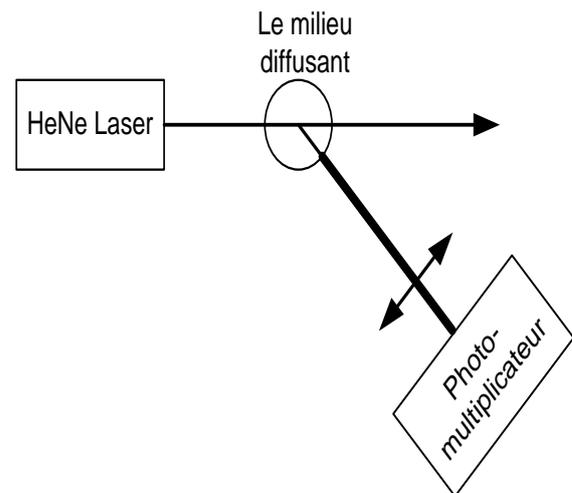


Figure 1.15 : Deuxième Montage optique utilisé avec un laser

Une autre méthode pour sonder le tissu épithélial est l'utilisation de la polarisation de la lumière [38]. Une technique utilisée par Backman Vadim et al 'Northwestern University' USA (Figure 1.16), le système est éclairé par une lumière polychromatique polarisée linéairement par rapport au plan d'incidence, et les rayons diffusés collectés provient à la fois :

- Des couches supérieures de l'échantillon où la lumière conserve sa polarisation.
- Des couches profondes où la lumière perd sa polarisation car elle a subi de la diffusion multiple.

L'objectif de cette expérience optique (Figure 1.16) est de séparer la contribution de la lumière provenant des cellules de la surface et des cellules du fond qui ne sont pas parfois du même tissu biologique.

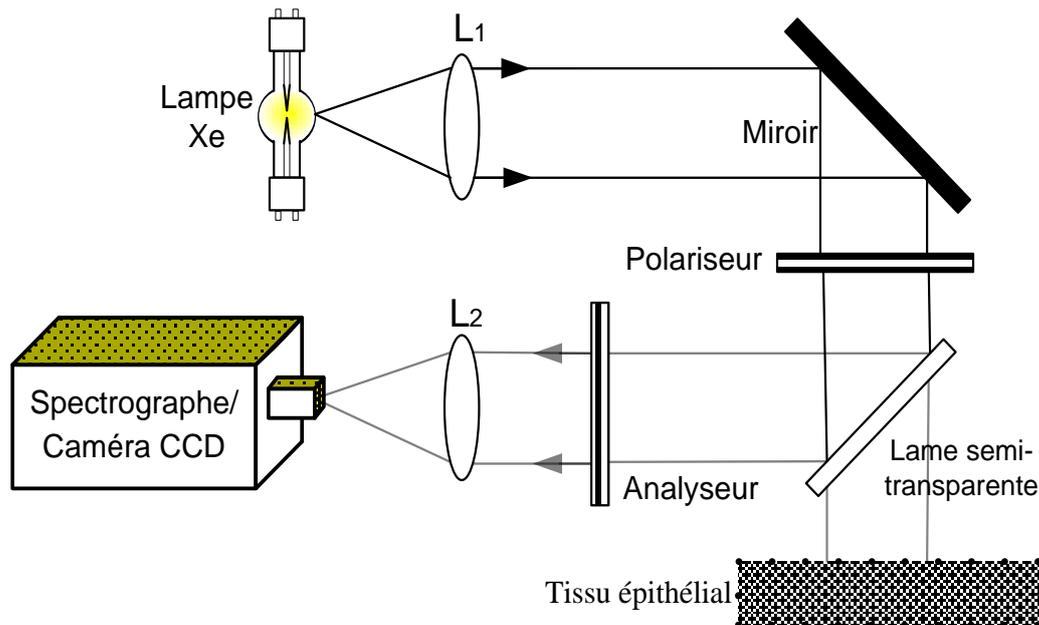


Figure 1.16: **Montage expérimental utilisé pour mesurer les tailles des noyaux [38].**

Le principe est que la lumière reste polarisée suite à une diffusion simple, par contre la lumière provenant des couches les plus profondes perd sa polarisation, car elle a subi une diffusion multiple; et par l'utilisation de la théorie de Mie ils ont mesuré la distribution des tailles des noyaux des cellules saines et cancéreuses (Figure 1.16). L'utilisation des polariseurs, un sur l'onde incidente pour définir l'état de polarisation incident, et l'autre sur l'onde diffusée pour connaître l'état de polarisation après interaction.

En 2004, un groupe de chercheur de l'université de Cambridge a utilisé le même montage mais de manière couplée, c'est-à-dire qu'ils ont fait des mesures angulospectrales sur des cellules épithéliales (Figure 1.17), dont l'échantillon est éclairé par un faisceau lumineux polychromatique vient d'une source de lumière « Tungstène-Halogène » et injecté par des fibres optiques. Après interaction avec le tissu, la lumière diffusée est détectée par des fibres réceptrices, et un spectromètre est enfin placé pour analyser les distributions angulaire et spectrale des intensités diffusées. Par l'utilisation de ce montage, ils ont pu extraire les diamètres des noyaux des cellules [26]. Ils ont dit aussi: "on ne peut pas négliger la diffusion par les mitochondries devant le noyau (Peut-être à cause de sa taille), car tous les deux contribuaient à la diffusion dans les tissus" [39]. Ce groupe de recherche ont remarqué aussi que si nous faisons des études in vitro, le flux de diffusion n'exprime pas de façon exacte la véritable diffusion d'un tissu, à cause de la profondeur de pénétration et son effet sur la diffusion du fond.

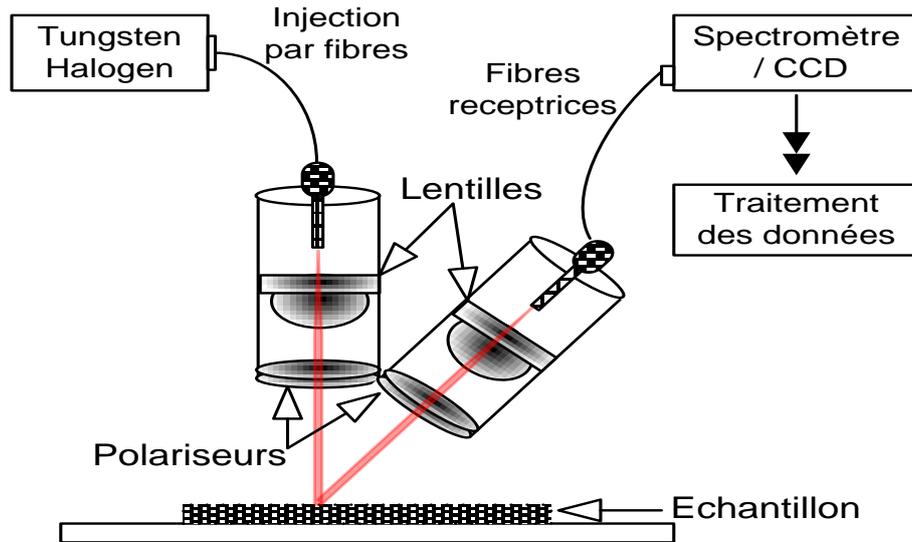


Figure 1.17: Montage expérimental utilisé pour mesurer les tailles des micro-particules.

En 2012, un groupe de l'université de New York a fait des études systématiques des paramètres de dimension fractale [23], l'absorption et les coefficients de diffusion pour les cellules de la prostate cancéreuses et normales (Figure 1.18). La source utilisée dans ce montage est un laser Saphire de gamme spectrale de 750 nm à 860 nm, le faisceau sortant tombe sur l'échantillon, ensuite, une CCD est placée pour faire l'acquisition des signaux diffusés. Cette technique présente une étude sur les différences entre le coefficient d'absorption, le coefficient de diffusion, le facteur d'anisotropie et le coefficient de diffusion réduit par l'utilisation des techniques de diffusion, transmittance et réflectance spectroscopiques avec des modèles théoriques.

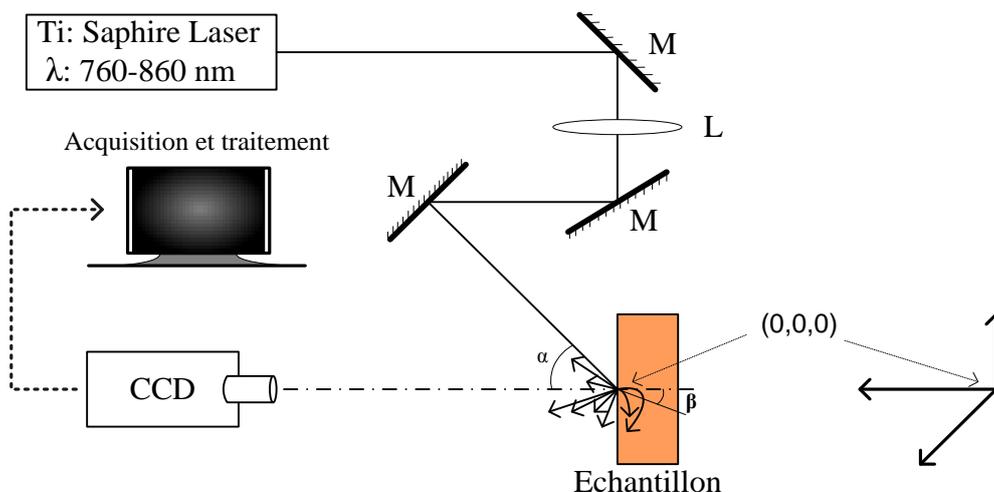


Figure 1.18: Montage expérimental utilisé pour mesurer le coefficient d'absorption, le coefficient de diffusion et le facteur d'anisotropie [23].

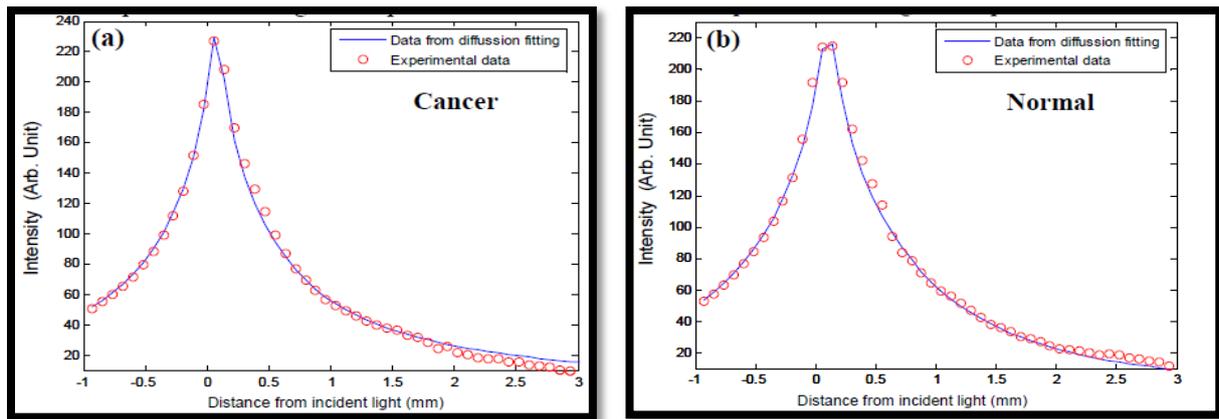


Figure 1.19: **Comparaison entre les intensités diffusées en fonction de la longueur d'onde pour des tissus cancéreux et normaux [23].**

Les courbes (Figure 1.19.a et 1.19.b) montrent une évolution en hauteur dans les deux cas sain et tumoral, cette dernière est causée par les pertes par absorption et diffusion par rapport à la longueur d'onde utilisée, aussi la variation du largeur à mi-hauteur, qui est exprimée par l'intermédiaire de l'intégrale du flux compris entre la courbe et l'axe des x, peut nous renseigner sur la distribution des intensités par nos échantillons.

Malgré les recherches qui sont en cours sur la diffusion par les milieux biologiques, ces dernières restent sur le plan théorique et nous ne trouvons pas un dispositif (un diffusomètre relié à un modèle mathématique approprié), qui est utilisé dans les hôpitaux afin d'analyser et détecter des tumeurs.

Dans ce qui suit, nous allons expliquer la technique expérimentale qui permet d'évaluer la présence de cellules cancéreuses parmi les cellules saines. Ceci en un temps très court relativement à la microscopie classique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Born. M, Wolf. E., Principles of Optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light, 7eme edition, London (1999), pp.759-785.
- [2] Kozlov, G. G., Zapasskii, V. S., Shapochkin., Heterodyne detection of scattered light: application to mapping and tomography of optically inhomogeneous media, Applied Optics (2018), vol 57, pp.171-176.
- [3] Novitsky. A, Shalin, A. S, Lavrinenko, A. V., Spherically symmetric inhomogeneous bianisotropic media: Wave propagation and light scattering, PHYSICAL REVIEW (2017), vol 95-053818.
- [4] Raphaëlle. J., Détermination des propriétés optiques de matériaux granulaires, Paris, thèse de Doctorat (2012), pp.14-15.
- [5] Sakurada.Y et Nakamura. T., Démonstration of the light scattering phenomenon in the atmosphère, Proc. of SPIE, vol 4588, [2002], p. 491.
- [6] Marinyuk, V V, Sheberstov, S V., Effect of the single-scattering phase function on light transmission through disordered media with large inhomogeneities, Journal of Physics Conference Series (2017), vol 788, pp.1-7.
- [7] Lesaffre. M., Imagerie acousto-optique de milieux diffusants épais par détection photo réfractive, Paris, Thèse Doctorat (2009), p.10.
- [8] Alexander A. K., Light Scattering Reviews 7: Radiative Transfer and Optical Properties of Atmosphere and Underlying Surface, Springer Praxis Books (2013).
- [9] Ishikawa. H., Ultrafast All-Optical Signal Processing Devices, WILEY (2008).
- [10] Durant. S., Propagation de la lumière dans les milieux aléatoires: rôle de l'absorption, de la diffusion dépendante et du couplage surfase-volume, Thèse de doctorat d'Etat, Ecole Centrale Paris (2003).
- [11] Liu, J. M., Principles of Photonics, Cambridge University Press (2016).
- [12] Elalofi. R., propagation du rayonnement en milieu diffusant: étude de transition entre régime balistique et régime diffusif et des fluctuations temporelles d'intensité, Thèse de doctorat d'Etat, Université de Metz. (2003).
- [13] Chorfi.H, Ayadi. K., Vers la Biopsie Optique, éditions universitaires européennes (2017).
-

- [14] Tao. T. W et al., Unified Mie and fractal scattering by biological cells and subcellular structures, *OPTICS LETTERS* / Vol. 32, No. 16 / August 15, 2007.
- [15] Timothy. E et al., Simulation of elastic wave scattering in cells and tissues at the microscopic level, *J. Acoust. Soc. Am.* 125 3, March 2009.
- [16] Xu. M et al., Fractal mechanisms of light scattering in biological tissue and cells, *OPTICS LETTERS* November (2005), vol 30, No. 22.
- [17] Huiling. H et al., Light scattering by a spheroidal bubble with geometrical optics approximation, 2012 Elsevier.
- [18] Li-An. W., DNA-guided assembly of three-dimensional nanostructures for surface-enhanced Raman spectroscopy, *Proc. of SPIE* Vol. 9340 934007-1, 2015.
- [19] Qian. W et al., Dark-field light scattering imaging of living cancer cell component from birth through division using bioconjugated gold nanoprobe, *Journal of Biomedical Optics*, 2010.
- [20] Stephen. R et al., *CELLS AND TISSUES, Cell Biology: A Short Course, Second Edition* (2004).
- [21] Bordier. C et al., Illustration of a bimodal system in Intralipid-20% by polarized light scattering: experiments and modeling, *Appl Phys A* (2009) 94: 347–355.
- [22] Fabrício. L. S., Discriminating model for skin cancer diagnosis in vivo through Raman Spectroscopy, *Proc. of SPIE* Vol. 8565, 2013.
- [23] Singh. S. P., In vivo Raman spectroscopy for oral cancers diagnosis, *Biomedical Vibrational Spectroscopy V: Advances in Research and Industry*, 2012.
- [24] Backman. V et al., Polarized light Scattering Spectroscopy for Quantitative Measurement of Epithelial Cellular Structures In Situ, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 5, 1019-1025.
- [25] Kinnunen. M et al., Measurement of elastic light scattering from two optically trapped microspheres and red blood cells in a transparent medium, *OPTICS LETTERS* / Vol. 36, No. 18 / September 15, 2011.
- [26] Joshi. N. V., Raman spectroscopy and Raman imaging for early detection of cancer, *Optical Diagnostics and Sensing IV*, 2004.
- [27] CARON. J., Diffusion de la lumière dans les milieux stratifiés: prise en compte des

interfaces rugueuses et des effets de polarisation, Thèse de l'Université Paris 6 (2003), France.

[28] Bardin. D, Kalinovskaya. L, Uglov. E., Standard Model light-by-light scattering in SANC: analytic and numeric evaluation, *Phys Atom Nucl* (2010), vol 73, pp. 1878-1888.

[29] Lawrence. J., *Advances in Laser Materials Processing*, Woodhead Publishing (2017), 2nd Edition.

[30] Mirosław. J, Fournier. G., *Light Scattering by Particles in Water: Theoretical and Experimental Foundations*, 1st Edition (2007), Academic Press.

[31] Wang. T, Xiaoqing. L, Xiaoling. J, Daomu. Z., The spectral shift of two correlated light waves on scattering from a collection of particles, *Optik- International Journal for Light and Electron Optics*, vol. 126, pp. 780-783, (2015).

[32] Wang. Y, Chen. G., Simulation of light scattering properties of material surface considering the specific morphology information, , *Optik- International Journal for Light and Electron Optics*, vol. 132, pp. 111-120, (2017).

[33] Perleman .L.T., Optical diagnostic technology based on light scattering spectroscopy for early cancer detection, *Expert Rev. Med. Devices* 3, pp 787- 803, 2006.

[34] Brun. B; *Spectroscopie optique et infrarouge de biomolécules et systèmes molécule-métal*, université de Lyon, p.22, (2012).

[35] Bordier. C., *Diffusion de la lumière par des tissus biologiques : Etude expérimentale et modélisation par l'équation de transfert radiatif vectorielle*, THESE de DOCTORAT, UNIVERSITE PARIS 6, (2009).

[36] Kervella. M et al., *Comparaison de deux modèles hybrides simulant la propagation de la lumière dans les tissus biologiques*, Elsevier Masson, pp 80-85, (2007).

[37] Xiaogang. L et al., *Light scattering from normal and cervical cancer cells*, *Applied Optics*, vol 56, pp. 3608-3614, (2017).

[38] Judith. R, Andraud. C et al., *Towards an optical biopsy by elastic light scattering*, 16th Mediterranean Conference on Control and Automation Congress Centre, Ajaccio, France June pp 25-27, (2008).

[39] Liang. M., *Optical Interactions with Tissue and Cells XXIV - Frequency-modulated light scattering interferometry used for assessment of optical properties in turbid media*, SPIE. Proceedings [SPIE SPIE BIOS - San Francisco, California, USA, vol 8579, (2013).

Chapitre 02

OPTIQUE DES MILIEUX BIOLOGIQUES

2.1. Introduction

L'utilisation de la lumière pour l'étude des tissus biologiques est connue depuis environ 200 ans. Il existe différentes techniques pour évaluer les propriétés mécaniques, électriques, optiques et autres, ...). Les techniques optiques montrent des capacités à étudier les propriétés biologiques du corps humain [1,2].

Les tissus biologiques sont des milieux optiquement absorbants et très diffusants. Lorsqu'un tissu biologique est illuminé à l'aide d'une source lumineuse de large bande, les photons entrant dans le tissu s'y propagent en étant diffusés et absorbés. La diffusion dite élastique se fait sans perte d'énergie (les photons gardent la même longueur d'onde tout au long de leur propagation) [3]. La diffusion inélastique est une diffusion avec perte d'énergie qui se traduit par une variation sur la fréquence. La lumière diffusée peut être captée grâce à différents instruments de mesure, de la sphère d'intégration jusqu'aux capteurs CCD [4, 5], les paramètres des milieux peuvent être extraits à partir des mesures de réflexion, transmission, diffusion et absorption [6].

Ce deuxième chapitre vise à apporter une meilleure compréhension de l'interaction de la lumière avec les tissus biologiques, il présente un aperçu de recherches actuelles utilisant la diffusion élastique et inélastique de la lumière à des fins de diagnostic et de thérapie. Une première partie est consacrée aux concepts biologiques d'un point de vue essentiellement histologique afin d'apporter les informations nécessaires à la compréhension des processus physiques qui interviennent à l'intérieur de ces tissus lorsqu'une onde lumineuse les traverse.

2.2. Les tissus biologiques: description histologique et propriétés optiques

2.2.1. Description histologique

Un tissu en biologie est le niveau d'organisation intermédiaire entre la cellule et l'organe. Un tissu est un ensemble de cellules de même fonction et de même origine, regroupées en amas, réseau ou faisceau (fibre). Un tissu forme un ensemble fonctionnel, c'est-à-dire que ses cellules concourent à une même fonction. Les tissus biologiques se régénèrent régulièrement et sont assemblés entre eux pour former des organes [7].

Sur le plan morphologique, on distingue deux grands types de répartitions cellulaires dans les tissus:

- Le tissu à union cellulaire serrée : les espaces intercellulaires, très étroits, correspondent à l'ensemble du tissu.
- Le tissu à union lâche (cellules distantes).

Il existe plusieurs sortes de tissus biologiques (plus de 25 types de tissus) qui sont tous étudiés en histologie [8]. Le tissu épithélial est constitué de cellules étroitement jointes, sans séparation. On appelle tissu conjonctif un tissu composé de cellules séparées par des fibres ou un liquide organique. Les cellules des tissus musculaires ont la capacité de se contracter. Le tissu nerveux permet le transport des informations nerveuses et le fonctionnement organique [7,9].

2.2.1.1. *La structure cellulaire*

La cellule est l'unité de structure fonctionnelle fondamentale de tous les organismes vivants (Figure 2.1), dans cette figure sont montrées et énumérées les différentes composantes d'une cellule. Les cellules interagissent entre elles de façon très coordonnée et elles sont très riches en organites, ces derniers sont les instruments des différentes fonctions cellulaires [9]:

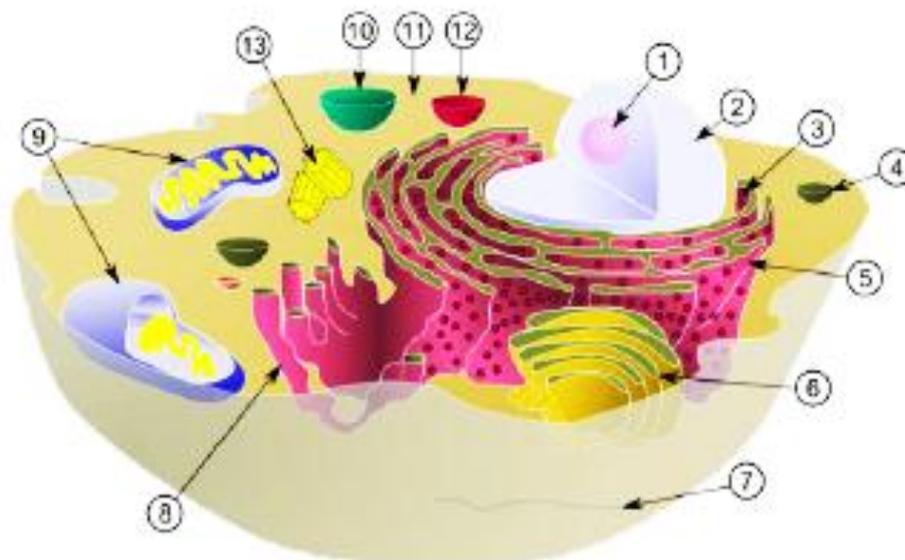


Figure 2.1 : **Structure d'une cellule animale eucaryote typique.**

- (1) Nucléole, (2) Noyau, (3) Ribosome, (4) Vésicule, (5) Réticulum endoplasmique rugueux (granuleux), (6) Appareil de Golgi, (7) Microtubule, (8) Réticulum endoplasmique lisse, (9) Mitochondrie, (10) Lysosome, (11) Cytoplasme, (12) Peroxysome, (13) Centrosome.

