



Identification et contrôle de systèmes biologiques. Application à la thérapie photodynamique

Jean-Baptiste Tylcz

► To cite this version:

Jean-Baptiste Tylcz. Identification et contrôle de systèmes biologiques. Application à la thérapie photodynamique. Automatique / Robotique. Université de Lorraine, 2013. Français. ⟨NNT : ⟩. ⟨tel-01571611⟩

HAL Id: tel-01571611

<https://hal.science/tel-01571611v1>

Submitted on 3 Aug 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Identification et contrôle de systèmes biologiques

Application à la thérapie photodynamique

THÈSE

présentée et soutenue à huis clos le 4 décembre 2013

pour l'obtention du

Doctorat de l'Université de Lorraine

(Mention Automatique, Traitement du Signal et des Images, Génie Informatique)

par

Jean-Baptiste TYLCZ

Composition du jury

<i>Rapporteurs :</i>	M. Édouard LAROCHE	Pr. Université de Strasbourg
	M. Guillaume MERCÈRE	MdC. Université de Poitiers
<i>Examineurs :</i>	Mme. Muriel BARBERI-HEYOB	Pr. Université de Lorraine
	M. Thierry BASTOGNE	Pr. Université de Lorraine (Directeur de thèse)
	M. Éric BULLINGER	Pr. Université de Liège (Co-directeur de thèse)
	M. Serge MORDON	Pr. INSERM Lille

Mis en page avec la classe thesul.

Remerciements

Avant toutes choses, je souhaiterais commencer par remercier les membres du jury qui me font l'honneur de participer à l'examen de mes travaux.

Merci donc à Serge Mordon, Professeur à l'INSERM de Lille, pour avoir accepté de présider mon jury.

Ma reconnaissance va également à Édouard Laroche, Professeur de l'Université de Strasbourg, ainsi qu'à Guillaume Mercère, Maître de Conférences de l'Université de Poitiers, pour l'intérêt tout particulier qu'ils ont su porter à mes travaux de thèse ainsi que pour leurs remarques et conseils des plus éclairés.

Indéniablement, il me faut remercier Thierry Bastogne, Professeur de l'Université de Lorraine. Pour ton dévouement, la qualité exceptionnelle de ton encadrement (ce n'est pas pour rien que j'ai pris contact avec toi en particulier lorsque j'ai voulu faire une thèse!), pour les échanges scientifiques et les discussions plus décontractées aussi. Pour avoir su être à l'écoute et m'avoir considéré comme un collègue et non comme un étudiant. Pour tout ça et pour le reste également, je te remercie, Thierry.

Je souhaiterais également remercier Éric Bullinger, Professeur Assistant de l'Université de Liège pour avoir accepté de co-encadrer cette thèse. C'est sans conteste à cette collaboration au sein de la Grande Région que je dois mon financement et donc ces trois dernières années de ma vie.

Rien n'aurait été également possible sans le soutien de Muriel Barberi-Heyob, Professeur de l'Université de Lorraine. Merci donc, Muriel, pour ta gentillesse ainsi que pour le savoir sur la thérapie photodynamique et les nanoparticules que tu as su partager avec moi.

Les échanges scientifiques ont été nombreux en trois ans, certains plus mémorables que d'autres mais aucun n'a jamais été inutile. Il me sera bien difficile de remercier tous mes interlocuteurs individuellement, d'une part parce qu'il serait sans doute de mauvais ton de rédiger des remerciements longs de 75 pages, mais aussi et surtout, je le crains, parce que ma mémoire me fait défaut. Néanmoins, il me paraît important de citer quelques personnes comme Simona Dobre, Alain Richard, Hugues Garnier, Hamanou Benachour, Denise Bechet, Noémie Thomas-Jasniewski, Béatrice Faivre et Karima El Alaoui qui ont participées de près ou de loin aux travaux présentés ci-après et de leur adresser mes plus sincères remerciements.

Un énorme merci à Sabine et Christelle qui se sont démenées face à un des plus fourbes et des plus chronophages fléaux de notre siècle, à savoir "l'Administration". Courage mesdames, la nouvelle génération compte sur vous!

Une pensée pour toutes les personnes que j'ai côtoyées chaque jour au laboratoire, que ce soit sur le campus de la faculté des sciences ou de médecine. Pour la gentillesse et l'accueil dont vous avez tous su faire preuve à mon égard, mille mercis.