2.2.1.2. *Les noyaux des cellules biologiques*

Le noyau est un objet complexe. Son organisation spatiale et son activité biochimique évoluent au cours du temps en fonction de l'état de la cellule [10]. On s'attend à ce que les mouvements de la chromatine engendrés par ces réorganisations, ainsi que la diffusion des complexes protéiques à travers le noyau et les différentes réactions biochimiques provoquent des modifications de l'indice de réfraction du noyau. On espère donc, grâce à des expériences de diffusion de la lumière, obtenir par une mesure physique non invasive et non destructrice, une information relative aux fluctuations de la densité de matière à l'intérieur du noyau. De plus, ces expériences peuvent aussi, nous renseigner sur l'arrangement spatial de la matière. Finalement, les techniques permettent également de suivre l'évolution lors des événements fondamentaux des cellules [11].

Le noyau est composé d'un certains nombres de particules avec différents indices de réfraction.

Les fluctuations de l'indice de réfraction du noyau peuvent provenir de l'évolution biologiques qui modifient la composition [12, 13].

Comme dans toute expérience de diffusion de la lumière, il s'agit de faire passer un faisceau de lumière poly ou monochromatique à travers l'échantillon, composé de particules

diffusantes (noyaux). Un système d'analyse de l'intensité de la lumière diffusée, permet d'évaluer la taille de ces particules [14].

2.2.1.3. Le cancer

Les anomalies de renouvellement des cellules représentent un problème médical majeur et celles qui sont liées aux anomalies de comportement de cellules mutantes sont à la base du développement du cancer [15].

Un organe est composé de cellules, qui sont organisées suivant un plan (les gènes) contenu dans leur noyau. Dans un organe atteint par le cancer, les gènes sont abîmés parfois par un agresseur mais souvent de façon spontanée. Le cancer se caractérise donc par une anomalie du plan d'organisation des cellules qui sont modifiées et ne jouent plus correctement leurs rôles. Ces cellules sont capables de se multiplier rapidement et/ou ne meurent plus, alors que les cellules normales sont programmées pour mourir apoptose [16]. Schématiquement (Figure 2.2), le développement anormal des cellules est illustré en couleur Bleu dans un environnement de développement normal en couleur Marron.

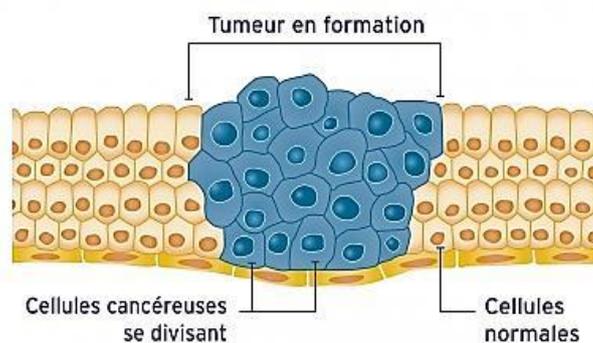


Figure 2.2 : Schéma présentant la manière dont les cellules cancéreuses se multiplient afin de former une tumeur.

2.3. Les propriétés optiques des tissus biologiques

Quand la lumière interagit avec un tissu biologique (Figure 2.3), plusieurs phénomènes sont induits par la micro structuration interne des cellules [1], et cette interaction est fortement dépendante de nombreux paramètres : la taille des particules du milieu biologique comparée à la longueur d'onde, et leurs propriétés optiques (le coefficient de diffusion, le coefficient d'absorption, le coefficient de transmission, la fluctuation d'indice de réfraction, le facteur d'anisotropie et leurs formes, ... etc).

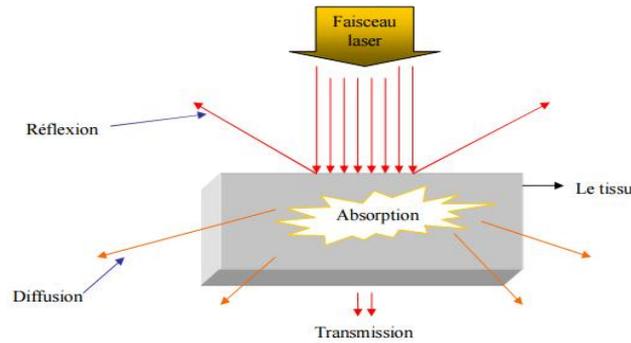


Figure 2.3 : Phénomènes optiques de l'interaction lumière – tissu

2.3.1. L'indice de réfraction

L'indice de réfraction d'un milieu caractérise la vitesse de phase de l'onde électromagnétique de ce milieu.

Les phénomènes physiques de réfraction et réflexion sont accompagnés par le changement de vitesse de la lumière dans les différents environnements physiques du milieu [17]. Ce changement de vitesse est déterminé par un indice de réfraction qui est le rapport entre les vitesses de la lumière dans le milieu : $v(\lambda)$ et dans le vide : c (Eq 2.1)

$$n(\lambda) = \frac{c}{v(\lambda)} \quad (2.1)$$

Une partie de la lumière est donc réfléchi vers le premier milieu et une partie passe dans le deuxième milieu dans des directions définies par la loi de Snell – Descartes [10] :

$$n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin \theta_r \quad (2.2)$$

n_1 et n_2 : Les indices de réfraction de chacun des milieux.

θ_i et θ_r : Les angles d'incidence et de réfraction.

De nombreux milieux, comme les matériaux biologiques, présentent des fluctuations d'indice sur de petites échelles dues à la présence de structures telles que les noyaux ou les mitochondries des cellules, ce qui entraîne une diffusion de la lumière dans toutes les directions [16]. De nombreux chercheurs ont caractérisés les indices de réfractifs des composantes cellulaires.

Le tableau 2.1 donne quelques valeurs d'indice des principaux constituants des tissus biologiques, pour une réflexion à incidence normale avec une interface air ($n_1=1$), tissu biologique ($n_2= 1.4$). Le coefficient de réflexion est $R = 2.8\%$.

Tableau 2.1 : Valeurs moyennes d'indice dans le visible (632.8 nm) [13].

Milieu	Indice de réfraction
Eau	1.33
Protéines	1.60
Lipides	1.46
Cytoplasme	1.37
Membranes	1.46
Noyau	1.39
Mélanine	1.70

2.3.2. L'absorption

Quand les photons se propagent dans les tissus, une partie de leur énergie peut être absorbée par le milieu biologique. Cette partie d'énergie absorbée est ensuite convertie soit en une autre forme d'énergie par l'émission de fluorescence, soit en chaleur. A l'échelle macroscopique, on peut définir le coefficient d'absorption de la façon suivante : à l'intérieur d'un milieu non diffusant, homogène, la variation d'intensité dI d'un faisceau collimaté le long d'un trajet élémentaire dL s'exprime sous la forme [18,19]:

$$dI = -\mu_a IdL \quad (2.3)$$

Où μ_a est le coefficient d'absorption du milieu, exprimé en « cm^{-1} ». L'intégration de l'équation sur une épaisseur L donne la loi d'atténuation de Beer-Lambert :

$$I = I_0 \exp(-\mu_a L) \quad (2.4)$$

Où I_0 est l'intensité incidente et I l'intensité transmise.

Au sein des tissus biologiques, l'hémoglobine et l'eau sont les deux principaux absorbeurs dans la bande des longueurs d'onde UV-Visible-IR. La concentration de ces chromophores détermine l'absorbance des différentes couches tissulaires.

2.3.2.1. Les principaux absorbeurs dans le tissu biologique

a. L'eau

L'eau est le composant principal des tissus biologiques. Elle peut représenter jusqu'à

80% de la masse de certains organes, comme le cerveau [15]. Son absorption devient prépondérante aux longueurs d'onde supérieures à 950 nm et ne peut être négligée dans la partie supérieure de la fenêtre thérapeutique. Il en est de même des lipides qui présentent une absorption importante entre 850 et 950 nm [20]. Souvent négligée dans les appareils de SPIR (La spectrométrie dans le proche infrarouge) (figure 2.4), l'absorption optique de ces deux composants majeurs des tissus peut être à l'origine d'artéfacts lors de mesures de paramètres vasculaires ou être mise à profit pour obtenir des informations tissulaires pertinentes ou constituer des facteurs de contraste en TOD (La Tomographie Optique Diffuse) [17].

b. La mélanine

La mélanine est un pigment responsable de la coloration de plusieurs tissus biologiques. Chez l'homme, la couleur de la peau, des cheveux et des yeux dépendent principalement du type de la mélanine et de sa concentration [21].

Le rôle principal de la mélanine est la protection pigmentaire contre les radiations UV, domaine spectral où son absorption est la plus élevée [22]. Mais son absorption dans le PIR n'est pas nulle et sa présence dans les tissus superficiels peut influencer les mesures.

c. L'hémoglobine

C'est une protéine dont la principale fonction est le transport d'oxygène dans l'organisme humain et chez les autres vertébrés. L'hémoglobine se trouve à l'intérieur des globules rouges du sang ce qui leur confère leur couleur rouge. Elle est présente dans le corps sous deux formes majoritaires, l'oxyhémoglobine et la déoxyhémoglobine. L'hémoglobine permet au sang de transporter plus de dioxygène vers les tissus et les organes, muscles, cerveau, qu'il ne pourrait le faire par simple dissolution de ce gaz [1, 23]. Les spectres d'absorption des deux formes de l'hémoglobine sont présentés sur la figure 2.4,

Pour certains tissus spécifiques, tels que la peau, d'autres types de chromophores (mélanine notamment) sont à l'origine de l'absorption de la lumière dans des bandes spectrales spécifiques. La figure 2.4 présente la variation des coefficients d'extinction de ces différents chromophores de la peau humaine (eau, hémoglobine, mélanine) en fonction de la longueur d'onde dans la bande 300–1000 nm [17], dans ce spectre, la zone qui concerne l'étude est représentée en Rose et appelée « Fenêtre thérapeutique » qui s'étale sur un intervalle allant du 600 nm à 900 nm.

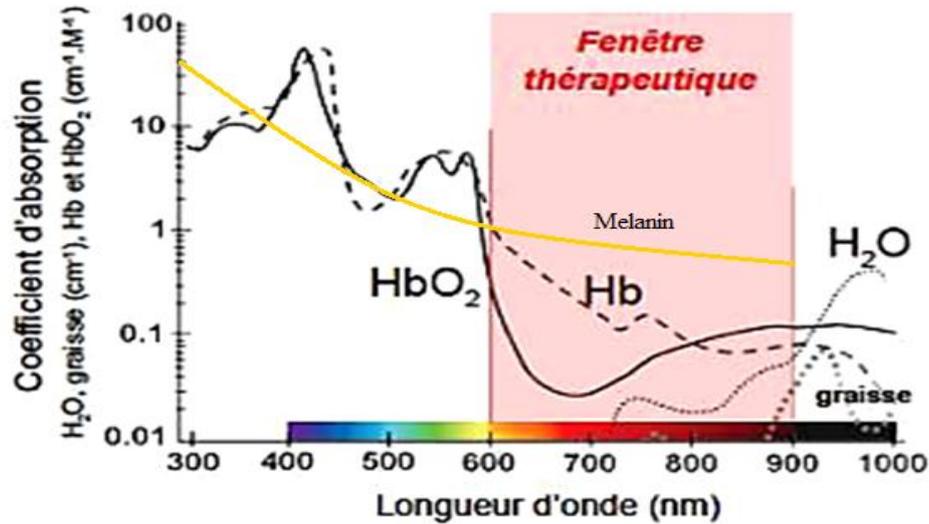


Figure 2.4 : Coefficients d'extinction en fonction de la longueur d'onde pour les principaux chromophores de la peau : hémoglobine, eau, mélanine [17]

Hb : Hémoglobine désoxygénée, **HbO₂** : Hémoglobine oxygénée, **H₂O** : Eau

2.3.3. Le facteur d'anisotropie

Comme son nom l'indique, le facteur d'anisotropie (g) décrit l'anisotropie de la diffusion, il correspond à la moyenne du cosinus de l'angle de diffusion. L'angle de diffusion est l'angle formé par les vecteurs directeurs \mathbf{u} et \mathbf{u}' . Nous avons ainsi [24] :

$$g = \langle \cos \theta \rangle = \langle \mathbf{u}, \mathbf{u}' \rangle = \frac{1}{4\pi} \int p_v(\mathbf{u}, \mathbf{u}') \mathbf{u} \cdot \mathbf{u}' d\Omega' \quad (2.5)$$

En règle générale, lorsque $g \rightarrow 0$, la diffusion est isotrope, et lorsque $g \rightarrow 1$, la diffusion est orientée vers l'avant. Il est également possible d'avoir des facteurs d'anisotropie négatifs, dans le cas où $g \rightarrow -1$, la diffusion est orientée vers l'arrière [25]. Cela ne sera toutefois possible qu'avec des diffuseurs de structure complexe et en particulier non sphériques.

2.3.4. Coefficient de diffusion

La probabilité de subir un événement de diffusion est donnée par :

$$P_{diff} = 1 - \exp(-\mu_s L) \quad (2.6)$$

Où μ_s : Coefficient de diffusion et L : Longueur parcourue.

2.3.5. Le coefficient d'Extinction

Les phénomènes d'absorption et de diffusion sont décrits à l'aide du même formalisme. Pour cette raison, nous les regroupons souvent sous une appellation commune : l'extinction. Le coefficient d'extinction est ainsi défini par [20].

$$\text{Extinction} = \text{Absorption} + \text{Diffusion}. \quad \rightarrow \quad \mu_{ex} = \mu_a + \mu_s \quad (2.7)$$

2.4. Protocoles de préparation des échantillons pour les expériences de diffusion de la lumière

2.4.1. Objectif du travail

Dans ce chapitre nous avons étudié le phénomène de la diffusion de la lumière par des milieux biologiques.

La technique optique appliquée est celle basée sur la diffusion de la lumière, l'objectif étant de déterminer la taille et la forme des particules diffusantes, ces particules (noyaux) qui constituent l'essentiel des cellules.

2.4.2. Choix du milieu diffusant :

Dans notre travail, le milieu d'étude est formé de cellules biologiques, avec des particules diffusantes (noyaux), leurs tailles sont données par plusieurs travaux [26, 27]. Ces tailles sont susceptibles d'être modélisée par la théorie de Mie.

Les échantillons sont préparés au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique (C.H.U Sétif-Algérie).

Nos échantillons ont été réalisés suivant une technique spéciale. Cette dernière comporte les étapes suivantes :

Les coupes histologiques sont enlevées par une méthode de chirurgie (biopsie, autopsie ... etc) (figure 2.5.A) puis ils sont préparées au niveau du service d'Anatomie Pathologique.

Pour la conservation des structures et le durcissement des pièces, nous devons fixer immédiatement la pièce juste après le prélèvement par immersion du matériel dans un grand volume de liquide fixateur (Figure 2.5.B). Le liquide fixateur utilisé est le formol. La

durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements (de quelques heures pour un petit fragment biopsique à plusieurs semaines pour un cerveau humain entier) [28].



Figure 2.5 : Fixation des échantillons (liquide de Formol à 10%)

Note : pour les petits fragments nous ajoutons au formol un peu d'éosine pour les rendre visibles.

2.4.2.1. L'étude macroscopique

L'examen macroscopique détaillé est une partie essentielle de l'étude d'une pièce opératoire (Figure 2.6) : la pièce est mesurée (Figure 2.6.A), examinée (Figure 2.6.B), pesée puis disséquée (Figure 2.6.C). Afin d'éviter l'altération des cellules par autolyse, la fixation, la cytocentrifugation et la coloration doivent être effectuées rapidement après l'obtention du prélèvement [29].

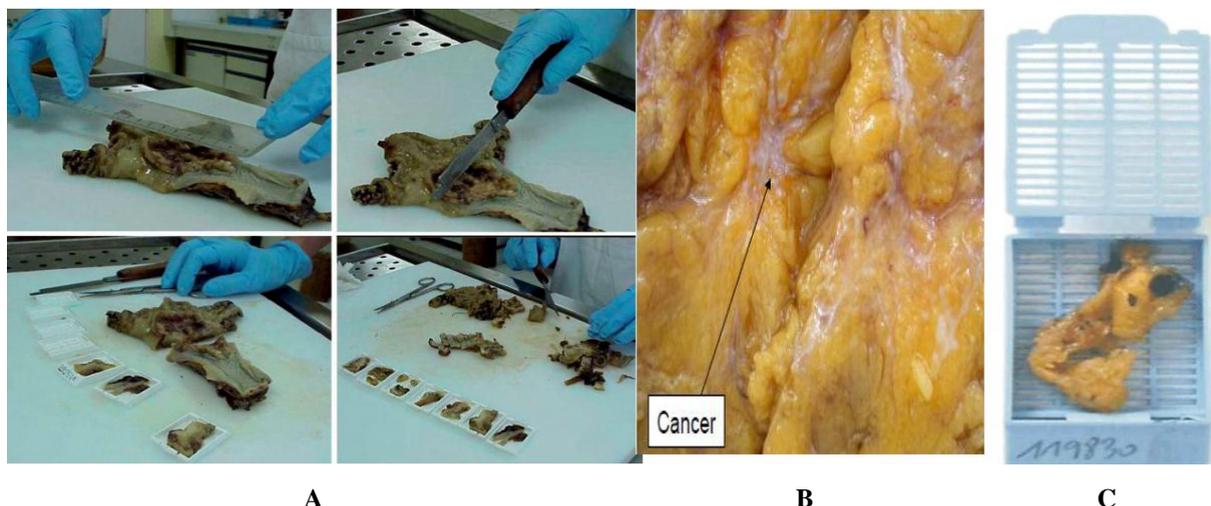


Figure 2.6: Les étapes de l'étude macroscopique des prélèvements

A : Mesure et dissection d'une pièce fixée dans le formol.

B : Sélection des prélèvements destinés à l'étude.

C : Mettre les parties sélectionnées dans des cassettes en plastique.

Après le choix des prélèvements destinés à l'analyse microscopique (Figure 2.6.C), les restes de la pièce opératoire sont conservés pendant quelques jours ou semaines afin de pouvoir, en cas de nécessité, effectuer des prélèvements complémentaires [28].

Pour pouvoir examiner les cellules, des techniques de découpe en fines couches et de coloration sont mises en œuvre.

2.4.2.2. La fixation :

L'automate à inclusion comporte [30] (Figure 2.7 ; Figure 2.8):

- ✓ 7 volumes d'éthanol (10h) : Pour absorber l'eau existant dans les tissus.
- ✓ 3 volumes de l'xylène (5h) : Pour absorber et remplacer l'éthanol.
- ✓ 2 volumes de paraffine (3h) : Le tissu deviendra un peu dur en absorbant de la paraffine.



Figure 2.7 : Automate à inclusion

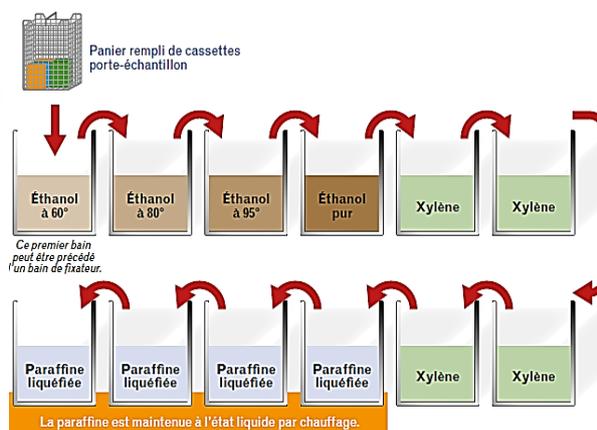


Figure 2.8 : Processus d'imprégnation

2.4.2.3. L'inclusion

Après l'étape d'examen macroscopique au cours de laquelle sont prélevés des fragments de petites tailles (en moyenne 2 x 0,3 cm), les tissus contenus dans les cassettes sont déshydratés par passage dans l'alcool, ce dernier est éliminé par des solvants (xylène),

Les tissus sont imprégnés dans la paraffine liquide à 60°C (Figure 2.9 A et B), puis ils refroidissent. Ces étapes sont automatisées dans des appareils à inclusion [31]. L'étape finale de l'inclusion est manuelle et consiste à réorienter convenablement le fragment tissulaire dans le sens de la coupe dans un moule de paraffine (Figure 2.10.C).



Figure 2.9 : **Inclusion manuelle du tissu dans un moule de paraffine puis Refroidissement des cassettes.**

2.4.2.4. Les coupes

Le bloc solide de paraffine (Figures 2.10 et 2.11) contenant le tissu est coupé en fins rubans grâce à deux microtomes, le premier est appelé microtome dégrossisseur de 10 μ m de pas, il est utilisé pour but d'enlever la couche de paraffine qui couvre le tissu et l'autre microtome est réglé à un pas de 3 μ m d'épaisseur (Figure 2.12). Les coupes sont étalées par la suite sur des lames (Figure 2.13), ces dernières sont séchées afin d'assurer une bonne adhésion des tissus avant coloration [32].



Figure 2.10 : **Enlèvement du moule**



Figure 2.11 : **Dégrossissage par le premier microtome**



Figure 2.12 : **Découpage en fins rubans (3 μ m).**



Figure 2.13 : **Etalement du ruban sur une lame en utilisant l'eau (40°C) pour éviter la création des bulles d'air.**

2.4.2.5. La coloration

Les échantillons sont colorés pour distinguer les différentes coupes tissulaires (Figure 2.14), Les colorations de routine utilisent un (Hématéine) ou deux colorants différents: l'Hématéine- Eosine (H.E.) associé à l'hématéine qui colore les noyaux en violet et l'éosine colore les cytoplasmes en rose [29]. Les colorations tri chromiques usuelles sont l'Hématéine-Eosine-Safran (H.E.S.), par ajout de Safran nous obtenons une couleur jaune des fibres de collagène.



Figure 2.14: **Appareil à coloration automatique des lames**

En utilisant la méthode de l'hématéine éosine, la coloration suit les étapes suivantes (Figure 2.14) :

- ✓ Déparaffiner les échantillons par du xylène pour que les colorants puissent y pénétrer.
- ✓ Les coupes passent dans un bain de l'xylène pendant 10 minutes.
- ✓ La réhydratation des coupes se fait par passage dans un bain d'éthanol pendant 10 minutes puis hydrater les lames par l'eau du robinet.
- ✓ Immerger la coupe dans un bain d'hématéine (10 minutes) qui colore en Bleu Violacé les structures basophiles (noyaux cellulaires).
- ✓ Rincer à l'eau courante.
- ✓ Le deuxième colorant utilisé est l'éosine qui colore en Rose les structures acidophiles (cytoplasmes cellulaire).
- ✓ Rincer à l'eau courante.

Note : Cette coloration permet le diagnostic de la grande majorité des lésions tumorales et non tumorales mais parfois l'état et la nature des échantillons nécessite des analyses spécialisées (colorations spéciales, immunohistochimie).

2.4.2.6. *Le montage*

Après avoir subi une déshydratation (par bains d'alcool de degré croissant puis bains de toluène), les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre, Figure 2.15, où est montrée un assortiment d'échantillons colorés en Rouge. Nous disposons alors d'une « préparation microscopique » (simplement appelée « lame » dans le langage courant) prête à être observée au microscope optique [33].



Figure 2.15 : **Lames finies**

2.4.2.7. *L'étude microscopique*

Cette étape nous permet de prendre des micrographies caractérisant la structure et la morphologie des différentes parties de tissu et de définir s'il s'agit : d'une tumeur ou non, d'une tumeur maligne (cancer) ou non et de le classer (Figure 2.16). Cette étape permet au pathologiste d'observer différents aspects des cellules [32]:

- ✓ Taille, forme et structure (morphologie) de la cellule.
- ✓ La surface du tissu normal par rapport au tumoral.
- ✓ Le grade et l'étendue de la propagation (stade).

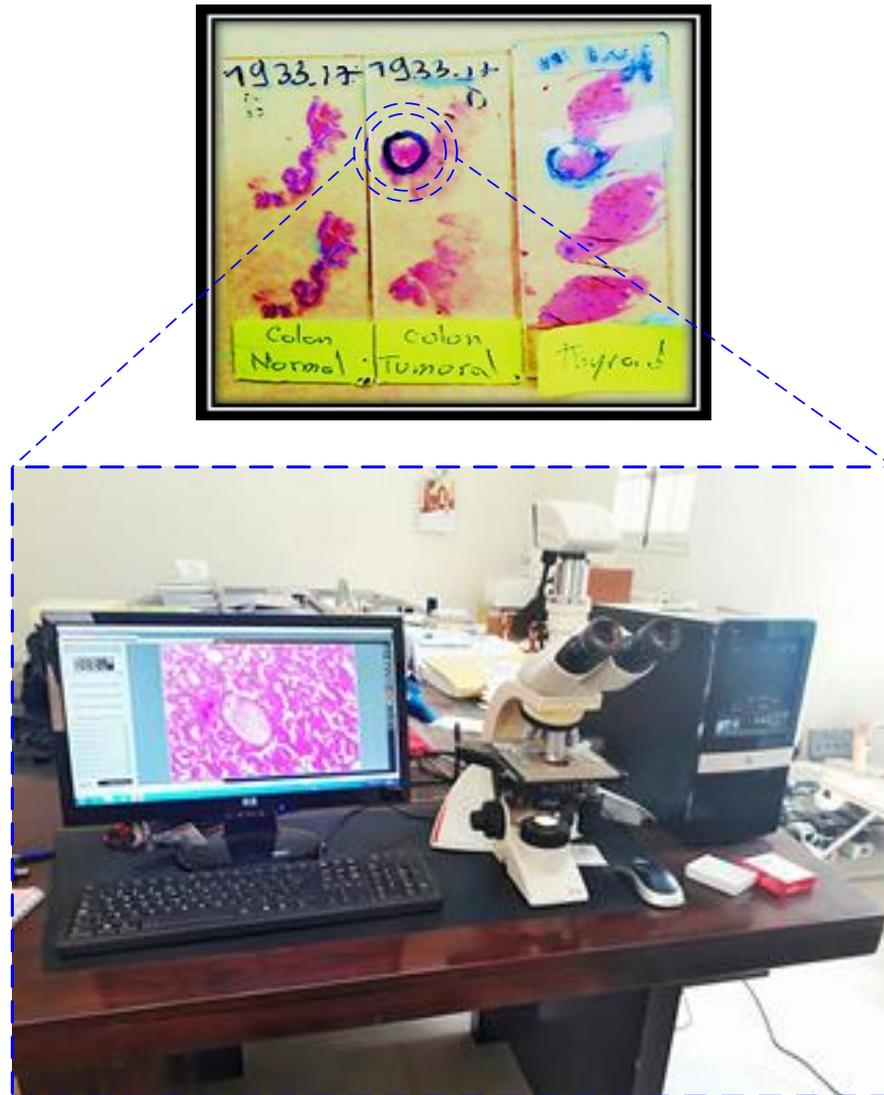


Figure 2.16 : Microscopie pour l'étude histologique

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Wax. A, Backman. V., *Biomedical Applications of Light Scattering*, McGraw-Hill, 2010.
- [2] Gerard. L.C, Li. H, Wang. V, Sohi. R., *Introduction to Biomedical Engineering*, Biomedical, Engineering 2005, Second Edition, 977-1043.
- [3] Ceolato. R et al., Light-scattering by aggregates of tumor cells: Spectral, polarimetric, and angular measurements, *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer* 146, 2014, 207-213.
- [4] Mario. D. L et al., Opto-chemical and laser properties of FLTX1, a novel fluorescent tamoxifen derivative, and its potential applications in breast cancer photodynamic chemotherapy, *Optical Materials*, Vol 84, 2018, 442-446.
- [5] Seung. H., Local-dependency of morphological and optical properties between breast cancer cell lines, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Vol 205, 2018, 132-138.
- [6] Ke. S, Gong. W, and Sheppard. C. R., Model for light scattering in biological tissue and cells based on random rough nonspherical particles, *Applied Optics*, vol 48 (2009), pp. 1153-1157.
- [7] Hollern. D. P et al., Histological subtypes of mouse mammary tumors reveal conserved relationships to human cancers, *PLoS Genetics*, vol 14 (2018).
- [8] Matthew. N. M., Histologic heterogeneity of triple negative breast cancer: A National Cancer Centre Database analysis, *European Journal of Cancer*, Vol 98, (2018), pp.48-58
- [9] Magbanua. M, Jesus. M, Park. J. W., Isolation and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer International Publishing, vol 994, (2018).
- [10] Abney. J. R et al., Chromatin dynamics in interphase nuclei and its implications for nuclear structure. *Journal of Cell Biology*, vol 137 (1997), pp.1459–1468.
- [11] Olivier. D. W et al., Molecular and pathological signatures of epithelial–mesenchymal transitions at the cancer invasion front, *Histochemistry and Cell Biology*, vol 130, (2008).
- [12] Romain. C., Light-scattering by aggregates of tumor cells: Spectral, polarimetric, and angular measurements, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, vol

146, (2014), pp. 207-213.

[13] B. Heinrich, L. Alfred., Simultaneous determination of particle size and refractive index by time-resolved Mie scattering, *Optik*, vol 121, (2010), pp. 1815–1823.

[14] Webster. J.G, Russell. R, Slavik. T, and Kwan. H. N., *Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues*, CRS Press, (2009).

[15] Péry, E., *Spectroscopie bimodale en diffusion élastique et auto-fluorescence résolue spatialement : instrumentation, modélisation des interactions lumière-tissus et application à la caractérisation de tissus biologiques ex vivo et in vivo pour la détection de cancer*, Thèse de doctorat, Université de Nancy, (2007).

[16] Srinivas. S. P et al., Measurement of rapid changes in cell volume by forward light scattering. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, vol 447, (2003), pp. 97-108.

[17] Steven. L. J., Corrigendum: Optical properties of biological tissues, *Phys. Med. Biol.* 58 (2013), pp. 5007–5008.

[18] Shamaraz. F, Shahzad. A., Noninvasive optical diagnostic of breast cancer using depolarization of light, *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*, vol 127, (2016), pp. 3035-3038.

[19] Suissa. M., *Dynamique interne du noyau d'une cellule vivante: étude par Diffusion dynamique de la lumière*, Lyon, Thèse de Doctorat (2006), pp.2-3.

[20] Helmuth. H., Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles: Historic developments and basics; *Le journal du Spectroscopie quantitative et Transfert radiative*, vol 110, 2009, pp.793-794.

[21] Felista. L.T., Dataset on the role of endoglin expression on melanin production in murine melanoma and on the influence of melanin on optical imaging, *Data in Brief*, vol 20, 2018, 1048-1052.

[22] Hyunsuk. S et al., Elastic Light-Scattering Spectroscopy for Discrimination of Benign from Malignant Disease in Thyroid Nodules, *Annals of surgical oncology*, vol 18, (2011), pp. 1300-1305.

[23] Pagano. P. C et al., Identification of a human airway epithelial cell subpopulation with altered biophysical, molecular, and metastatic properties, *Cancer Prevention Research*, vol 07,

(2017).

[24] Yang. P et al., Investigation of scattering coefficients and anisotropy factors of human cancerous and normal prostate tissues using Mie theory, Proc. of SPIE, vol 8941, (2014).

[25] Manash. J. B, Gazi. A. A., Visible light scattering properties of irregularly shaped silica microparticles using laser based laboratory simulations for remote sensing and medical applications, Laser Physics, vol 28, (2018).

[26] Tao. T. W et al., Unified Mie and fractal scattering by biological cells and subcellular structures, OPTICS LETTERS, vol 32, (2007).

[27] Chorfi. H, Ayadi. K, Vers la Biopsie Optique, éditions universitaires européennes (2017).

[28] FMPMC-PS@ [2015], Histologie: les tissus, <http://www.chups.Jussieu.fr/polys/histo/histoP1/methods.html>.

[29] Unf3s @ [2014], Moyens et objectifs de l'anatomie pathologique en médecine. http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath_1/site/html/.

[30] Canadian Cancer Society @ [2012], Études des cellules et des tissus, <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/diagnosis-and-treatment/tests-and-procedures/cell-and-tissue-studies/?region=qc>.

[31] MicrOscOpies @ [2014], Coupes a la paraffine, <http://www.microscopies.com/DOSSIERS/PRATIQUES/TPM-3/COUPARAF.html>

[32] Techniques standards d'anatomie pathologique @ [2015], Oncoprof, http://www.oncoprof.net/Generale2000/g04_Diagnostic/Histologie/Technique-texte/dg_ap_tech01.html.

[33] Manuel de prélèvement des échantillons primaires, Ref : IJB-AQ-MQ002-v11, Version : 11, Application : 27-01-2016.

Chapitre 03

CALCUL DE DIFFUSION DE LA LUMIERE

3.1. Introduction

La diffusion de lumière est une technique précieuse pour l'expérimentateur, car elle livre de nombreux renseignements sur le milieu qu'elle a traversé [1,2]. A partir des résultats de diffusion, il est possible de déterminer les dimensions et la forme des macromolécules [3].

La connaissance des propriétés optiques de l'échantillon est d'une grande importance pour l'interprétation et la quantification des données diagnostiques, et pour la prévision de la distribution de l'énergie absorbée pour l'usage thérapeutique et chirurgical [4].

La diffusion optique est générée par les particules ayant des indices de réfraction différents. La description de la particule peut être approximée par la théorie de Mie [5], elle constitue une référence incontournable dans l'étude de la diffusion. Car elle permet de décrire rigoureusement l'interaction lumière-matière dans le cadre de la théorie classique de l'électromagnétisme et de l'optique linéaire [6].

En utilisant la théorie de l'électromagnétisme générale de Maxwell, Gustav Mie fut le premier à résoudre le problème de l'interaction de la lumière avec une particule sphérique. Il a ainsi comblé le vide qui existait entre la théorie de Rayleigh et l'optique géométrique [7].

La théorie de Mie donne une solution rigoureuse au problème de la diffusion d'une onde plane sur une particule. Cette théorie repose sur plusieurs hypothèses :

- Les particules sont sphériques.
- Sans perte d'énergie (diffusion élastique).
- Les particules sont constituées d'un matériau homogène.
- Les particules sont isolées spatialement (il n'y a pas de diffusion multiple).

3.2. La théorie de Mie

3.2.1. Modèle mathématique de la théorie de Mie

L'expression de l'intensité diffusée en fonction de l'angle d'observation à une distance de l'échantillon diffusant [R est la distance entre l'échantillon et le capteur] est donnée par [8,9]:

$$I_{\theta} = \frac{\lambda^2}{8\pi^2 R^2} (i_1 + i_2) \quad (3.1)$$

Avec :

$$i_1 = \left| \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \{a_n \pi_n + b_n \tau_n\} \right|^2 \quad (3.2)$$

$$i_2 = \left| \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \{b_n \pi_n + a_n \tau_n\} \right|^2 \quad (3.3)$$

π_n et τ_n les fonctions des polynômes de Legendre.

Les coefficients complexes a_n et b_n apparaissent dans la résolution de Mie lors de la prise en compte des conditions aux limites et ils sont de la forme :

$$a_n = \frac{S'_n(\beta)S_n(\alpha) - mS'_n(\alpha)S_n(\beta)}{S'_n(\beta)\Phi_n(\alpha) - m\Phi'_n(\alpha)S_n(\beta)} \quad (3.4)$$

$$b_n = \frac{mS'_n(\beta)S_n(\alpha) - S'_n(\alpha)S_n(\beta)}{mS'_n(\beta)\Phi_n(\alpha) - \Phi'_n(\alpha)S_n(\beta)} \quad (3.5)$$

Et :

$$\alpha = 2\pi a / \lambda \quad \beta = m\alpha \quad m = \mu_2 / \mu_1 \quad \lambda = \lambda_0 / \mu_1 \quad (3.6)$$

Avec:

α : Taille de particule adimensionnée ;

a : Le rayon de la particule ;

μ_1 et μ_2 sont respectivement les indices de réfractons du milieu et de la particule [10, 11];

λ et λ_0 sont respectivement la longueur d'onde dans le milieu et à l'intérieur de la particule.

S_n et Φ_n sont les fonctions de Ricatti-Bessel définies classiquement à partir des fonctions de Bessel $J_{n+1/2}$ et $N_{n+1/2}$ qui interviennent lors de la résolution de l'équation différentielle radiale; S'_n et Φ'_n sont les dérivées respectives de S_n et Φ_n .

$$S_n(\alpha) = \sqrt{\frac{\pi\alpha}{2}} J_{n+1/2}(\alpha) \quad c_n(\alpha) = (-1)^n \sqrt{\frac{\pi\alpha}{2}} J_{-(n+1/2)}(\alpha) \quad \Phi_n(\alpha) = S_n(\alpha) + iC_n(\alpha) \quad (3.7)$$

$$\pi_n = \frac{1}{\sin \theta} P_n^{(1)}(\cos \theta) \quad \tau_n = \frac{\partial}{\partial \theta} P_n^{(1)}(\cos \theta) \quad (3.8)$$

3.3. L'importance de l'étude des signaux diffusés

L'interaction lumière-matière est à l'origine de la grande partie des phénomènes électriques, magnétiques, optiques et chimiques observables dans notre environnement proche. Elle est divisée en sous-familles dont les principales sont la réflexion, la réfraction, la diffraction et la diffusion (Figure 3.1) [4, 7]. Suivant la loi de conservation de l'énergie, nous avons :

La transmission directe + réflexion spéculaire + la diffusion directe + la rétrodiffusion + la diffraction + l'absorption + ... = 1.

La figure 3.1 schématise les interactions entre le faisceau lumineux incident et l'échantillon, dont le détecteur utilisé aux spectrophotometres est capable de capter seulement les signaux transmis dans la région paraxiale, et les signaux diffusés par les hétérogénéités présentes dans le volume de l'échantillon seront perdus.

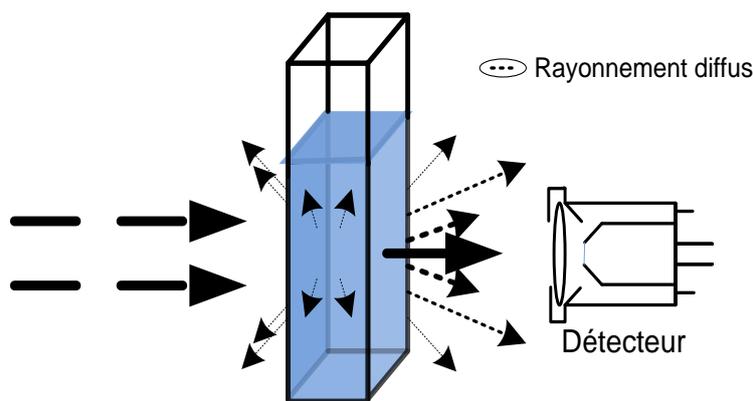


Figure 3.1: Schéma des interactions entre le faisceau lumineux incident et l'échantillon.

La diffusion de rayonnement est le processus physique qui permet à une particule matérielle de faire changer de trajectoire est d'énergie a une onde électromagnétique, des cas de réémission d'énergie peuvent aussi contribuer [12, 13]. Les caractéristiques de l'onde diffusée (intensité, fréquence, polarisation...) sont déterminées par la taille et la forme des particules diffusantes, ainsi que par les interactions qui existent entre ces particules. Lorsque la fréquence de l'onde diffusée est identique à celle de l'onde incidente et les tailles des diffuseurs sont très petites par rapport la longueur d'onde incidente, la diffusion est dite élastique (diffusion Rayleigh) et elle devient inélastique dans le cas contraire (diffusions Raman et Brillouin) [14, 15]. Dans cette étude, nous nous intéressons au processus élastique où les tailles sont de l'ordre de la longueur d'onde (Diffusion de Mie).

La répartition de la lumière diffusée par une particule sous un angle quelconque avec le rayonnement incident est donnée par la figure 3.2 [5, 16] :

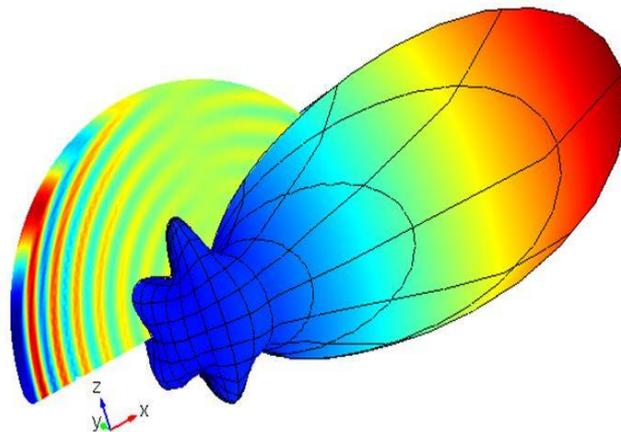


Figure 3.2: **Vue en 3D représente la diffusion de Mie par une particule pseudo-sphérique, qui montre la propagation de la majorité du rayonnement diffus vers l'avant (scattering Comsol).**

3.4. Diffusion spectrophotométrique appliquée à la biologie

3.4.1. Introduction

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer la transmittance, la réflectance ou l'absorbance d'une substance chimique donnée. Elle est basée sur la loi de Beer-Lambert qui est une relation empirique reliant l'atténuation de la lumière aux propriétés du milieu qu'elle traverse et à l'épaisseur traversée [13]. En parlant

de la spectrophotométrie et la conservation de l'énergie, une quantité de la lumière est souvent perdue par diffusion de la lumière et d'autres phénomènes puisque le seul signal capté par les détecteurs optiques utilisés est celui de l'intensité transmise [17].

3.4.2. Limite de la loi de Beer-Lambert-Bouger

Nous appliquons cette loi souvent pour des radiations monochromatiques, et sa validité est acceptable lorsqu'on travaille avec des solutions diluées (elle est limitée à "dilution infinie et interactions nulles") [15, 18]. Lorsque la concentration des solutions à mesurer s'élève trop les propriétés des molécules sont modifiées (le soluté devient peu à peu solvant, les molécules sont statistiquement très proches et la loi de Beer-Lambert n'est plus respectée (Figure 3.3).

Cette loi est donnée par :

$$I_x = I_0 \cdot e^{-C \cdot \sigma \cdot x} \quad (3.9)$$

Où: C : est le nombre de particules par unité de volume.
 σ : est la section efficace d'absorption (surface effective d'interaction entre l'onde et la particule).

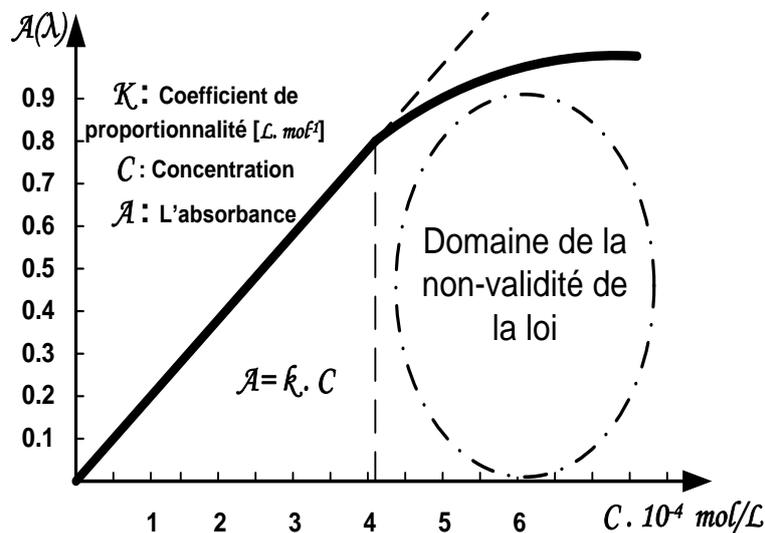


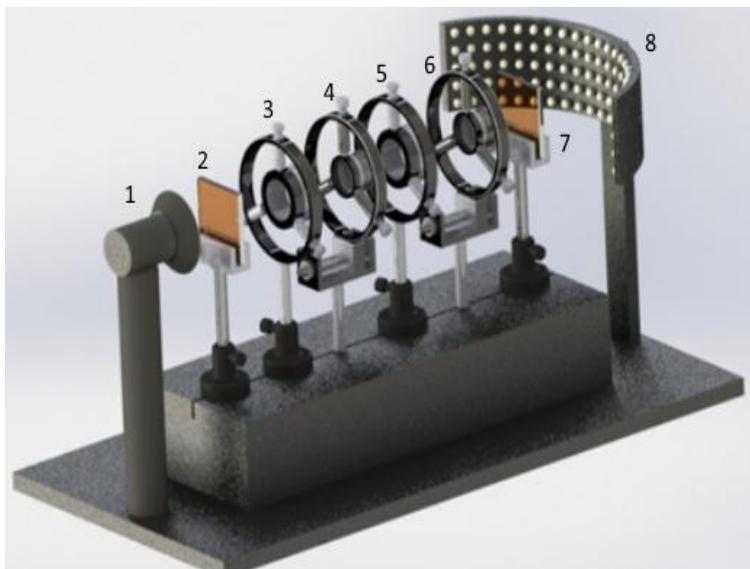
Figure 3.3: Représentation graphique du domaine de validité de la loi de Beer-Lambert-Bouger

3.5. Etude préliminaire des signaux diffusés

Le montage expérimental utilisé pour la détection de l'intensité diffusée est illustré dans la figure 3.4, nous avons travaillé sur des lames de verres contenant des coupes histologiques.

Le montage comporte :

- 1- Une Source de lumière polychromatique pour exploiter un spectre plus large.
- 2- Un filtre interférentiel pour sélectionner la bande passante.
- 3- Les lentilles 3 et 5 plus le diaphragme 4 constituent un montage optique de Köhler pour obtenir un faisceau parallèle exploitable.
- 4- Le diaphragme de champ 6, sert à diminuer la taille du faisceau pour toucher une zone considérée comme uniforme, homogène et isotrope.
- 5- L'échantillon 7 est une coupe histologique de $3\ \mu\text{m}$ d'un organe humain déposée sur un substrat en verre.
- 6- Le détecteur hémisphérique composé d'un nombre de capteurs qui tapissent la surface, permet de capter les signaux diffusés par l'échantillon.



- 1- Source de lumière blanche à Xénon.
- 2- filtre interférentiel / polariseur.
- 3- Lentille de focale $f'=110\text{mm}$.
- 4- Diaphragme d'ouverture.
- 5- Lentille de focale $f'=100\text{mm}$
- 6- Diaphragme de champ
- 7- Echantillon.
- 8- Détecteur hémisphérique

Figure 3.4 : Le montage expérimental

3.5.1. Analyse des résultats

L'échantillon étudié « Une coupe histologique du Colon », caractérisée par des noyaux de formes pseudo-sphériques ayant une taille moyenne égale à $5.3 \mu\text{m}$, cette valeur est incluse dans le régime de la diffusion de Mie qui est applicable sur une large gamme de tailles.