Pour terminer, j'ajouterai que les remerciements au début d'un manuscrit de thèse sont souvent considérés comme une petite parenthèse de liberté dans un ouvrage dont la rédaction est régie par des règles strictes mais nécessaires. Nous pourrions les comparer à une petite bulle où

l'auteur mettrait en exergue ses sentiments pour les personnes qui ont comptées. Cependant, de mon point de vu, il est des choses qu'on ne dit pas. Des choses qu'il suffit de faire pour que leur sens devienne évident. Du moins, c'est comme ça que ma pudeur m'ordonne de fonctionner. Aussi, au crépuscule de cette aventure, lorsque je me retourne et me rends compte que ces 10 années d'études à Nancy et avant ça au lycée avaient fait naître des amitiés fortes, et même parfois plus, sans lesquelles je ne serais jamais devenu l'homme que je suis, il me paraît alors évident qu'aucun mot sur aucune page ne pourrait être à la hauteur de la réalité. À Vous, qui je l'espère Vous reconnaitrez, parce que Vous étiez là lorsque cela comptait, j'espère avoir été à la hauteur et Vous garder encore un long moment à mes côtés.

Et puis il est d'autres choses, au dessus de l'amitié et du reste. Des choses qui coulent dans les veines, qui sont acquises et qui pourtant ne cessent de vous étonner, de vous encourager, de vous réconforter et qui ne vous abandonnent jamais. "Donnez-moi un point fixe, un levier et je soulèverai la Terre" a dit Archimède, pour ma part, un soutien indéfectible comme seuls savent l'accorder un père et une mère, m'aura suffi. À Vous, à qui je dois tout, je dédis cet ouvrage.

*"Si on cueille pas les cerises tant qu'elles sont sur l'arbre et bien on s'ra tintin pour le clafoutis."
Le Roi Loth, Kaamelott.*

Table des matières

Table des figures	ix
Introduction générale	1

Partie I Identification et contrôle de la thérapie photodynamique

Chapitre 1 Introduction à la thérapie photodynamique	5
1.1 Introduction à la thérapie photodynamique	5
1.1.1 Historique	6
1.1.2 Facteurs régissant l'efficacité du traitement	9
1.1.3 Mécanismes d'éradication tumorale après PDT	18
1.1.4 Condition expérimentale : étude <i>in vivo</i>	20
1.2 Phase phototoxique du traitement <i>in vivo</i>	25
1.2.1 Réactions photochimiques	25
1.2.2 Construction d'un modèle	29
1.3 Conclusion	31
Chapitre 2 Modélisation, estimation et asservissement du photoblanchiment	33
2.1 Motivation principale	33
2.2 Simulation du modèle physique	34
2.2.1 Inconvénients du modèle physique	35
2.3 Identification d'un modèle simplifié de photoblanchiment linéaire par parties	36
2.3.1 Caractérisation d'une structure de modèle linéaire par morceaux . . .	36
2.3.2 Application au photoblanchiment dans un contexte idéal	39
2.3.3 Réduction de la structure du modèle	40
2.3.4 Identification d'une structure de modèle de type boîte grise	41

2.3.5	Représentation d'état augmentée pour prendre en compte un photoblanchiment parasite du système de mesure	44
2.3.6	Identification à partir de données <i>in vitro</i>	46
2.4	Observateur de photoblanchiment	48
2.4.1	Observateur de Kalman	48
2.5	Asservissement de la trajectoire de photoblanchiment	50
2.5.1	Signal d'activation	51
2.5.2	Algorithme d'asservissement	52
2.5.3	Test <i>in vitro</i>	53
Chapitre 3 Dispositif pilote RAPTOR		57
3.1	État de l'art des plateformes d'expérimentation	57
3.2	Analyse des demandes de brevets	60
3.3	Analyse des spécifications du système RAPTOR	61
3.4	Choix des composants	62
3.4.1	Module traitement	62
3.4.2	Module spectrofluorimétrie	63
3.4.3	Module RAPTOR	64
3.5	Intégration et validation des modules	65
Conclusion et perspectives de la première partie		69

Partie II Identification de systèmes biologiques à partir de séquences d'images : 3 cas d'étude 71

Introduction 73

Chapitre 1 Identification de la pharmacocinétique intratumorale de nanoparticules 75