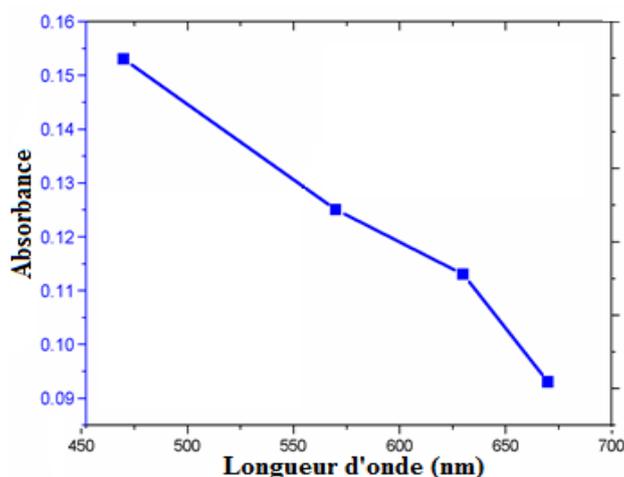


Figure 3.5: Courbes d'absorbance et de transmittance de notre échantillon.

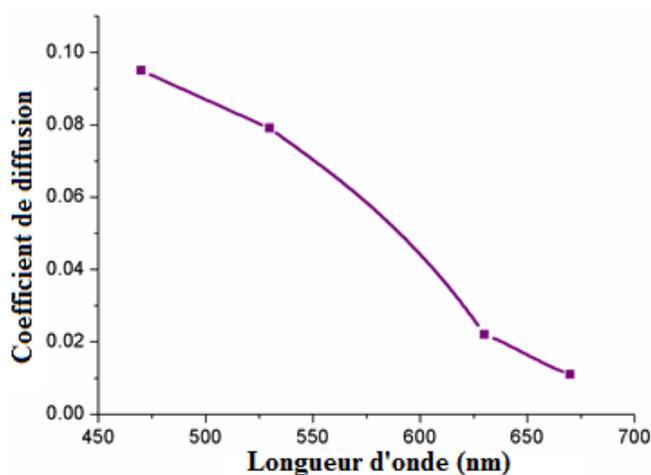


Figure 3.6 : Variation de La diffusion par notre échantillon en fonction de la longueur d'onde.

D'après la courbe d'absorbance obtenue par un spectrophotomètre mono-faisceau (Figure 3.5), nous remarquons que, l'allure de la courbe est décroissante en fonction de la longueur d'onde, phénomène classique dans les milieux biologiques car ils absorbent plus dans les petites longueurs d'onde.

La figure 3.6 montre la courbe de diffusion en fonction de longueur d'onde déterminée

grâce à un dispositif de diffusion sans considération des faisceaux spéculaires, la décroissance de la courbe en fonction de la longueur d'onde peut être attribuée à la taille du diffuseur comparée à la longueur d'onde

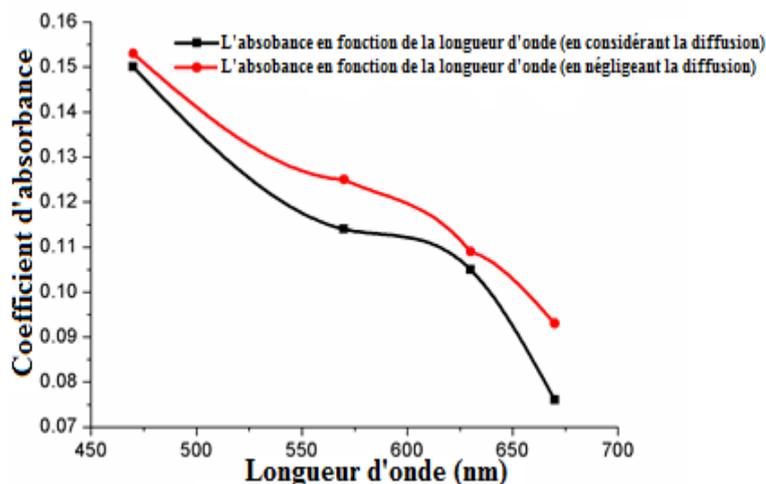


Figure 3.7: **Comparaison entre l'absorbance avec et sans considération de la diffusion.**

Les courbes d'absorption et de diffusion sont réunies dans la (Figure 3.7), nous remarquons le même comportement vis-à-vis de la longueur d'onde, la somme des deux constituent les pertes caractéristiques dépendant des paramètres de taille et de composition des particules diffusantes.

En prenant en compte la composante diffuse de l'intensité transmise, la nouvelle courbe d'absorbance diffère de la courbe résultante à partir des valeurs de transmission mesurées à la région paraxiale où les intensités diffusées sont négligées (Figure 3.7).

Ce résultat montre clairement que l'intégration des données de la lumière diffusée est importante afin d'extraire des informations optiques plus logiques et plus précises quel que soit le type de matériau et sa puissance de diffusion.

Cette valeur ajoutée influe de façon directe sur la transmittance et par conséquent, l'absorbance et la réflexion de l'échantillon.

3.5.2. L'utilisation de la polarisation

Nous avons fait des mesures en utilisant une lumière polarisée parallèlement (P) et perpendiculairement (S), en fonction de l'angle d'observation et la longueur d'onde (Figure 3.8) :

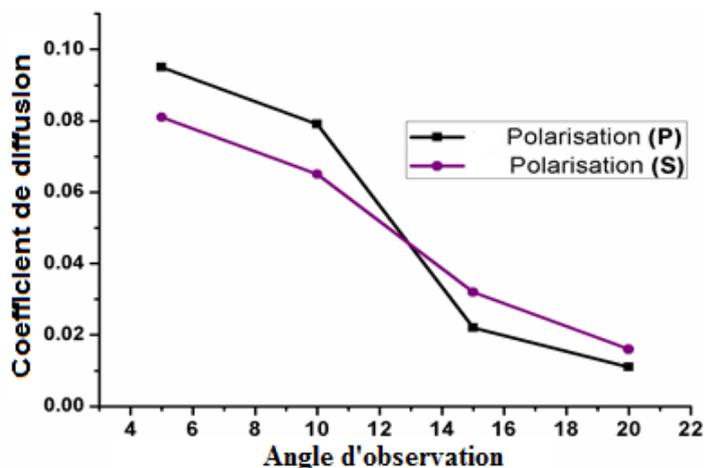


Figure 3.8: Effet de la polarisation sur la distribution de l'intensité diffusée, en utilisant une lumière monochromatique de longueur d'onde 530 nm.

Pour pouvoir mieux interpréter les résultats obtenus, nous avons calculé l'intégrale de chaque courbe de diffusion. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 3.1 :

Tableau 3.1 : Représentation des aires des courbes de diffusion pour différentes longueurs d'onde visible par une couche tissulaire d'un Colon.

	$\lambda= 530 \text{ nm}$	$\lambda= 630 \text{ nm}$
Polarisation (P)	1.753	0.957
Polarisation (S)	1.154	1.215

D'après les courbes expérimentales obtenues (Figure 3.8), nous remarquons que l'intégrale de courbe dans le cas où la polarisation est parallèle est plus importante que dans le cas où elle est perpendiculaire. Cette réponse nous donne une idée sur la morphologie des diffuseurs.

Les méthodes de spectrophotométrie actuelles peuvent être améliorées en ajoutant aux modèles utilisés les théories électromagnétiques de diffusion de lumière.

3.6. Méthodes d'analyse des signaux

Les méthodes d'analyse des signaux diffusés par les différents types des capteurs optiques sont basées sur la mesure de l'atténuation de la lumière incidente en fonction de la distance entre la source et le détecteur [16]. Les courbes de réflectance enregistrées sont alors analysées à l'aide d'un modèle simulant la propagation des photons dans les tissus afin d'en déduire les valeurs des intensités de diffusion et d'absorption.

Une autre méthode consiste à mesurer la dépendance angulaire de la lumière diffusée, c'est-à-dire la fonction de phase à l'aide d'un goniomètre, dont l'éclairage de l'échantillon est réalisé à l'aide d'une lumière monochromatique. La lumière diffusée est mesurée en fonction de l'angle par un photomultiplicateur en rotation autour de l'échantillon [17, 18]. A partir de la fonction de phase, le coefficient d'anisotropie g est calculé.

L'ensemble des techniques expérimentales mises en œuvre pour sonder les tissus biologiques nécessite l'utilisation des modèles mathématiques capables d'exprimer des paramètres physico-chimiques par des paramètres mesurables tel que la diffusion.

3.7. Algorithme de phénomène

La théorie de Mie consiste à la résolution exacte de la diffusion d'une onde plane électromagnétique par une particule sphérique [8, 10], homogène et optiquement isotrope. Si l'on fournit :

- L'indice de la particule : μ_2
- L'indice du milieu : μ_1
- Le rayon de la particule : a
- La longueur d'onde de l'onde incidente dans le milieu : λ

L'ajout de ces paramètres nous permet de déterminer la distribution angulaire et spectrale des intensités diffusées par les particules.

Notre objectif est de faire collecter (angulairement et spectralement) les intensités diffusées par les échantillons afin de calculer les tailles moyennes des microparticules.

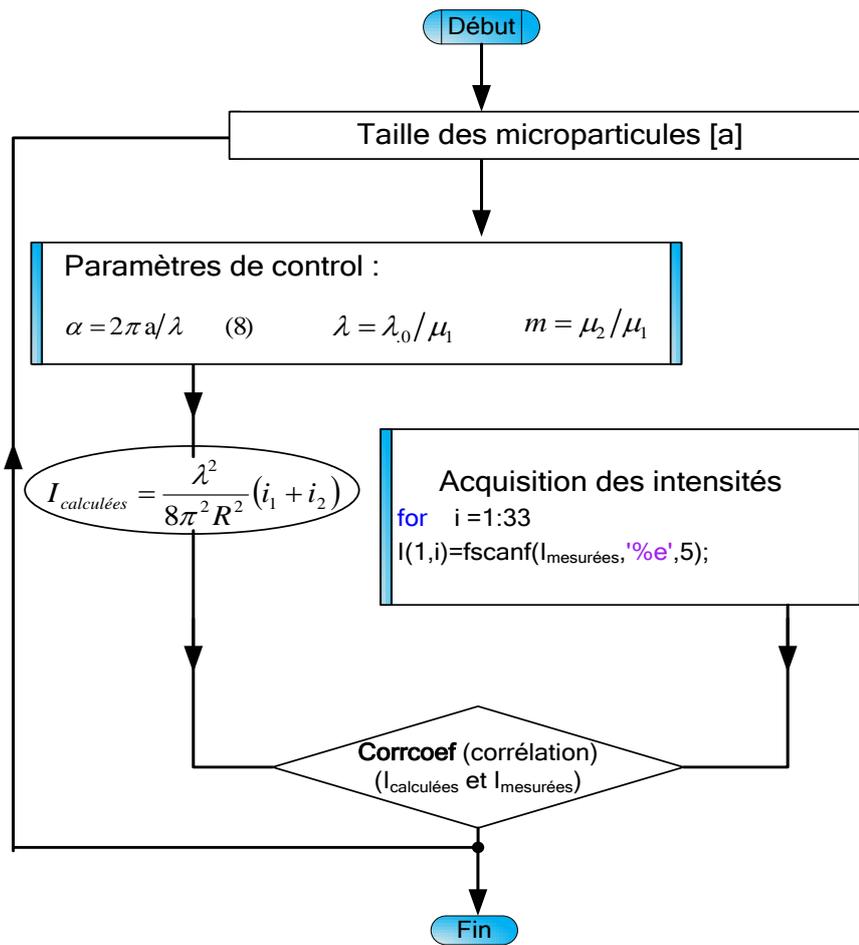
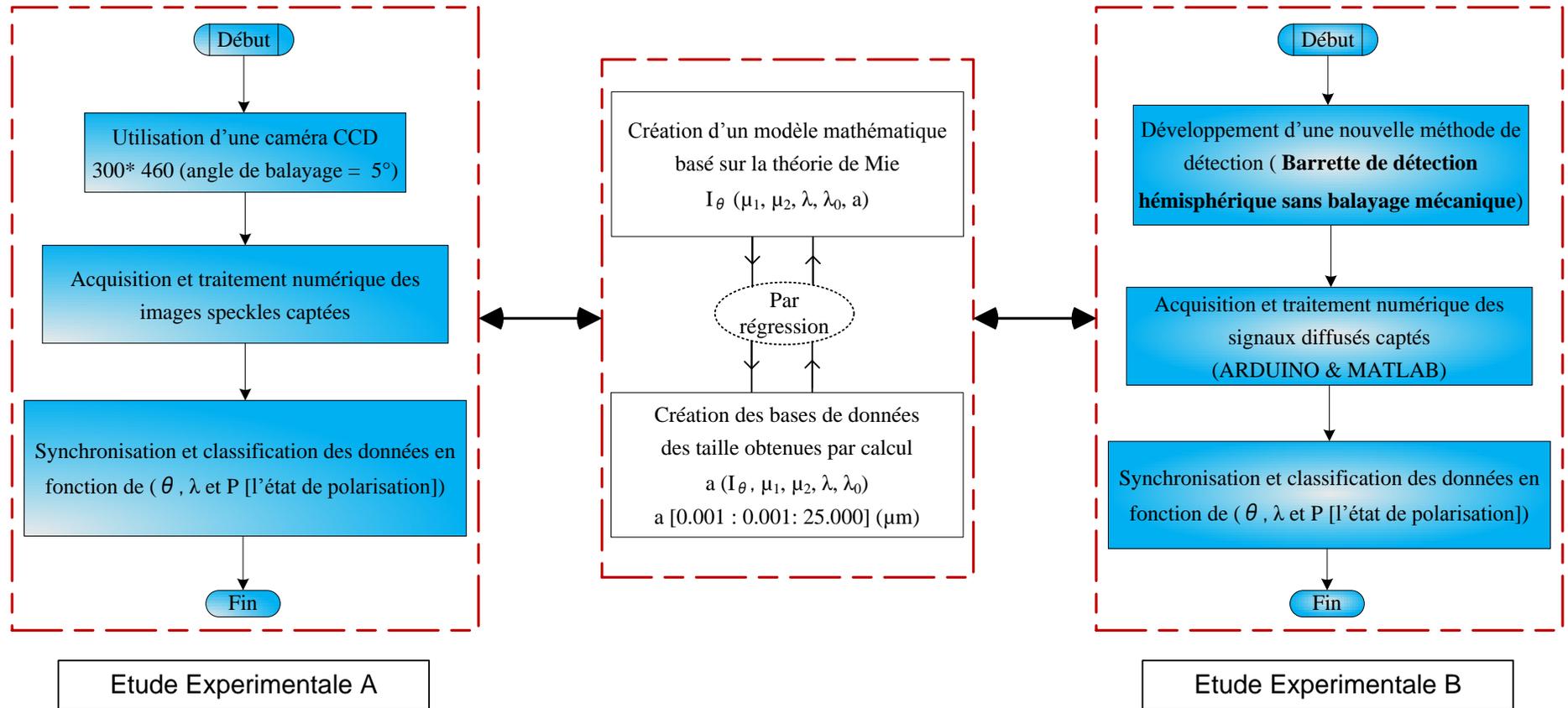


Figure 3.9,a : Algorithme de calcul

Figure 3.9,b : Organigramme du Protocole de calcul



Les figure 3.9, a et 3.9, b représentent le diagramme de l'algorithme et l'organigramme du protocole qu'on a appliqué pour extraire les tailles des microparticules, nous avons fixé tous les paramètres du modèle mathématique pour laisser variable le paramètre taille, et puisque la théorie de Mie exige l'introduction de la taille comme un paramètre d'entrée pour nous donner la distribution spatiale des intensités diffusées, nous avons travaillé par régression en faisant le calcul mathématique sur un vecteur de taille avec un pas d'incrémentation très petit. L'étude pratique dans des conditions bien déterminées avec un angle de balayage fixe entre la pratique et la base des données nous permet de faire la corrélation des intensités diffusées pour trouver les tailles les plus proches.

Nous avons présenté les deux méthodes de détection des signaux : par CCD (balayage mécanique) et par barrette hémisphérique (Figure 3.9,b) pour expliquer qu'on peut, à partir des images, arriver aux distributions spatiales des intensités diffusées, au même temps pour affiner les courbes de diffusion et trouver des résultats plus fidèles nous avons présenté le protocole de calcul suivi à partir des signaux captés par la barrette qui est caractérisée par un pas plus fin et détection en régime dynamique.

3.8. Création de bases des données

Ayant utilisé notre programme, nous avons calculé les intensités diffusées en variant les paramètres de formes et d'anisotropie de la sphère étudiée. Puis, nous avons créé des bases de données des tailles microniques qui correspondent aux différentes distributions des intensités diffusées de 0.001 à 25.000 μm avec un pas de 0.001 μm en fonction de la longueur d'onde et l'indice de réfraction du milieu étudié (Tableau 3.2) . Les tailles des particules sont enfin obtenues par corrélation entre la distribution des intensités captées et la distribution obtenue par calcul.

Tableau 3.2 : Exemple d'une Base des données des tailles obtenues par calcul,
 ($\lambda = 0.470 \mu\text{m}$, $\mu_2 = 1.34 + 0.29i$; $P = 20^\circ$)

$\theta \backslash a$	0.001	0.002	0.003	0.004	...	25.000
60°	0,310	0,306	0,199	0,195	...	$1,342 * e^{-05}$
55°	0,925	0,895	0,854	0,821	...	$4,183 * e^{-05}$
50°	0,700	0,677	0,645	0,619	...	$3,252 * e^{-05}$
...
10°	0,541	0,527	0,508	0,492	...	$3,322 * e^{-05}$
05°	1,000	0,969	0,926	0,891	...	$0,622 * e^{-05}$

3.9. Validation de la méthode proposée

Afin de vérifier la méthode d'analyse des signaux diffusés, nous utilisons des méthodes de diagnostics déjà validées. La comparaison des résultats entre ces différentes méthodes pourra alors confirmer les résultats obtenus et nous aider à optimiser et valider notre modèle. La méthode de mesure des tailles des microparticules dans un plasma froid capacitif à basse pression sera utilisée pour vérifier les résultats obtenus par notre montage monté au sein du laboratoire d'Optique Appliquée, Université de Sétif1. Les mesures de comparaison ont été effectuées au niveau du laboratoire GREMI, Université d'Orléans, France.

3.9.1. Dispositif expérimental nommé "Marguerite"

Contrairement aux granulomètres et autres diagnostics ex-situ, l'utilisation d'un plasma permet d'effectuer des mesures. En effet, lorsqu'une particule se trouve immergée dans un plasma, elle peut être maintenue en lévitation à l'intérieur et par conséquent il est

possible de la caractériser par différentes méthodes [19, 20]. De plus, de nombreuses études ont déjà été réalisées sur les plasmas dit "poudreux" c'est à dire en présence des particules, dans lesquelles il a été mis en évidence que les caractéristiques électriques de la décharge et du plasma sont très sensibles à la présence de microparticules. De plus, les particules étant en lévitation dans le plasma, comme figées, sont plus faciles à analyser même en faible quantité. L'utilisation d'un plasma pour la caractérisation de microparticules est donc un fort objet d'intérêt [21].

Ce dispositif (Figure 3.10) est développé au niveau du laboratoire GREMI par Pr. L, BOUFENDI ; M, HENAULT et l'équipe du plasma poudreux [19].

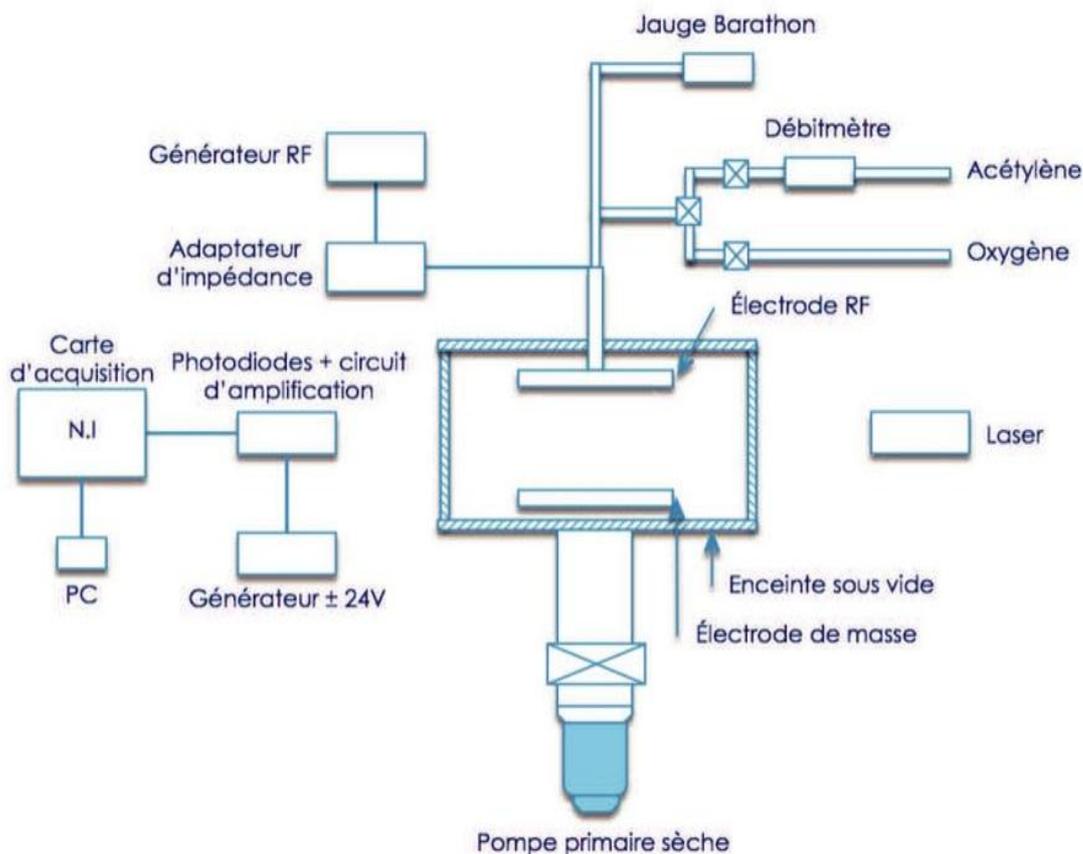


Figure 3.10: **Représentation du montage expérimental de diffusion de la lumière**

Le schéma représenté dans la figure 3.10 consiste en une enceinte sous vide de 162 mm par 162 mm composée de 16 hublots en verre permettant la diffusion de la lumière à différents angle. Il permet d'initier une décharge capacitive radio-fréquence (13,56Mhz) à basse pression. Le pompage de l'enceinte est assuré par une pompe primaire sèche, permettant d'atteindre une pression de base inférieure à $< 10^{-3}$ mbar. La pression à l'intérieur du réacteur est contrôlée à l'aide d'une jauge Baratron. , toutes les pièces du réacteur sont reliées à la masse à l'exception de l'électrode active. C'est derrière cette électrode que nous

trouvons le diffuseur de gaz, constitué de grilles métalliques, qui permet d'homogénéiser l'injection de gaz dans l'enceinte. Ici, Trois gaz sont essentiellement utilisés sur ce dispositif expérimental, l'acétylène, qui permet la formation de poudre, l'oxygène, qui permet de nettoyer le réacteur lorsque des poudres y ont été déposées et l'argon qui permet l'étude de poudres injectées dans le plasma. Le débit des gaz utilisés est réglable à l'aide de la vanne micro-fuite.

Le réacteur (Figures 3.11 et 3.12) est conçu pour la production de poudre mais également pour permettre l'injection de poudres dans celui-ci dans le but d'en étudier les caractéristiques à l'aide des différentes méthodes dont la diffusion multi-angles de la lumière.

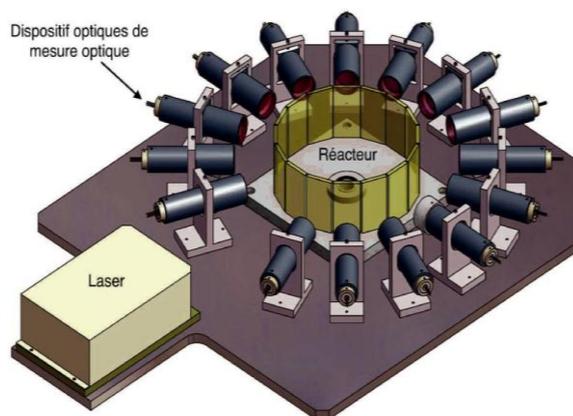


Figure 3.11 : Représentation schématique du dispositif expérimental [19]

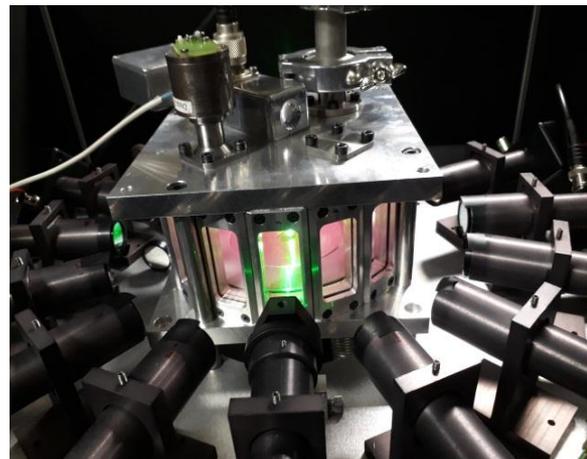


Figure 3.12 : Photo du réacteur

L'équipe a ajouté au dispositif un injecteur de particules dans un plasma généré par un gaz neutre sous une différence de potentiel entre les deux électrodes, commandé par un interrupteur (Figure 3.13). Possédant un réservoir rechargeable de poudre, dont le fond est constitué d'un tamis micro-perforé. L'injection de poudres dans le réacteur se fait en agitant le réservoir à l'aide d'un électro-aimant.

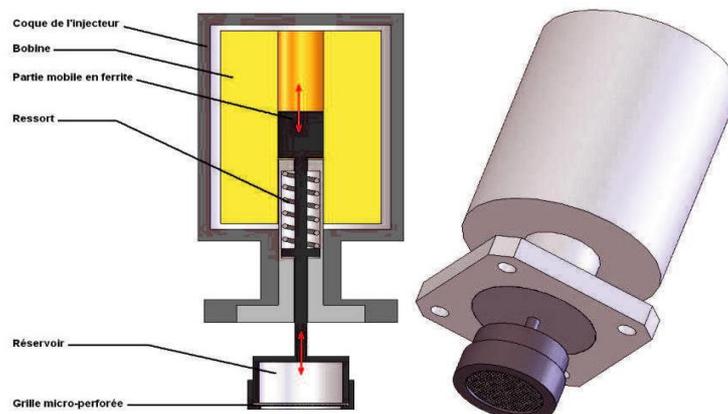


Figure 3.13 : Schéma de l'injecteur de poudres

3.9.2. Dispositif optique de détection

Le dispositif de mesure (Figure 3.11) permettant de caractériser les microparticules est composé de 15 photodiodes séparées chacune d'un angle de 22.5° montées sur des supports leur permettant de capter un maximum de lumière et de regarder un même point au centre du réacteur, un filtre interférentiel centré sur la longueur d'onde du laser ($0.532 \mu\text{m}$) ayant une largeur bande passante de 1nm , filtrant la lumière de façon à capter que la longueur d'onde du laser en évitant ainsi de collecter la lumière parasite, un polariseur orienté verticalement ou horizontalement par rapport à la polarisation du laser, chaque photodiode est reliée à un circuit d'amplification externe. Les signaux reçus par les photodiodes sont ensuite transmis à une carte d'acquisition National Instrument, nous permettant d'acquérir simultanément l'intégralité des 15 signaux. Un programme LabView (Figure 3.14) a été réalisé afin de pouvoir utiliser simplement cette carte d'acquisition et contrôler ainsi les entrées. La résolution temporelle du système d'acquisition est de 4 ns entre deux voies successives.

3.9.3. Protocole expérimental suivi

L'objectif de ce travail est d'estimer la morphologie moyenne des microparticules. Ensuite, à partir de quelques données initiales (l'indice de réfraction et les dimensions réelles de la microparticule), nous recherchons les paramètres optimaux pour établir une corrélation entre les valeurs expérimentales et de simulation obtenues. Les paramètres variables sont:

- La quantité de particules étudiées (le volume de particules exposées à la lumière).
- Le temps choisi pour extraire les valeurs des intensités de la courbe.
- La puissance du laser.
- La puissance du générateur RF.
- La sensibilité des détecteurs.

La figure 3.14 montre la disposition des capteurs associée à l'ordinateur :

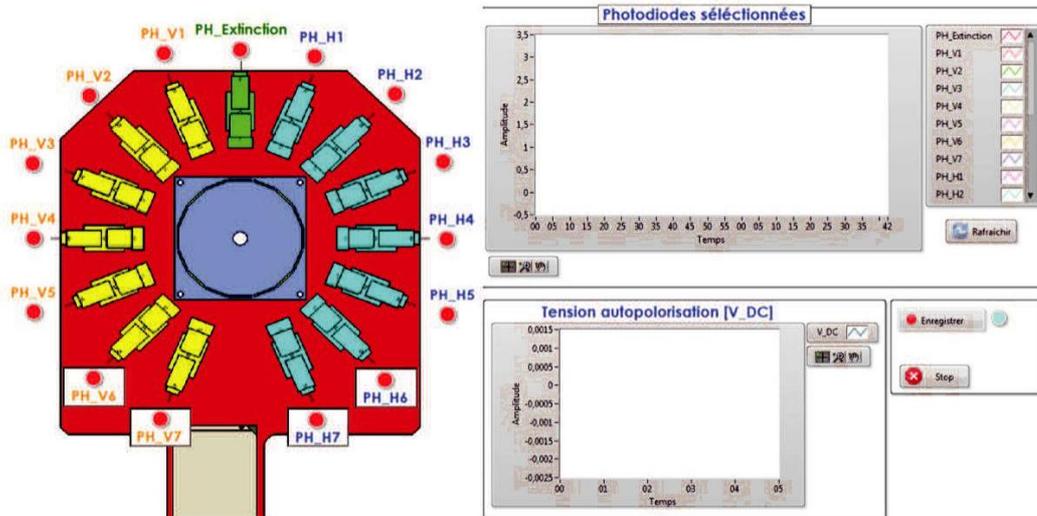


Figure 3.14 : **Interface graphique du programme LabView pour le contrôle du dispositif de mesure de la diffusion de la lumière**

Le tableau 3.3 représente les caractéristiques des particules étudiées (les particules de Mélamine Formaldéhyde MF) :

Tableau 3.3: **Les particules de polymère MF (Mélamine Formaldéhyde) utilisées [22]**

Densité	1,51 g/cm ³
Indice de refraction	1.68
Diamètre de la particule	2.90 µm et 0.40 µm
La monodispersité	CV < 5%
La morphologie du particule	sphérique
Groupe fonctionnels	Methylol, Imino
La température de stabilité	à 250 °C
Force mécanique	Robuste
Solubilité dans les acides et les bases	insoluble

3.9.4. Résultats obtenus

Nous analysons les diagrammes de diffusion angulaire produits par un échantillon de particules éclairé par un faisceau laser continu polarisé linéairement. Nous avons utilisé un système de détection composé de photodétecteurs sensibles placés circonférentiellement.

A chaque fois, nous avons choisi une région de la courbe où la réponse par diffusion est très claire, puis la moyenne des 20 tailles obtenues à partir des distributions spatiales des intensités autour de la région choisie a été calculée.

Les résultats obtenus représentent les distributions des intensités de diffusion en fonction de l'état de polarisation et de la direction d'observation, et voici quelques valeurs obtenues dans les tableaux suivants:

3.10. Etude de la morphologie

Une étude morphologique basée sur la corrélation des tailles obtenues par notre programme a été réalisée, les résultats ont permis d'évaluer la morphologie générale des particules en traçant la distribution polaire spatiale des tailles (Figure 3.15).

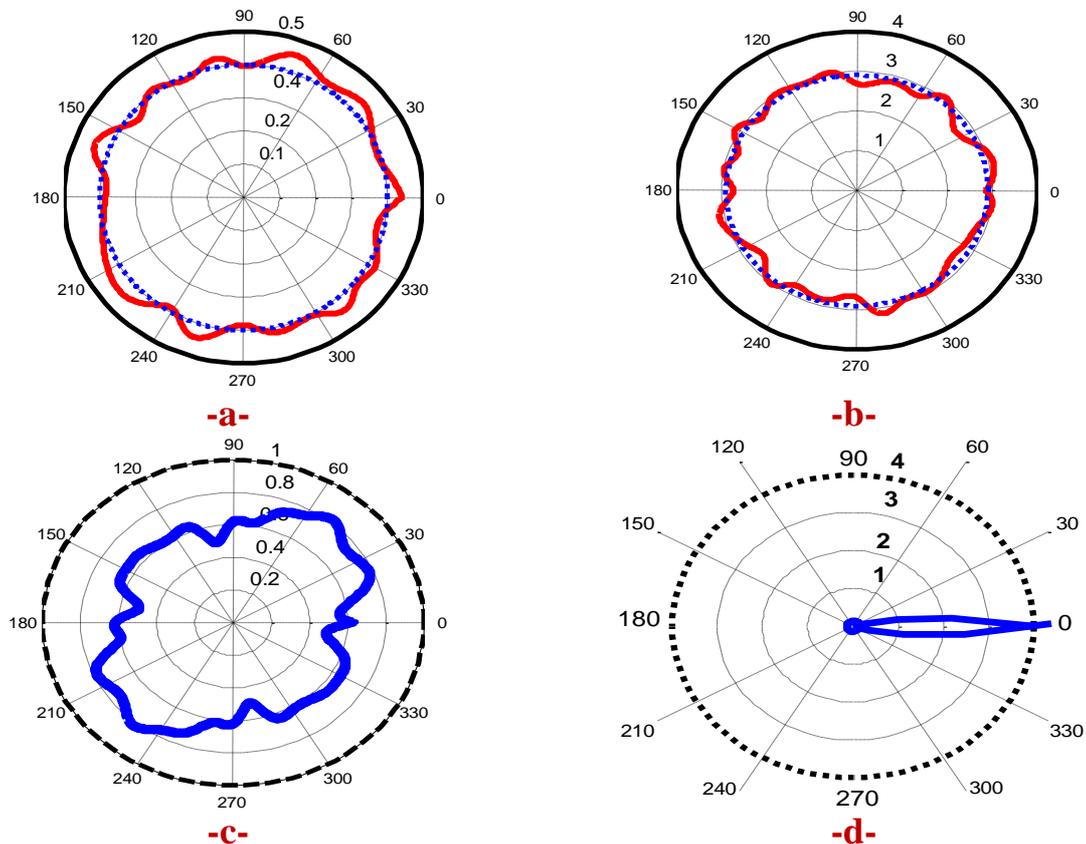


Figure 3.15 : **Représentation polaire de la morphologie des particules étudiées:**
a- Taille des particules d'MF: $0.4 \mu\text{m}$, **b-** Taille des particules d'MF: $4.0 \mu\text{m}$
c- Morphologie des nanotubes de carbone (une seule injection de microparticules pour tous les états de polarisation).
d- Morphologie des nanotubes de carbone (une seule injection de microparticules pour chaque état de polarisation).

3.10.1. Analyse des résultats

Nous avons effectué plusieurs expériences optiques afin d'extraire les différentes caractéristiques (tailles et morphologies des microparticules piégées dans le plasma). L'utilisation du plasma permet d'effectuer des mesures dans des milieux secs et non liquides. En effet, lorsqu'une particule est immergée dans le plasma, elle peut rester en lévitation à l'intérieur et il est donc possible de la caractériser facilement.

En utilisant le modèle de Mie, équation 3.1, nous avons calculé les valeurs des intensités diffusées théoriques et expérimentales en supposant la forme et les paramètres d'anisotropie normalisés dans la sphère isotrope.

Les courbes représentées par les figures 3.15 (a, b, c et d), sont les réponses en intensités en fonction des angles de balayage, représentées en coordonnées polaires. Nous remarquons en Rouge la courbe qui relie les intensités renvoyées par l'échantillon, cette représentation peut être plus affinée avec un plus grand nombre de capteurs (résolution géométrique du capteur).

Les figures 3.15. a et 3.15. b : montrent la morphologie des particules d'MF achetées sur le marché comme étant sphérique de diamètres $0.4\mu\text{m}$ et $4.0\mu\text{m}$ successivement, nos calculs ne sont pas très loin des données spécifiques du fournisseur

Les figures 3.15.c et 3.15. d : montrent les formes géométriques des nanotubes de Carbones obtenues par nos soins et qui reflètent fidèlement les données spécifiées par les fournisseurs.

Nous avons utilisé la diffusion de la lumière statique et dynamique pour étudier les microparticules d'MF et nanotubes de carbones de tailles certifiées. Les valeurs expérimentales obtenues sont en très bon accord avec celles fournies par le fabricant. Ce travail nous a permis de calibrer notre méthode sur une large gamme de tailles et de morphologies.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Michael. I, Mishchenko. L, Travis. D and Andrew. A. L., Scattering; Absorption and Emission of Light by Small Particles, NASA, (2002).
- [2] Bordier. C., Diffusion de la lumière par des tissus biologiques : Etude expérimentale et modélisation par l'équation de transfert radiatif vectorielle, THESE de DOCTORAT, UNIVERSITE PARIS 6, (2009).
- [3] Romain. C., Light-scattering by aggregates of tumor cells: Spectral, polarimetric, and angular measurements, Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, vol 146, (2014), pp. 207-213.
- [4] Steven. L. J., Corrigendum: Optical properties of biological tissues, Phys. Med. Biol, vol 58 (2013), pp. 5007–5008.
- [5] Wang. B. X, Zhao. C.Y., Effect of dependent scattering on light absorption in highly scattering random media, International Journal of Heat and Mass Transfer, vol 125, (2018).
- [6] Jacquier. S., Méthodes approchées pour les propriétés optiques d'agrégats de particules sphériques non absorbantes, Thèse de doctorat, École nationale supérieure des mines de Saint-Etienne, France, (2006).
- [7] Mie. G., Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen , Annalen der physic, vol 25, (1908), pp.378–445.
- [8] Yang. P et al., Investigation of scattering coefficients and anisotropy factors of human cancerous and normal prostate tissues using Mie theory, Proc. of SPIE, vol 8941, (2014).
- [9] Pery. E., Spectroscopie bimodale en diffusion élastique et auto-fluorescence résolue spatialement : instrumentation, modélisation des interactions lumière-tissus et application à la caractérisation de tissus biologiques ex vivo et in vivo pour la détection de cancer, Thèse de doctorat, Université de Nancy, (2007).
- [10] Matzler. C., MATLAB Functions for Mie Scattering and Absorption, Research Report No. 2002-08, Institut für Angewandte Physik, Schweiz.
- [11] Alison. B. A, Rafferty. T, Preston. C., Determining the size and refractive index of single aerosol particles using angular light scattering and Mie resonances, Journal of Quantitative

Spectroscopy and Radiative Transfer, <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2018.09.026>

[12] Brun. B., Spectroscopie optique et infrarouge de biomolécules et systèmes molécule-métal, université de Lyon, p.22, (2012).

[13] Huiling. H et al., Light scattering by a spheroidal bubble with geometrical optics approximation, *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, Elsevier, vol 113, pp. 1467–1475, (2012).

[14] Horvath. H; Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles: Historic developments and basics, *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, vol. 110, pp. 787–799, (2009).

[15] Volodymyr. M., The Lambert-Beer law in time domain form and its application, *Applied Radiation and Isotopes*, vol 128, (2017), pp 1-5.

[16] Hadamcik. E et al., light scattering measurement on natural particles with the pro experiment: an overview, *Journal of Quant. Spect and Radia Transf*, (2003), pp.679–693.

[17] Sakurada.Y et Nakamura. T., Démonstration of the light scattering phenomenon in the atmosphère, *Proc. of SPIE*, vol 4588, (2002), p. 491.

[18] Bordier. C et al., Illustration of a bimodal system in Intralipid-20% by polarized light scattering: experiments and modeling, *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, vol 94, (2009).

[19] Hénault. M., Métrologie des nanoparticules dans un plasma froid capacitif basse pression : développement de diagnostics de métrologie des nanoparticules, thèse de Doctorat, université d'Orléans, France, (2015).

[20] Boufendi. L, Bouchoule. A and Hbid. T., Electrical characterization and modeling of a dust forming plasma in a radio frequency discharge. *Dusty plasmas 95 workshop on generation, transport, and removal of particles in plasmas*, vol 14, pp. 572–576, (1996).

[21] Hénault. M et al., Electrical method for the measurements of volume averaged electron density and effective coupled power to the plasma bulk, *Physics of Plasmas*, vol 23, (2016).

[22] Nosenko. V. B, Goree. J and Boufendi. L., Radiation pressure and gas drag forces on a melamine-formaldehyde microsphere in a dusty plasma. *AIP Physics of Plasmas*, 10, (2003).

Chapitre 04

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

4.1. Introduction

Le but de ce chapitre est de présenter les résultats expérimentaux obtenus sur nos objets d'étude afin de les confronter aux résultats théoriques de notre modèle. Le premier objectif étant une validation expérimentale de notre modèle, le second étant de chercher à prouver que ce modèle pourra être discriminant entre tissus sains et cancéreux, à partir de l'étude de ces cas d'école.

Pour l'ensemble des coupes histologiques étudié, nous avons réalisé des mesures de diffusion à l'aide de notre propre dispositif optique que nous avons développé au sein du laboratoire. Nous avons présenté au chapitre précédent les résultats sur les particules de polymère et ceux obtenus par spectrophotométrie. Nous abordons maintenant les résultats obtenus par notre technique de corrélation entre les paramètres expérimentaux et de calculs, en utilisant nos bases des données liées par l'interface graphique qui gère le modèle mathématique de diffusion, ouvrant des perspectives prometteuses quant à l'utilisation de la diffusion de la lumière en régime dynamique pour aider à diagnostiquer les tumeurs.

Nous avons choisi les tissus biologiques comme un milieu d'étude, et nous pouvons appliquer la théorie de Mie de diffusion pour faire notre étude. Tout en gardant les mêmes conditions de préparation des échantillons suivis par notre partenaire (le laboratoire d'anatomie pathologique – CHU Sétif), dans le but est de différencier entre le tissu sain et le tissu cancéreux d'un organe dont les paramètres variables sont :

- ✓ L'angle de diffusion.
- ✓ La longueur d'onde.
- ✓ L'état de polarisation.
- ✓ L'indice de réfraction.
- ✓ Les tailles et les morphologies des particules.

Trois catégories des tissus biologiques ont été utilisées :

- ✓ Tissus sains.
- ✓ Tissus cancéreux.
- ✓ Une jonction entre les deux précédents.

4.2. Dispositif expérimental, matériels et protocoles

Le Montage expérimental utilisé (Figure 4.1) a été monté pour déterminer la distribution de l'intensité diffusée. Le faisceau incident de lumière polychromatique est collimaté à l'aide des deux lentilles (Len1 et Len2) (le montage de Köhler), puis il passe par un diaphragme de champ pour diminuer la taille du faisceau, afin de toucher une zone la plus petite possible pour pouvoir prétendre à l'homogénéité du milieu d'étude en ce point. Le faisceau tombe ensuite sur l'échantillon qui diffusera la lumière dans toutes les directions après interaction avec l'échantillon [1, 2, 3]. Trois types de détecteurs sont utilisés pour trouver le capteur optique le plus sensible et le plus adapté à notre étude, nous avons utilisé une caméra CCD, des photos-diodes et des photos-résistances (voir Annexe), le détecteur a été placé sur un bras de goniomètre pour capter les images/les intensités de la lumière diffusée en fonction de l'angle d'observation.

4.2.1. L'ajustage du montage :

Avant de commencer l'ajustage, il est indispensable d'assurer l'uniformité du faisceau lumineux de la lampe et l'alignement par rapport au banc optique. Au début, nous centrons la lentille (Len1) puis (Len2), nous introduisons ensuite un diaphragme et on ajuste le détecteur pour que le faisceau tombe sur la surface active du capteur (Figure 4.1).

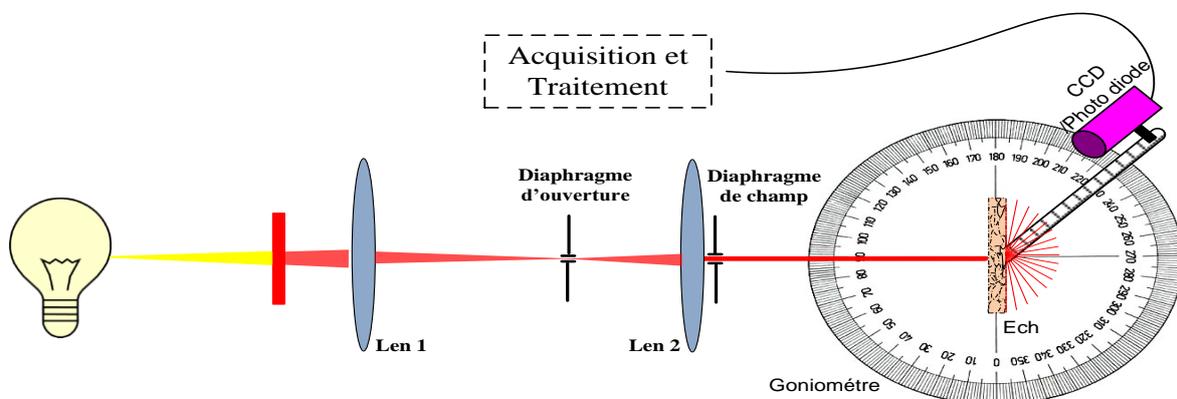


Figure 4.1 : Schéma du Premier montage expérimental [utilisation d'une lumière polychromatique] [2]

Le montage de la figure 4.1 a ensuite été amélioré en diminuant le pas de balayage pour récupérer plus des intensités diffusées et affiner les courbes de diffusion, aussi pour permettre des mesures en régime rapide afin de l'utiliser pour étudier les milieux dynamiques, et ça en remplaçant la CCD par une barrette de détection hémisphérique. Les figure 4.2 et 4.3 schématisent l'utilisation de la barrette pour détecter les signaux viennent des sources lumineuses polychromatique et monochromatique successivement.