1.1	Introduction	75
1.2	Expérimentation <i>in vivo</i>	77
1.2.1	Modèle animal et tumeur xénogreffée	77
1.2.2	Préparation des nanoparticules pour l'étude <i>in vivo</i>	78
1.2.3	Imagerie par résonance magnétique	79
1.3	Segmentation automatique de tumeurs cérébrales	79
1.4	Identification d'un modèle à deux compartiments	80
1.4.1	Modélisation	81

1.4.2	Identifiabilité	82
1.4.3	Etude comparative de deux approches d'identification	83
1.4.4	Résultats d'identification et tests de validation du modèle	84
1.5	Planification d'expériences <i>a posteriori</i>	89
1.5.1	Algorithme d'estimation de t_{0_2}	89
1.5.2	Résultats	90
1.6	Discussion	91
1.7	Conclusions et perspectives	92
Chapitre 2 Analyse de jonctions communicantes à partir d'images FRAP		95
2.1	Introduction	95
2.2	Expérimentation <i>in vitro</i>	97
2.2.1	Lignées cellulaires, culture monocouche et sphéroïde	97
2.2.2	<i>Gap-Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (Gap-FRAP)	97
2.3	Caractérisation du Gap-FRAP fondée sur l'analyse d'un modèle boîte noire	98
2.3.1	Traitement des données	98
2.3.2	Sélection de la structure de modèle	99
2.3.3	Estimation paramétrique	101
2.3.4	Résultats d'estimation	101
2.3.5	Tests d'hypothèses statistiques	101
2.4	Discussion	101
2.5	Conclusions et perspectives	104
Chapitre 3 Premiers travaux sur la modélisation du phénomène d'angiogénèse tumorale		105
3.1	Introduction	105
3.2	Méthode d'étude <i>in vivo</i> de l'angiogénèse	106
3.2.1	Expérimentation	107
3.3	Traitement des images	108
3.3.1	Segmentation	108
3.3.2	Grandeurs observées	111
3.4	Modélisation du phénomène d'angiogénèse	111
3.5	Perspectives d'identification	113
Conclusion de la seconde partie		115

Conclusions générales et perspectives	117
Annexe A Représentation LPV-SS	119
A.1 Mise en forme LPV-SS	119
A.2 Identification des systèmes LPV	120
Bibliographie	121

Table des figures

1.1	Historique de la PDT, modifié de [1]. Références bibliographiques employées dans la figure : [2–13]	7
1.2	Principe de la thérapie photodynamique	8
1.3	Schéma-bloc de la PDT : $u_P(t)$ désigne l'apport du PS ; $u_L(t)$ le signal d'illumination de la zone tumorale, $u_O(t)$ l'apport en oxygène moléculaire et $v(t)$ le volume de la tumeur.	8
1.4	Carte des interactions lumière-tissus (la puissance d'une source laser en fonction du temps d'exposition). Les cercles ne donnent qu'une estimation approximative des paramètres laser associés, extrait de [14]. Plusieurs effets peuvent être soulignés : effet photochimique, effet photothermique, effet photoablatif et effet photothermique.	11
1.5	Principaux phénomènes de l'interaction lumière – tissus : réflexion, réfraction, diffusion et absorption	12
1.6	Réflexion et réfraction : a) Représentation graphique des deux phénomènes, b) Réflexion de la peau humaine (extrait de [15]). La courbe de réflectance est définie par le rapport de l'énergie réémise sur la quantité d'énergie reçue et cela pour toutes les longueurs d'onde couvrant le spectre visible, voire le proche infrarouge et l'ultraviolet.	12
1.7	Spectres d'absorption des principales molécules biologiques (extrait de [15]). En optique, le coefficient d'absorption est défini par le rapport entre l'absorbance et la longueur du chemin parcourue par le rayon lumineux.	13
1.8	Profondeur de pénétration de la lumière dans la peau pour différentes longueurs d'onde (extrait de [15])	15
1.9	Cette figure illustre le fait que pour une profondeur de pénétration donnée (dépendante de la longueur d'onde), l'augmentation même considérable du diamètre du spot ne permet pas d'obtenir une action en profondeur significativement différente (extrait de [15])	16
1.10	Mécanismes de destruction tumorale après PDT, extrait de [16], avec ERO - espèces réactives de l'oxygène	18
1.11	Spectres d'absorption (à gauche) et d'émission (à droite) de TPC–Ahx–ATWLPPR dans l'éthanol, issu de [17]	21
1.12	Représentation schématique d'une expérience <i>in vivo</i> : u_L représente la densité de puissance lumineuse générée par la source laser (un signal carré, avec période 1 min) et y est la mesure d'intensité de fluorescence recueillie pendant le t_{off} du laser.	22
1.13	Spectres de fluorescence recueillis lors des expériences <i>in vivo</i> , pour des longueurs d'onde situées entre 600 nm et 730 nm et pour tous les instants de mesure t_k , avec $k \in \{1, \dots, 126\}$.	23