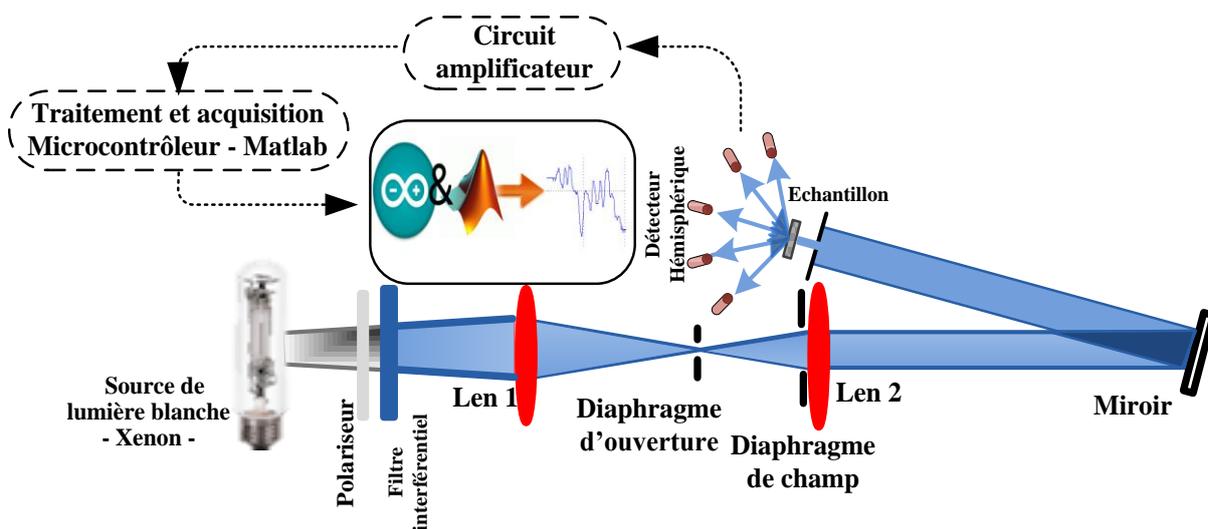


Figure 4.2 : Schéma du deuxième montage expérimental [utilisation d'une lumière polychromatique] [1]

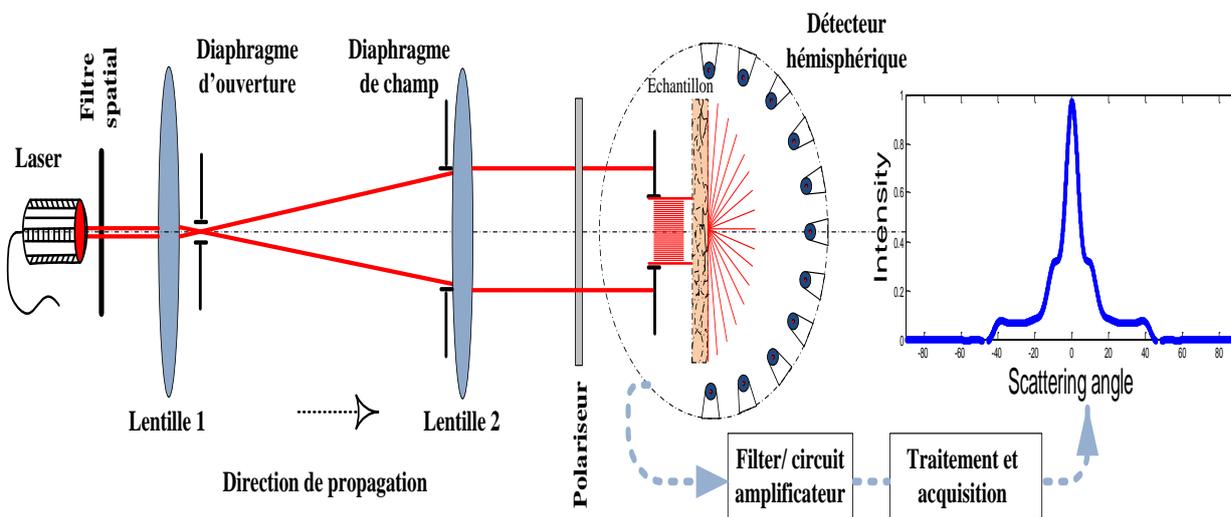


Figure 4.3 : Schéma du troisième montage expérimental [utilisation d'une lumière laser monochromatique]

La figure 4.3 représente le dispositif optique utilisé, les intensités recueillies en fonction de l'angle sont représentées en coordonnées cartésiennes sur la courbe de droite.

4.3. Barrette de détection hémisphérique

Nous adaptons autour de notre échantillon, le dispositif de mesure permettant de caractériser les particules. Ce dispositif est composé de 36 photorésistances séparées chacune d'un angle de 5° montées sur un support hémisphérique de façon qu'on puisse observer un maximum de lumière et de collecter les signaux diffusés d'un même volume. Les signaux mesurés étant de l'ordre de quelques mV, les photorésistances sont reliées à des circuits de multiplexage CD4051 externes montés en parallèles et alimentés en 5V (Figure 4. 4 et 4. 5) [4]. Les signaux reçus par les photorésistances sont ensuite transmis à une carte d'acquisition électronique programmable de type Arduino UNO [5], nous permettant d'acquérir simultanément l'intégralité des 36 signaux analogiques ou bien de choisir les signaux des photorésistances que nous avons sélectionnées.

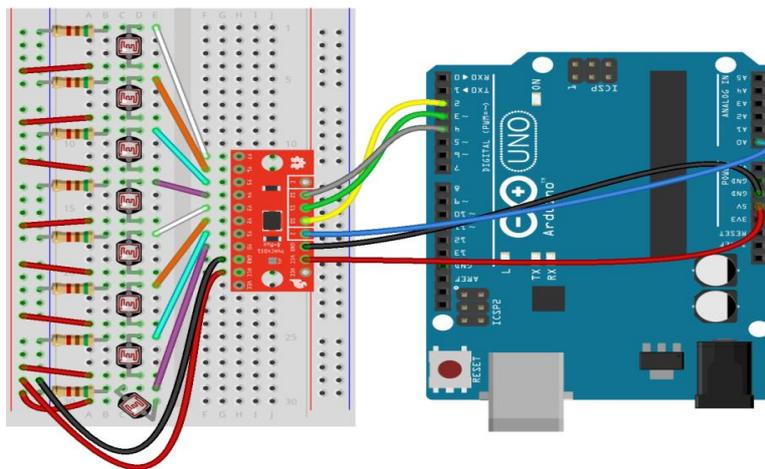


Figure 4.4 : Représentation schématique du système de Multiplexage des signaux analogiques (8 entrées)



Figure 4.5 : Photo de détecteur optoélectronique hémisphérique

Une interface graphique Matlab a été créée (Figure 4. 6) afin de pouvoir utiliser simplement cette carte électronique et contrôler ainsi les entrées selon leurs angles. La résolution temporelle du système d'acquisition est de $3\mu\text{s}$ entre deux voies successives. Le programme fait 10 lectures successives pour chaque mesure et il affiche par la suite la moyenne de ces mesures afin de minimiser les erreurs systématiques.

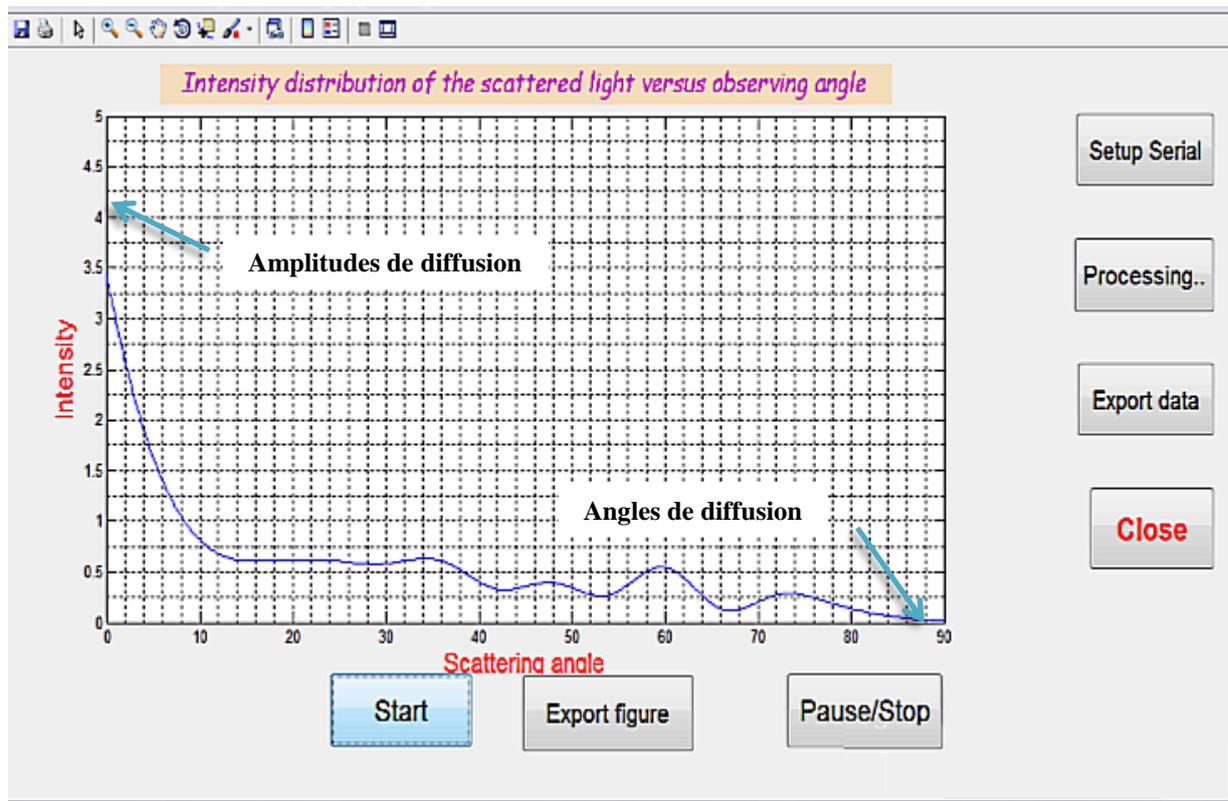


Figure 4. 6 : Interface graphique du programme d'acquisition et contrôle des signaux diffusés

➔ **Setup serial** (Lecture du Port Série)

```
%fclose(instrfindall);
global S
S=serial('COM21','BaudRate',9600);
fopen(S)
for j=1:10
    for i=1:16
        k(1,i)=fscanf(S,'%e',4);
    end
    k(j,:)=k(1,:);
end
```

➔ **Processing** (Traitement des données expérimentales)

En utilisant cette interface, nous avons la possibilité de faire corrélérer entre les distributions des intensités expérimentales et celles obtenues par calcul (Figure 4.7). La corrélation des datas expérimentaux avec la base de données (Tableau 3.2) correspondant aux mêmes indices de réfraction et longueurs d'onde utilisées nous permettent d'extraire la taille moyenne des diffuseurs.

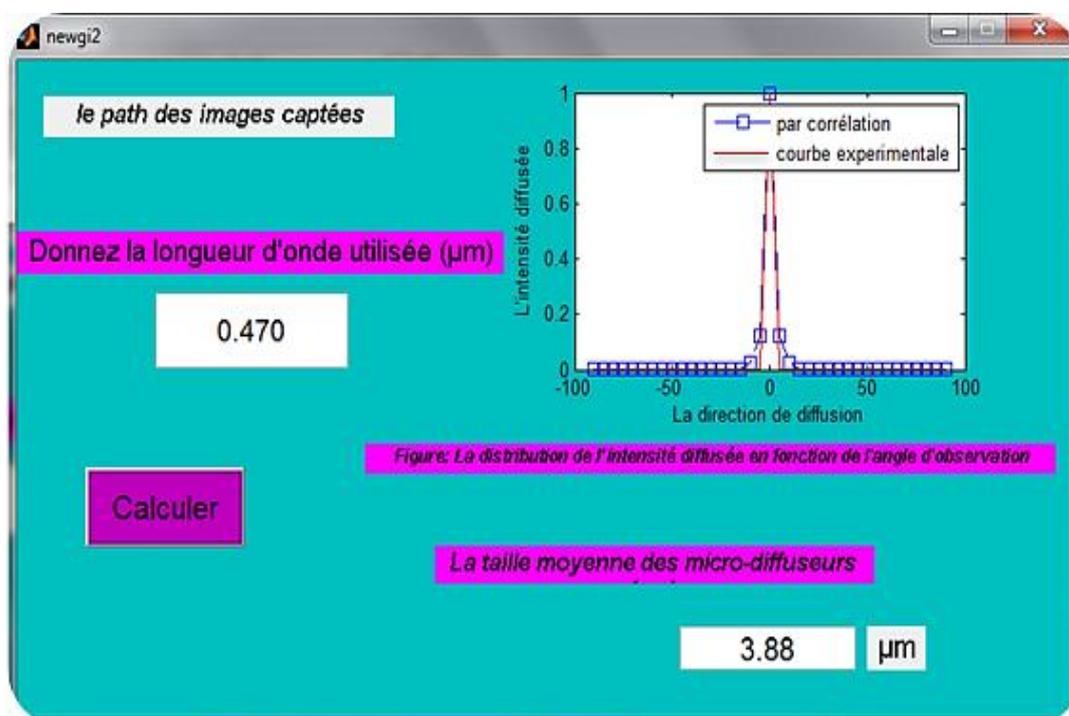


Figure 4.7 : Interface graphique du programme de corrélation

→ **Time** (Distribution des intensités en fonction du temps (Diffusion dynamique)).

A partir de cette fenêtre (Figure 4. 8), nous pouvons afficher en temps réel la variation des intensités diffusées en fonction du temps, cette étude nous a permis de suivre l'évolution rapide des tailles des diffuseurs comme dans le cas des Virus.

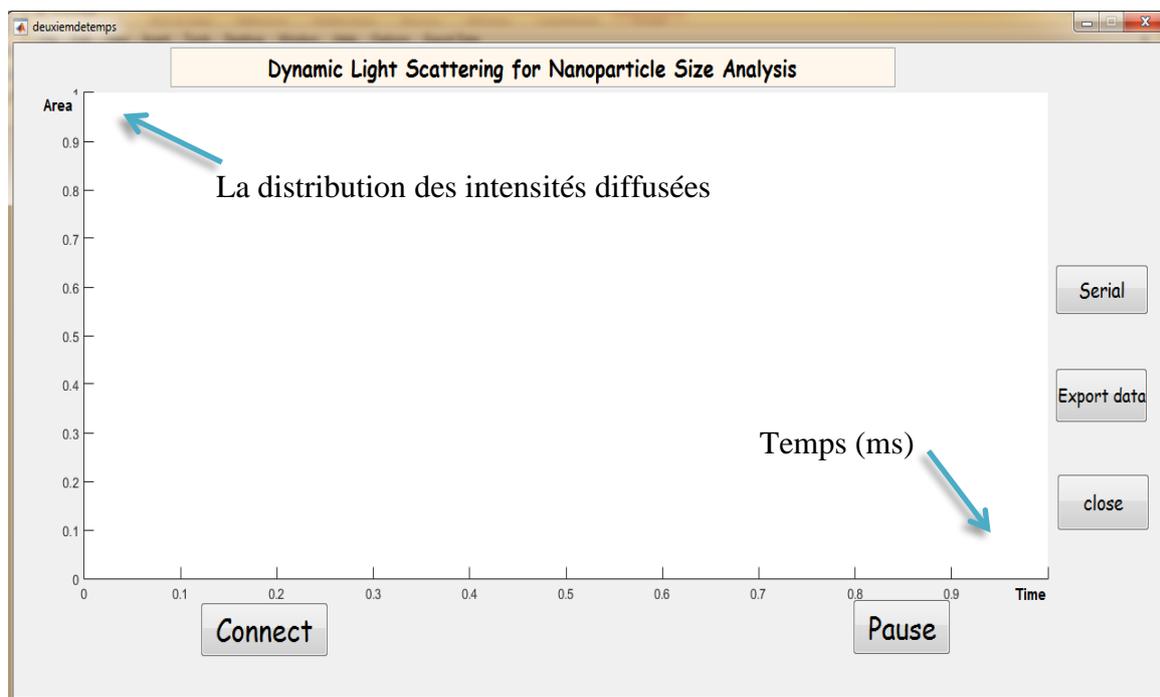


Figure 4.8 : **Interface graphique (Etude de la distribution des intensités diffusées en régime dynamique)**

Note : les deux boutons Export Data (Exporter les datas) et Export Figure (Exporter la figure) nous permettent d'enregistrer une copie des résultats expérimentaux en format Excel et en format graphique.

4.4. Résultats et discussions

Nous effectuons les mesures de l'intensité de la lumière diffusée sur les tissus biologiques choisis de différents organes du corps humain (les deux jonctions normale et tumorale): Colon, Thyroïde, Sein, Ganglion, Rein, Vésicule... etc.

Une fois le montage optique vérifié, nous mettons à tour de rôle le monochromateur pour le cas d'utilisation d'une source de lumière blanche, et un polariseur positionné à un état bien défini pour étudier l'effet de biréfringence et de polarisation sur le résultat final.

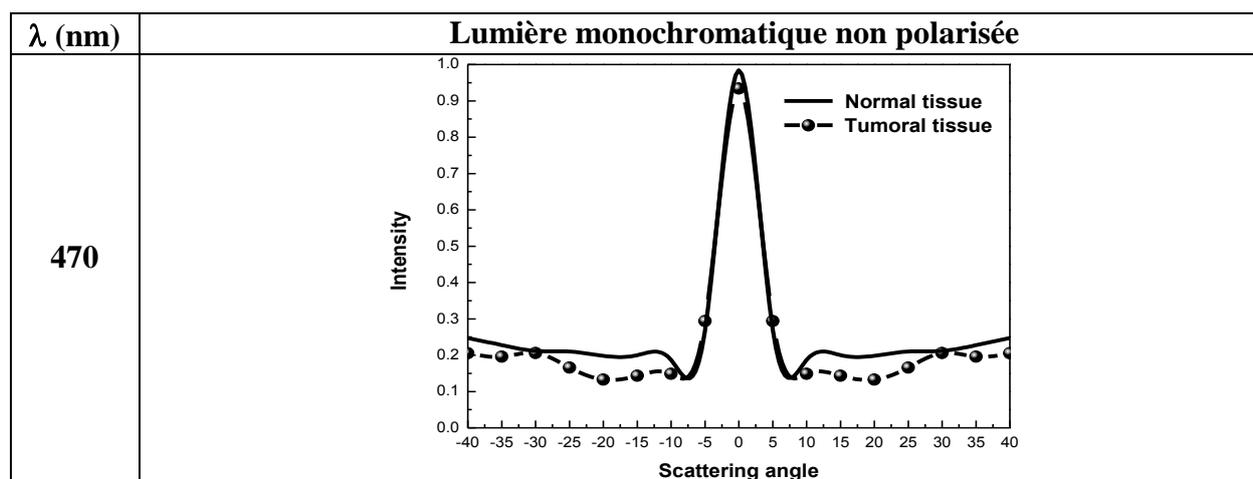
Nos premières études ont été basées sur l'utilisation du capteur optique de type CCD (Figure 4.1); nous avons calculé l'intégralité des intensités détectées par les pixels pour chaque angle. Les résultats obtenus par cette méthode ont été influencés de façon directe par l'amplification interne incontrôlée des signaux qui viennent de la caméra, la surface active de la CCD (lignes de capture et lignes d'enregistrement) et le mouvement mécanique du détecteur, ce qui nous donne des résultats moins précis si nous faisons une comparaison avec ce qui est donné théoriquement.

Notre objectif est de faire développer un nouveau type de capteur qui nous permettra d'éviter les erreurs qui apparaissent avec l'utilisation d'une seule caméra CCD. Le détecteur que nous avons développé permet de collecter les signaux diffusés de façon rapide [de 0° à 180°] et sans mouvement mécanique, et en utilisant aussi des capteurs de type LDR qui ont des surfaces actives complètement sensibles avec une carte d'acquisition et un logiciel de traitement (voir Annexe).

Après normalisation et calibrage des intensités captées, nous avons tracé les courbes de diffusion qui représentent les distributions angulaires et spectrales des intensités en fonction de l'état de polarisation. Et pour pouvoir mieux interpréter les résultats obtenus, nous faisons lisser les courbes et nous calculons l'aire de chacune d'elle.

Les courbes obtenues sont représentées sur les figures 4.9 et 4.10 suivantes:

Figure 4.9: **Courbes des intensités de la lumière diffusée en incidence normale par une Thyroïde (lumière non polarisée).**



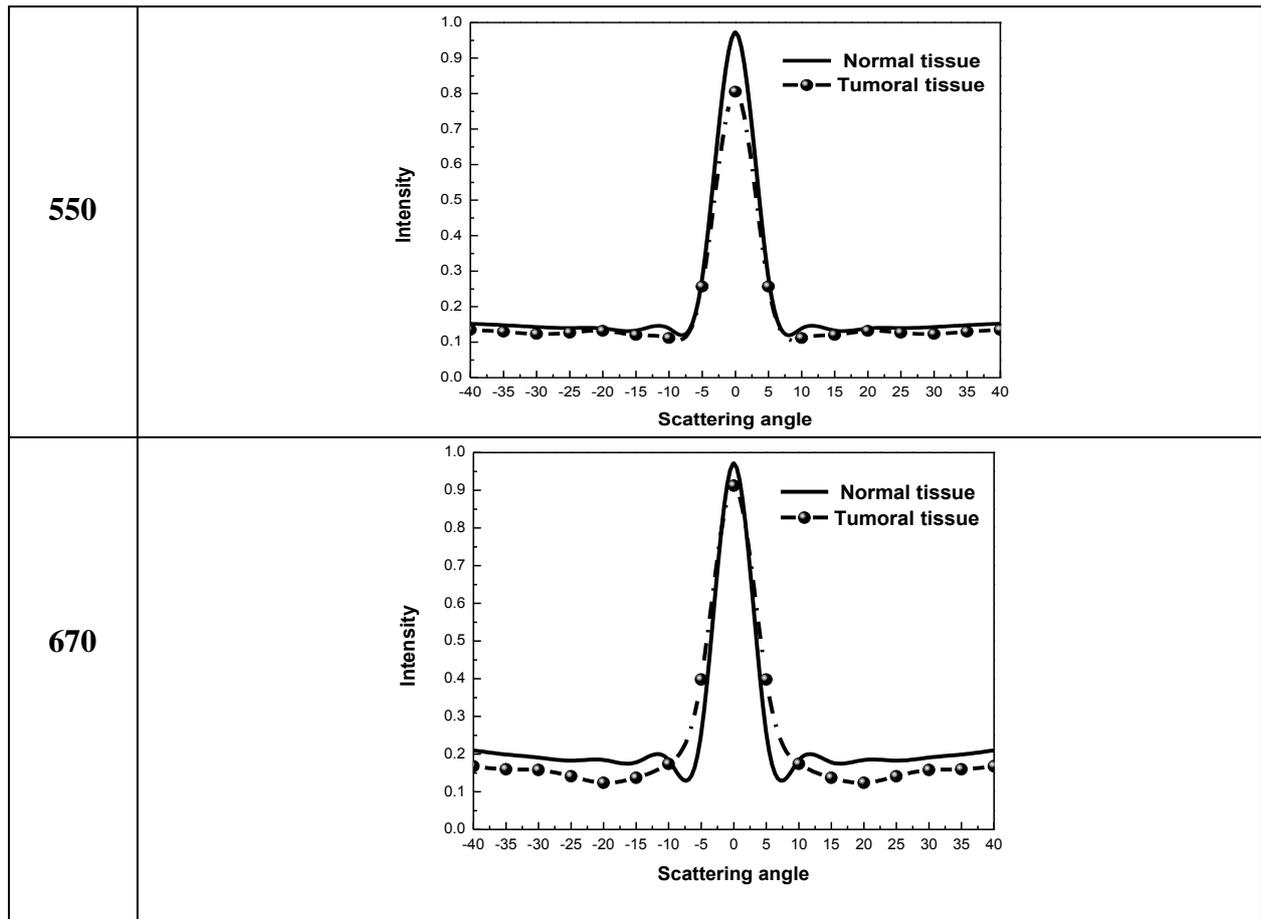
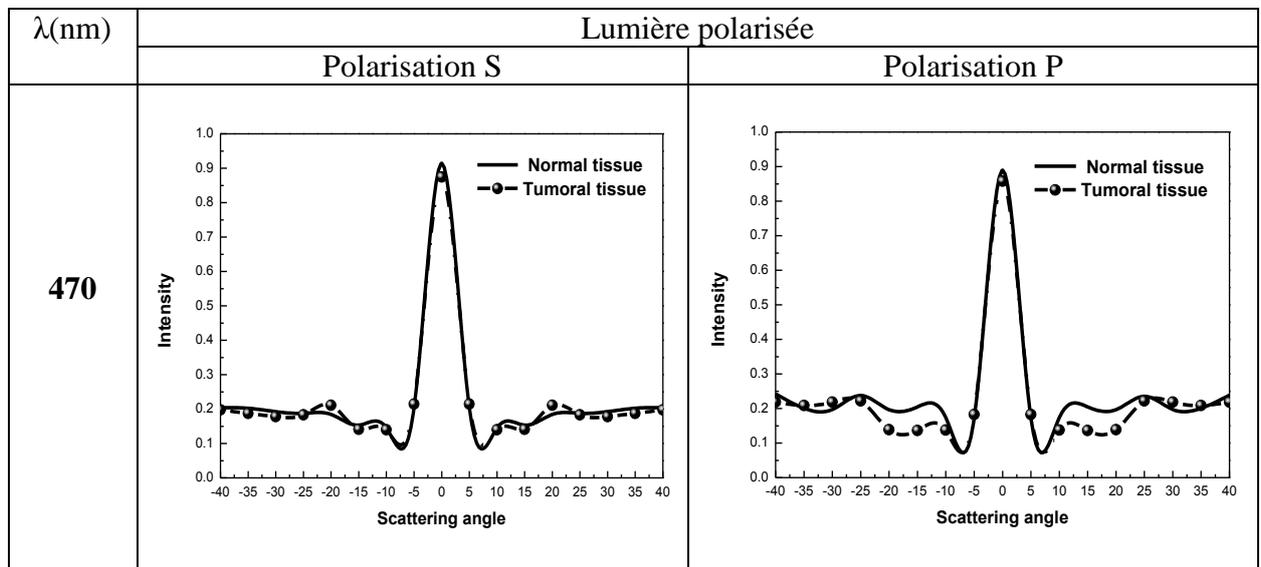
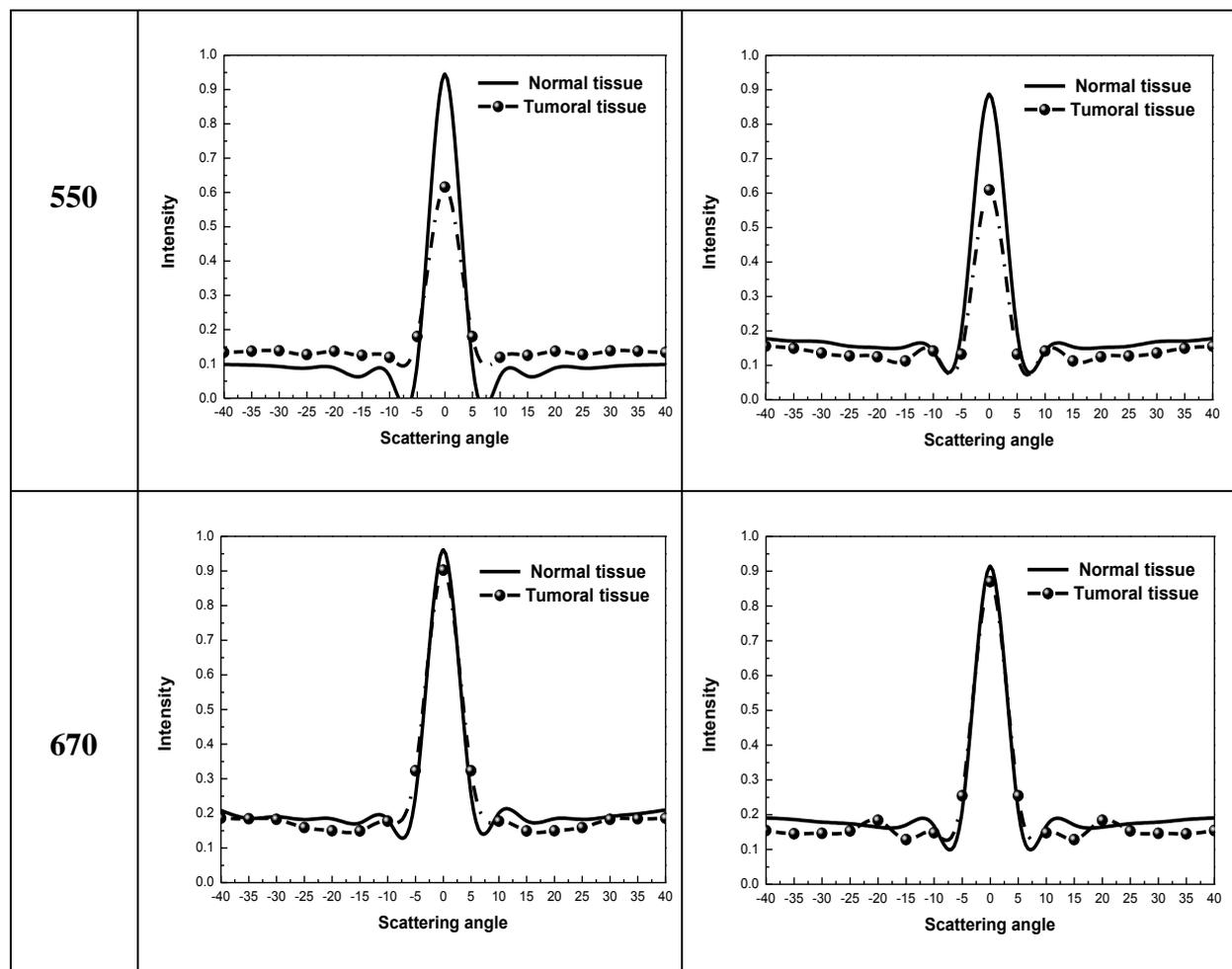


Figure 4.10: Courbes des intensités de la lumière diffusée en incidence normale par une Thyroïde (lumière polarisée).





Pour un Tissu Thyroïdale, d'après les courbes des intensités diffusées en fonction de l'angle d'observation, nous remarquons une différence claire entre la diffusion par le tissu sain et le tissu tumoral de 0° à 180° , ceci est vérifié en observant l'aire de chaque courbe qui change dans tous les cas (Figures 4.9 et 4.10). Le pic central correspond à la réponse spéculaire et les valeurs des intensités sont normalisées.

Le travail en fonction de la longueur d'onde est pour vérifier qu'on est toujours en dehors de la bande d'absorption.

Nous remarquons que les aires des courbes (Figure 4.10) dans le cas où la lumière est polarisée parallèlement (Tableau 4.3) sont très proches des aires des courbes dans le cas de polarisation perpendiculaire. Cela nous montre que la forme des noyaux est quasi sphérique (le facteur d'anisotropie ≈ 1).

Tableau 4.3: Représentation des aires des courbes de la Thyroïde.

λ	470 nm			550 nm			670 nm		
Ech / Etat de polarisation	Sans polarisation	Polarisation S	Polarisation P	Sans polarisation	Polarisation S	Polarisation P	Sans polarisation	Polarisation S	Polarisation P
Thyroïde normale	0.797	0.946	0.944	1.026	1.211	1.537	1.922	1.520	1.584
Thyroïde tumorale	1.689	1.832	1.011	1.910	1.049	1.732	1.936	1.147	1.610

D'après les courbes obtenues (Figure 4.11), nous pouvons dire que la taille des diffuseurs a changé en plus grand, cela s'explique anatomiquement par l'augmentation de la taille des noyaux (la cancérisation). Cette différence appréciable trouvée peut être exploitée pour nous aider à diagnostiquer une pathologie.

La variation de la distribution diffusée en fonction de la longueur d'onde peut aussi nous aider à déterminer la fenêtre thérapeutique pour chaque organe, cette dernière peut être utilisée comme un moyen de transport d'une thérapie.

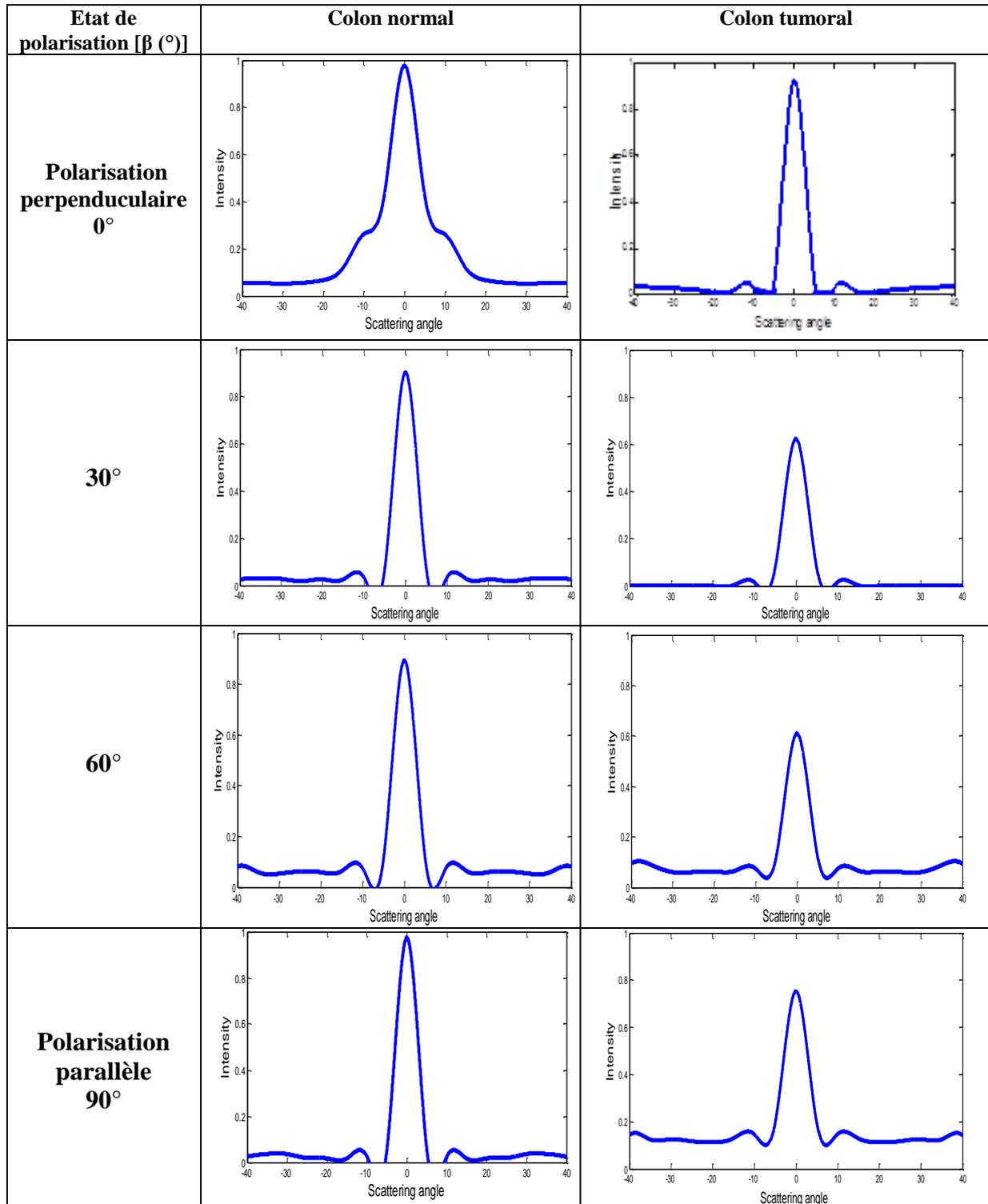
Lorsqu'on a utilisé différentes longueurs d'onde, on a constaté que chaque échantillon se comportait d'une manière différente par rapport à l'autre.

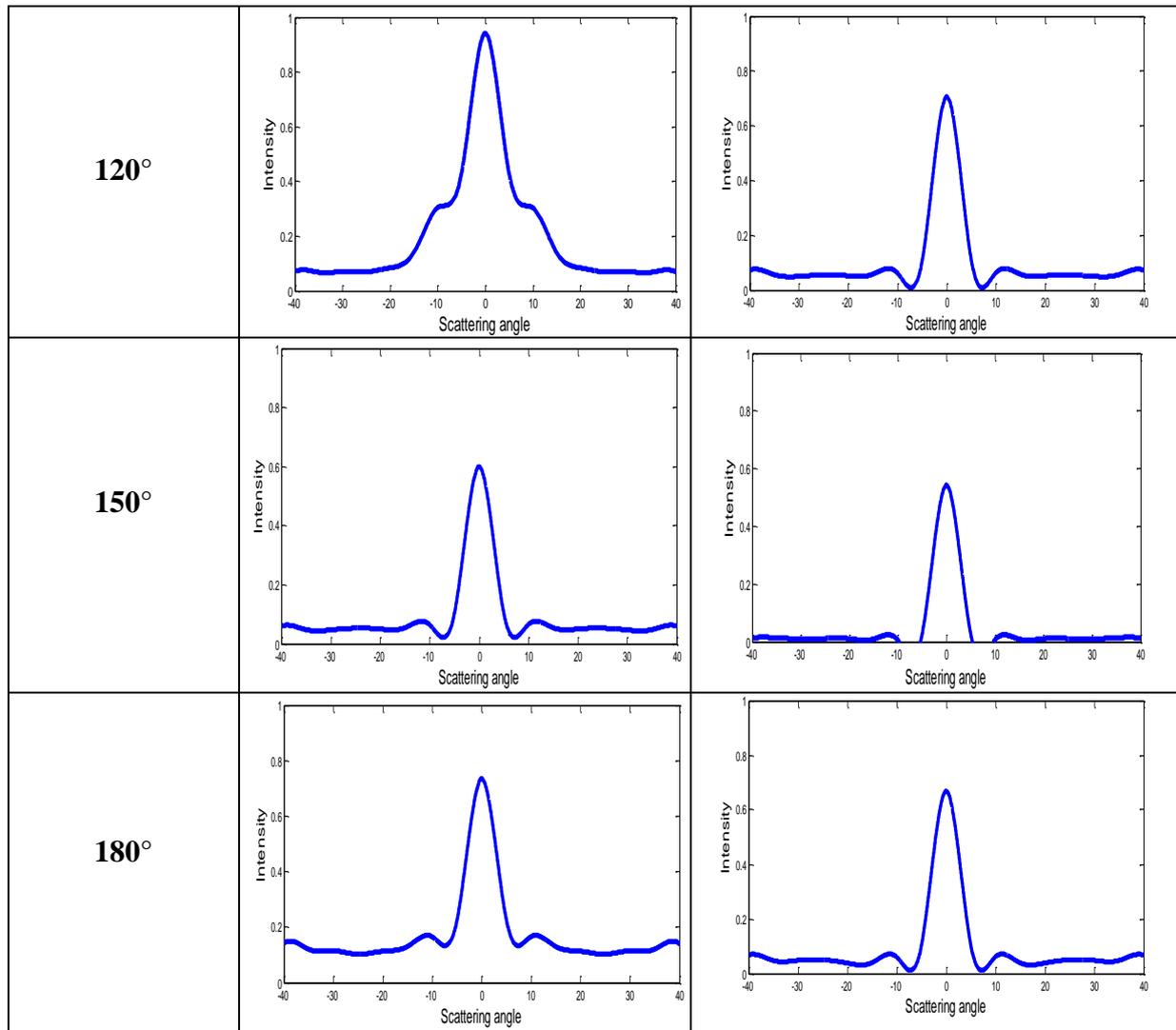
L'étude spectrale associée à la microscopie a permis de sélectionner la longueur d'onde exploitable pour l'étude de la diffusion et l'absorption du tissu thyroïdale qui était autour de 550 nm.

Nous avons fait des mesures sur plusieurs organes et pièces opératoires du corps humain, et puisque notre premier objectif était de mettre sur pied un dispositif optique sensible à la taille des diffuseurs, nous avons choisi de présenter juste quelques résultats pour voire la sensibilité de la technique.

Dans la partie au-dessous, nous allons présenter les distributions des intensités diffusées par des coupes histologiques normales et tumorales d'un Colon en fonction de l'état de polarisation (30° de pas) afin d'affiner l'allure des courbes.

Figure 4.11: Les courbes des intensités de la lumière diffusée en incidence normale par un Colon en utilisant une lumière polarisée ($\lambda=550$ nm).





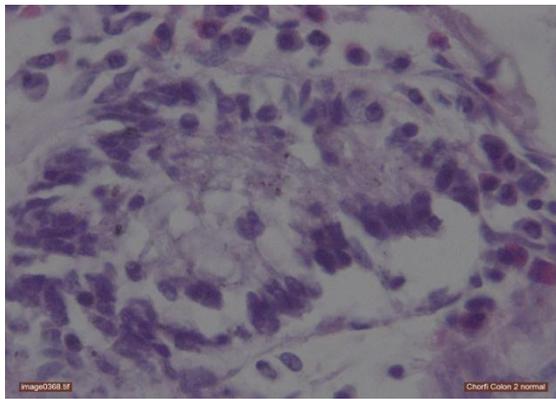
Nous avons calculé les aires sous les courbes des intensités en fonction de la longueur d'onde et l'état de polarisation avec un pas égale à 30°. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 4.5:

Tableau 4.5: Représentation des aires des courbes du Colon en fonction de longueur d'onde (λ) et l'état de polarisation β (°)

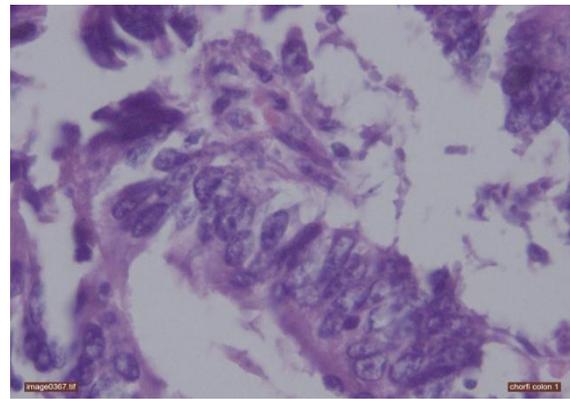
A- Colon normal, B- Colon tumoral,

		$\lambda = 470 \text{ nm}$		$\lambda = 550 \text{ nm}$		$\lambda = 670 \text{ nm}$	
		A	B	A	B	A	B
Aire (°)	β						
	0°	0.686	2.339	1.034	1.151	0.967	1.735
	30°	0.414	1.794	0.618	1.236	0.956	1.760
	60°	0.315	2.162	0.584	1.241	0.964	2.173
	90°	0.258	2.193	0.631	1.256	0.914	1.769
	120°	0.383	2.051	0.828	1.109	0.943	1.324
	150°	0.419	0.914	0.309	1.135	1.007	1.978
180°	0.539	0.816	0.234	1.499	0.950	1.651	

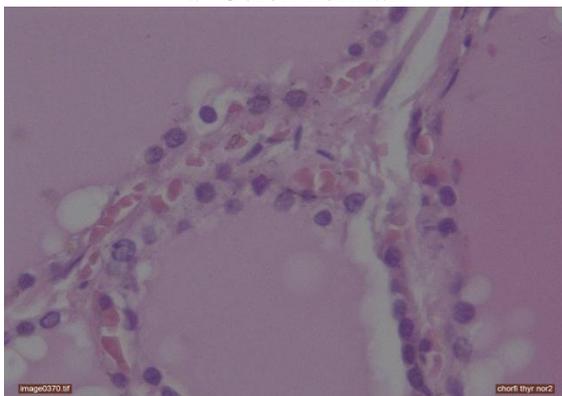
L'étude en fonction de la polarisation (Tableau 4.5) a permis également moyennant les calculs sur les tailles des diffuseurs suivant plusieurs directions, de déterminer la morphologie des particules. Pour cette couche tissulaire du Colon nous avons trouvé que les aires des courbes dans le cas où la lumière est polarisée perpendiculaire sont importantes par rapport aux aires des courbes obtenues dans le cas où la lumière est polarisée parallèlement, cela nous montre que les morphologies des noyaux sont un peu étalées (Figure 4.12.b). Cette information est validée en observant l'image microscopique de notre échantillon dans le cas où il y a des cellules tumorales. En observant le cas d'un Colon normal (Figure 4.12.a), on remarque que les aires des courbes dans le cas où la lumière est polarisée parallèlement sont très proches des aires des courbes dans le cas de polarisation perpendiculaire (Tableau 4.5), cela nous confirme le résultat trouvé précédemment concernant la quasi-sphéricité des noyaux des cellules normales.



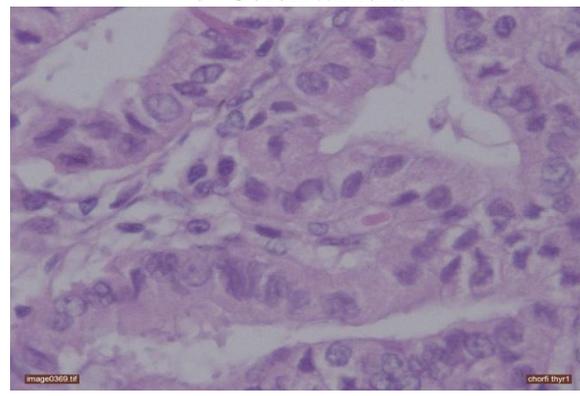
-a- Colon normal



-b- Colon tumoral



-c- Thyroïde normale



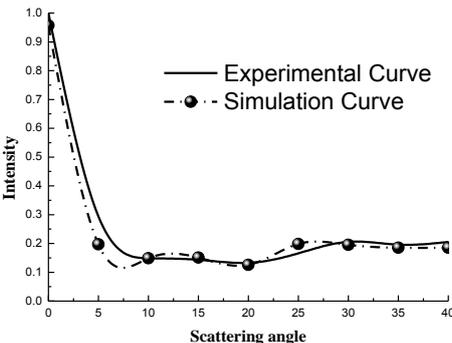
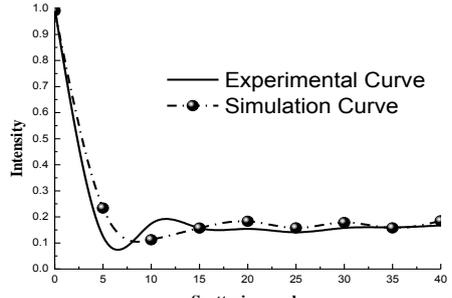
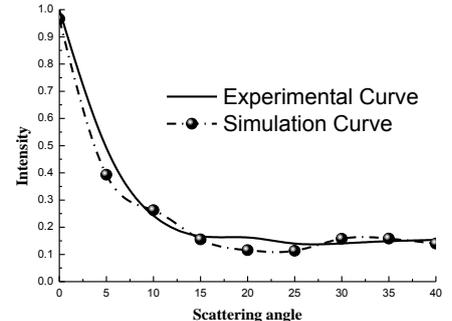
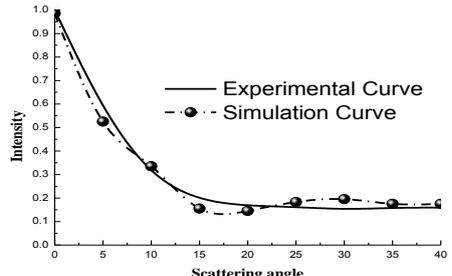
-d- Thyroïde tumorale

Figure 4.12 : Images microscopiques du Colon et la Thyroïde

Nous avons créé une base de données à partir de nos calculs de simulations pour extraire les valeurs qui décrivent les distributions des intensités diffusées en fonction de la variation angulaire et spectrale, ainsi que les tailles correspondent aux datas avec un pas de $0.001\mu\text{m}$, puis nous avons synchronisé les datas expérimentaux obtenus avec les datas de simulation.

L'interprétation des intensités des courbes moyennant un calcul basé sur les équations de Mie a permis de déterminer la taille moyenne des diffuseurs pour chaque échantillon à partir de la corrélation entre les courbes expérimentales et de calculs (Figure 4.13).

Figure 4.13: Comparaison entre des courbes expérimentales et de calcul

Tailles des particules (μm)	λ (nm)	La distribution des Intensités
2.6	470	
	670	
6.5	470	
	550	

Les courbes des intensités en fonction de l'angle de vue du faisceau diffusé, montrent une distribution gaussienne avec un pic central correspondant à la transmission spéculaire. L'allure des courbes est celle d'une réponse de diffusion où l'aire comprise entre la courbe et l'axe des x dépend de la taille des diffuseurs.

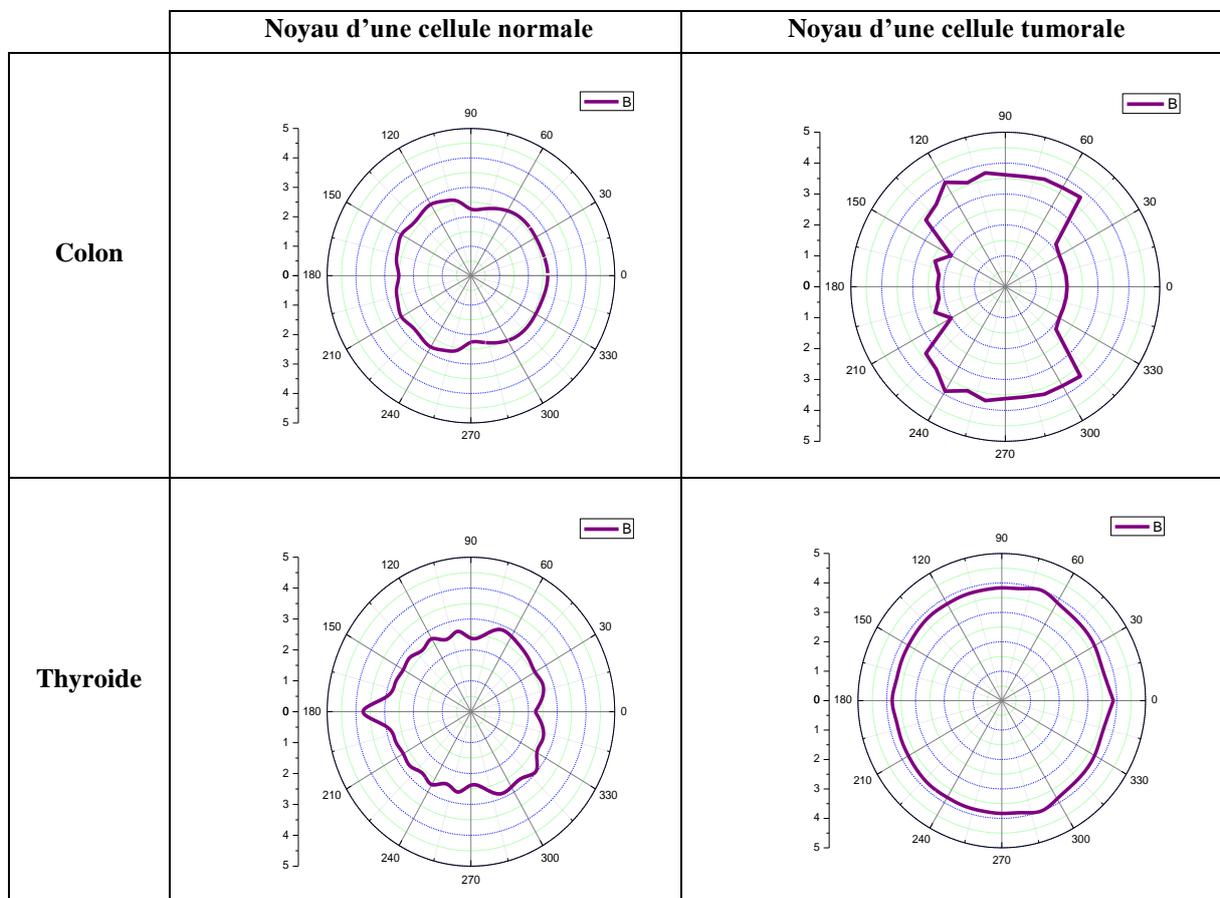
Les réponses varient en fonction de la longueur d'onde, car la diffusion varie également en fonction de λ . Les courbes calculées par fitting sont ensuite superposées aux courbes expérimentales, les résultats obtenus sont représentés sur la figure 4.13 à gauche.

4.5. Etude de la morphologie

Une étude morphologique basée sur la mesure des tailles en fonction des états de polarisation a été faite, l'extraction des tailles nous permet d'estimer la morphologie approximative des noyaux.

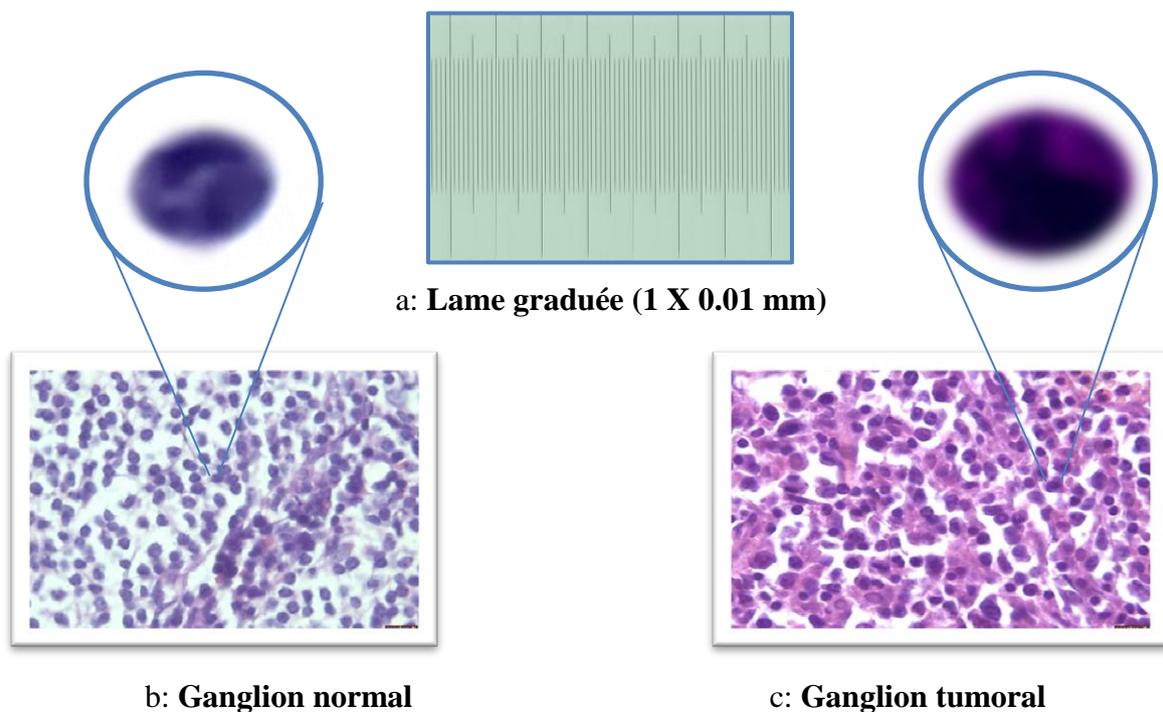
Nous avons alors calculé les tailles moyennes des noyaux en fonction de l'état de polarisation, puis on a représenté les tailles calculées en coordonnées polaires pour schématiser la forme moyenne (Figure 4.14).

Figure 4.14 : Représentation polaire des tailles obtenues



L'étude de la morphologie des noyaux cellulaires montre clairement la différence entre les noyaux des cellules saines et tumorales (Figure 4.14). Pour le Colon, nous pouvons dire que la morphologie a été modifiée d'une forme quasi-sphérique à une forme étalée après le développement de tumeur, et pour la Thyroïde nous remarquons que la taille a changée en plus grand mais la morphologie reste quasi-sphérique. Cela est vérifié en observant les images microscopiques des deux organes.

Pour mesurer les tailles moyennes des noyaux à partir des images microscopiques obtenues (Figure 4.15), nous avons utilisé une lame microscopique graduée avec un pas égal à $10\mu\text{m}$ (Figure 4.15. a). Un logiciel approprié était utilisé pour calibrer les images afin d'extraire les tailles avec précision.



Figures 4. 15: **Images microscopiques obtenues par Leica microscope 630X.**

Les tailles calculées par corrélation mathématique des distributions des intensités diffusées calculées et captées en fonction de plusieurs paramètres avec les tailles obtenues par microscopies pour deux organes sont données par le tableau 4.8:

Tableau 4.8 : Comparaison entre les résultats expérimentaux et de microscopie (les tailles sont en μm)

	Normal (e)		Tumoral (e)	
	Taille calculée	Taille moyenne par microscopie	Taille calculée	Taille moyenne par microscopie
Thyroïde	2.9	2.6	6.2	6.6
Colon	2.6	2.4	(Suivant x)	3.9
			(Suivant y)	7.1
Sein	2.3	2.0	3.9	4.2
Ganglion	3.0	2.8	5.4	5.9

Les résultats obtenus grâce à la technique optique mise au point dans le laboratoire ont été insérer dans des programmes de calcul permettant d'évaluer des tailles des noyaux indiquant une évolution, signe de la présence d'une pathologie (Tableau 4.8).

Les tailles ont été extraites à partir des courbes de diffusion de lumière (intensité = l'aire sous la courbe), en utilisant le modèle mathématique de Mie réduit aux paramètres les plus accessibles (longueur d'onde, état de polarisation, angle de diffusion ...etc).

Le programme de calcul élaboré permet de générer une base des données en fittant sur le paramètre géométrique de la taille moyenne du diffuseur. A partir de laquelle on peut tirer la valeur du diamètre qui donne la courbe la plus proche de l'expérimentale.

Les résultats comparés à l'étude microscopique sont en bonne corrélation. Plusieurs paramètres sont en voie d'exploration.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Nous avons rendu compte dans cette thèse de notre travail sur l'étude de la diffusion de la lumière par des tissus biologiques en vue du développement d'un dispositif optique de diffusion, servant à aider les anatomo-pathologistes, à mieux apprécier les tumeurs, en ajoutant en plus un modèle mathématique, pouvant servir à évaluer la taille des noyaux des cellules.

Nous avons choisi d'étudier les tissus biologiques, hétérogène, diffusant dont la géométrie est complexe. Le cadre théorique de notre étude de diffusion a été celui de Mie qui traite la propagation des flux lumineux en prenant en compte leur état de polarisation et les tailles des microparticules.

Une série de tests a été réalisée pour valider le principe mathématique et les bases des données créées [6, 7]. L'ensemble du code de calcul a été également validé avec succès. Nous avons réalisé à l'aide de ces modèles différentes études qui ont montré l'utilité de la polarisation et la diffusion pour discriminer deux milieux différents.

Les résultats expérimentaux obtenus nous ont permis de conclure que l'intensité de la lumière diffusée par les cellules dépend fortement de plusieurs paramètres expérimentaux: longueur d'onde, état de polarisation, indice de réfraction, morphologie et taille des particules [1, 2, 3].

La distribution spatiale de l'intensité de la lumière diffusée dépend de la morphologie de la cellule et des états de polarisation de la lumière incidente, nous pouvons extraire des informations morphologiques cellulaires de la lumière diffusée dans les variations angulaires et spectrales nous ont permis d'évaluer la taille des noyaux entre l'organe normal et l'organe pathologique. Le paramètre état de polarisation a permis d'évaluer la morphologie des deux cas. Les résultats obtenus ont été confrontés à des mesures par microscopie de ces mêmes particules et la comparaison a été satisfaite avec l'outil optique mis en place. Notre diffusomètre peut être amélioré pour l'utiliser comme un outil de diagnostic des milieux biologiques et d'autres milieux.

Les résultats expérimentaux corrélés avec la théorie nous ont permis d'ouvrir les portes vers une large gamme des milieux biologiques tel que : les virus [8, 9, 10 et 11], ou

l'évolution en taille est un peu rapide, notre méthode offre la possibilité d'étudier les distributions angulaire et spectrale en fonction du temps, le temps de balayage est environ 3 ms. La mesure en rétrodiffusion de lumière est aussi possible, et nous avons appliqué notre méthode optique pour mesurer les tailles des grains de sable dont on a trouvé des bons résultats.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Chorfi. H, Ayadi. K, Gader. R, Boufendi. L., Morphological characterization of particles by the intensity and polarization of the scattered radiation, *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*, vol 154, pp 251–257, (2018).
- [2] Chorfi. H, Ayadi. K, Boufendi. L., *Light Scattering Applied to the Study of Biological Tissues: To an Optical Biopsy*, Springer International Publishing, (2018), pp. 637–643, https://doi.org/10.1007/978-3-319-89707-3_67.
- [3] Chorfi. H, Ayadi. K, *Vers la Biopsie Optique*, éditions universitaires européennes, (2017).
- [4] Canet. P., *Electronique, électronique analogique basse fréquence : composants, circuits, amplification, filtrage, ellipses*, (2018).
- [5] Clemens. V., *Maitrisez les microcontrôleurs à l'aide d'Arduino : avec cartes AVR*, Elector, (2017).
- [6] Hénault. M., *Métrieologie des nanoparticules dans un plasma froid capacitif basse pression : développement de diagnostics de métrieologie des nanoparticules*, thèse de Doctorat, université d'Orléans, France, (2015).
- [7] Boufendi. L, Bouchoule. A, and Hbid. T. Electrical characterization and modeling of a dust forming plasma in a radio frequency discharge. *Dusty plasmas'95 workshop on generation, transport, and removal of particles in plasmas*, vol 14, pp. 572–576, (1996).
- [8] Danielle. A. O., *Application of nanomaterials for the electrical and optical detection of the hepatitis B virus*, *Analytical Biochemistry*, vol 549, pp 157-163, (2018).
- [9] Liu. Y., *Development of a thermosensitive molecularly imprinted polymer resonance light scattering sensor for rapid and highly selective detection of hepatitis A virus in vitro*, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol 253, pp 1188-1193, (2017).

[10] Yang. B et al., A virus resonance light scattering sensor based on mussel-inspired molecularly imprinted polymers for high sensitive and high selective detection of Hepatitis A Virus, *Biosensors and Bioelectronics*, vol 87, pp. 679-685, (2017).

[11] Wang. J. J, Ping. Y. H, Yong. J. C, Yang. Z. C., Light scattering of a Bessel beam by a nucleated biological cell: An eccentric sphere model, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, vol 206, pp. 22-30, (2018).

ANNEXE

Nous rappelons dans cette annexe les bases sur les différents types des capteurs optoélectronique que nous avons utilisée dans nos études.

A.1/Choix des composants de détection optique

A.1.1/La photodiode

Une photodiode est un composant semi-conducteur ayant la capacité de détecter un rayonnement du domaine optique et de le transformer en signal électrique. Une photodiode peut être représentée par une source de courant I_{ph} (dépendant de l'éclairement) (Figure A.1) [1].

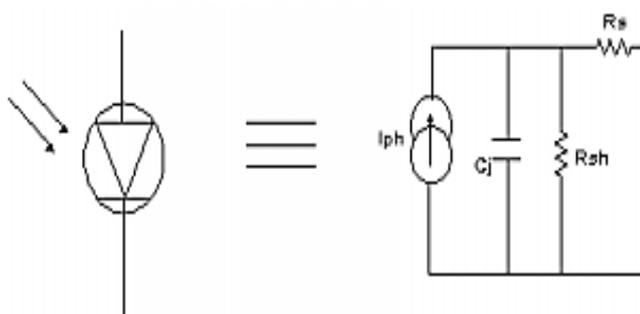


Figure A.1 : Schéma électrique équivalent de la photodiode [2].

La réponse spectrale est un graphique qui exprime la sensibilité de la photodiode en pourcentage en fonction de la longueur d'onde dont la courbe croit puis décroît (Figure A.2). Nous observons un maximum sur la courbe suivante, qui correspond au maximum de la sensibilité de la photodiode [2, 3]: la photodiode est très sensible à la longueur d'onde correspondante, sa réponse est optimale pour cette longueur d'onde.

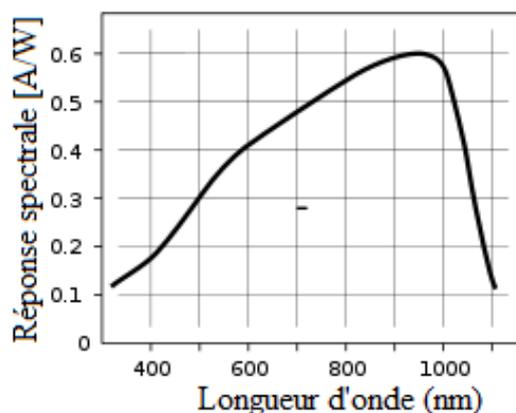


Figure A.2 : **Courbe de réponse typique d'une photodiode bpw34 [3]**

A.1.2/ La CCD

Un composant électronique photosensible servant à convertir un rayonnement électromagnétique (UV, Visible ou IR) en un signal électrique analogique. Ce signal est ensuite amplifié, puis numérisé par un convertisseur analogique-numérique et enfin traité pour obtenir une image numérique. Le capteur est donc le composant de base des appareils photo et des caméras numériques, l'équivalent du film (ou pellicule) en photographie argentique.

Une CCD transforme les photons lumineux reçus en paires électron-trou par effet photoélectrique dans le substrat semi-conducteur [4], puis collecte les électrons dans le puits de potentiel maintenu au niveau de chaque photosite (Figure A.3). Le nombre d'électrons collectés est proportionnel à la quantité de lumière reçue. À la fin de l'exposition, les charges sont transférées de photosite en photosite par le jeu de variations de potentiel cyclique appliqué aux grilles (bandes conductrices horizontales, isolées entre elles par une couche de SiO₂) jusqu'au registre horizontal [5].

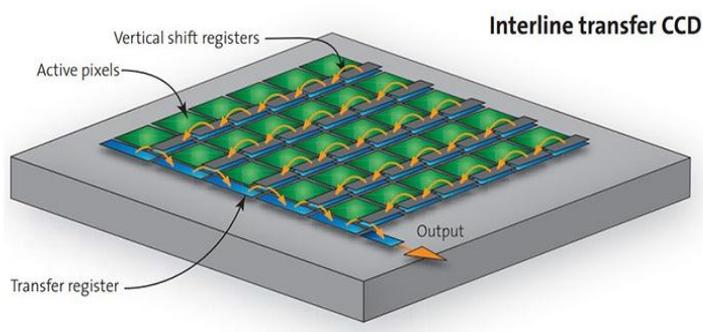


Figure A.3 : **Un principe de fonctionnement d'un capteur CCD**

A.1.3/ La photorésistance

Une photorésistance est un composant dont la valeur en Ohms dépend de la lumière à laquelle il est exposé. Nous la désignons aussi par LDR (Light Dependent Resistor = résistance dépendante de la lumière).

La principale utilisation de la photorésistance est la mesure de l'intensité lumineuse (Figure A. 4), Elle est fortement concurrencée par la photodiode dont le temps de réponse est beaucoup plus court. Les matériaux utilisés sont généralement du Sulfure ou du Séléniure de Cadmium qui se comportent comme des semi-conducteurs [6, 7].

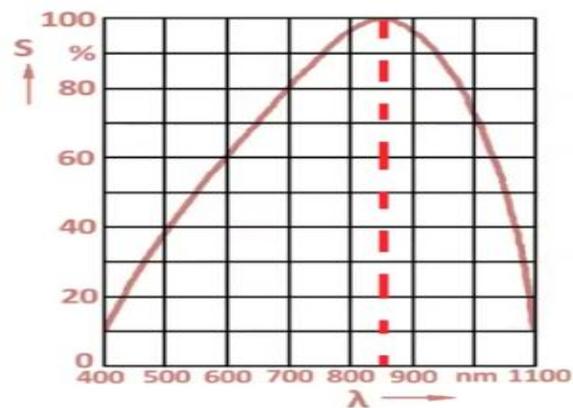


Figure A.4 : Courbe de réponse typique d'une photorésistance

Références Bibliographiques

- [1] Chen. Z et al., Moving toward optoelectronic logic circuits for visible light: a chalcogenide glass single-mode single-polarization optical waveguide switch, *Applied Optics*, vol 56, (2017).
- [2] Elizabeth A. W. S., Improving the calibration of silicon photodiode pyranometers, *Meteorology and Atmospheric Physics*, 2018, <https://doi.org/10.1007/s00703-018-0624-3>.
- [3] Choong. E.J et al., Rapid virus diagnostic system using bio-optical sensor and microfluidic sample processing, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol 255, pp.2399-2406, (2018).
- [4] Rastogi. P. K, Inaudi. D., *Trends in Optical Non-Destructive Testing and Inspection*, 1st Edition, Elsevier, (2000).
- [5] Valery. V. T., *Handbook of optical sensing of Glucose in biological Fluids and tissues*, CRC Press, (2009).
- [6] Xingyan. J et al., LDR reverses DDP resistance in ovarian cancer cells by affecting ERCC-1, Bcl-2, Survivin and Caspase-3 expressions, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol 102, pp. 549-554, (2018).
- [7] Yikai. S., Low temperature readout circuit characteristics of low dimensional compound semiconductor photodetectors, *SPIE International Conference on Optoelectronics and Microelectronics Technology and Application – China*, vol 10244, (2016).

RESUME

La diffusion optique résulte de l'interaction de la lumière avec la matière dans laquelle la direction du rayonnement incident est modifiée par des hétérogénéités présentes dans le milieu et constituant des différents indices de réfraction. La diffusion résulte de plusieurs mécanismes complémentaires: réflexion et réfraction sur ces interfaces, diffraction des faisceaux, etc. La diffusion de lumière joue un rôle important dans la distribution spatiale des photons et de l'énergie dans les milieux diffusants.

Notre travail consiste à étudier les milieux biologiques par la diffusion de la lumière, Des mesures ont été faites sur des lames contenant des coupes histologiques. Ces dernières ont été préparées au niveau du Laboratoire d'Anatomie Pathologique -CHU Sétif- et en collaboration avec le laboratoire GREMI de l'université d'Orléans.

Les résultats obtenus grâce à la technique optique mise au point dans les laboratoires d'Optique Appliquée- Université de Sétif1 et GREMI de l'Université d'Orléans ont permis de dégager le paramètre taille indiquant la présence d'une pathologie, plusieurs paramètres sont en voie d'exploration. Les résultats comparés à l'étude microscopique sont en bonne corrélation.

ملخص

ينتج الانتثار الضوئي عن تفاعل الضوء مع المادة حيث يتم تغير اتجاه الإشعاع فينتشر بطريقة غير منتظمة بسبب عدم التجانس الموجود في الوسط والذي يشكل عدة معاملات انكسار. وينتج الانتثار عن عدة آليات تكميلية: الانعكاس والانكسار على هذه السطوح البينية، حيود الحزمة الضوئية... إلخ. يلعب إنتثار الضوء دورًا مهمًا في التوزيع المكاني للفوتونات والطاقة في الوسائط المنتشرة.

الهدف من هذا المشروع هو دراسة الوسائط البيولوجية عن طريق تحليل المعطيات التي يحملها الضوء المنتثر نتيجة تفاعل مع هذه الأخيرة ، وقد أجريت القياسات على شرائح تحتوي على أنسجة بيولوجية. تم إعداد هذا الأخيرة في مختبر التشريح المرضي - المستشفى الجامعي سطيف - وبالتعاون مع مختبر طاقات الوسائط المشحونة في جامعة أورليان فرنسا، النتائج التي تم الحصول عليها بفضل التقنية البصرية التي تم تطويرها في المختبر جعلت من الممكن تقدير الأقطار والبنى المورفولوجية للخلايا البيولوجية وهذا ما يساعد في الكشف عن بعض المعلومات والأمراض. نتائج البحث التطبيقي منطقية مقارنة بالصور المجهرية الملتقطة وبرامج المحاكاة المستعملة.

Abstract

Optical scattering results from the interaction of light with the material in which the direction of the incident radiation is modified by heterogeneities present in the medium and constituting different refraction indexes. The light scattering results from several complementary mechanisms: reflection and refraction on these interfaces, beam diffraction, etc. Light scattering plays an important role in the spatial distribution of photons and energy in diffusing media.

Our work is devoted to the study of biological media by light scattering. Measurements were made on slides containing histological sections. The latter were prepared at the Anatomical Pathology Laboratory - Setif Hospital University - and in collaboration with the GREMI laboratory at the University of Orleans.

The results obtained by to the optical technique developed in the laboratory (Applied Optics -Setif university and GREMI -Orleans university) have made it possible to identify the parameter of size indicating the presence of a pathology, several parameters are being explored. The results compared to the microscopic study are in good correlation.