1.14	Représentation graphique de la procedure de calcul de l'intensité de fluorescence à l'instant $T_1 = 37 s$. La courbe en bleu représente le spectre mesuré, tandis que celle en vert (tirets) correspond aux spectre estimé (à partir de l'éq. 1.9 avec $q = 5$). La courbe en bleu ciel (pointillé) correspond au spectre sans la 3ème composante (la fluorescence du PS), tandis que celle en rouge représente la composante gaussienne située à 661 nm, d'aire $\hat{a}_3 = 0.3724$ et de largeur $\hat{\sigma}_3 = 13.4525$. R_1^2 désigne les coefficients de détermination entre les spectres mesurés et estimés.	24
1.15	Intensité de fluorescence (gauche, $\times$) correspondant au paramètre $\hat{a}_3$ du modèle de mélange Gaussien (1.9) pour tous les instants de mesure t_k , avec $k = 1, \dots, 126$ (durée totale de l'expérience : 42 min = 2520 s), et signal d'illumination (droite, en vert)(un signal carré, d'amplitude 95 mW/cm ² et de période T = 1 min). . . .	24
1.16	Diagramme de Jablonski des photoréactions induites durant la phase cytotoxique en PDT	26
1.17	Les réactions photochimiques de type I et II faisant intervenir le PS à l'état triplet suite à son activation par la lumière	28
2.1	Résultats de simulation du modèle physique des photoréactions de type II issues de la PDT	34
2.2	Signaux d'entrée $u_1(t_k)$, $u_2(t_k)$ et $u_3(t_k)$ du modèle ARX	40
2.3	Réponse du modèle empirique simplifié (modèle ARX en rouge) comparée à la réponse numérique du simulateur (en bleu) en haut et les résidus associés en bas	41
2.4	A gauche les signaux d'entrées $x(t_k)b(t_k)$, $u(t_k)$ et $u(t_k)b(t_k)$. À droite, la réponse du modèle d'état de type boîte grise (en rouge) comparée aux données mesurées en haut et les résidus associés en bas	43
2.5	Tracé des résidus en fonction des mesures (en haut), tracé quantile-quantile (en bas à gauche) et histogramme des résidus (en bas à droite)	44
2.6	Photoblanchiment "parasite" observé (à gauche) lors d'une expérience <i>in vitro</i> de spectrofluorimétrie (illustrée à droite)	45
2.7	A gauche les signaux d'entrées $u_1(t_k) = x_t(t_k)b(t_k)$, $u_2(t_k) = u_t(t_k)$, $u_3(t_k) = u_t(t_k)b(t_k)$ et $u_4(t_k) = u_p(t_k)$. À droite, la réponse du modèle d'état de type boîte grise (en rouge) comparée aux données mesurées en haut et les résidus associés en bas	47
2.8	Tracé des résidus en fonction des mesures (en haut), tracé quantile-quantile (en bas à gauche) et histogramme des résidus (en bas à droite)	48
2.9	Histogrammes de répartition des paramètres estimés	49
2.10	Schéma de la boucle d'asservissement du photoblanchiment	51
2.11	Déroulement de l'expérience	52
2.12	Deux exemples d'asservissement de photoblanchiment issus d'expériences <i>in vitro</i>	54
3.1	Schéma de la plateforme d'expérimentation mise au point par Niedre, [18]	58
3.2	Présentation des mesures de luminescence de l'oxygène singulet (à gauche) et de la fluorescence du PS (à droite) en fonction de sa concentration, [19]	59
3.3	Clichés de luminescence de l'oxygène singulet et de fluorescence du PS sur une souris saine (à gauche) et sur une souris atteinte d'une tumeur (à droite), [19] . .	59
3.4	Schéma de la plateforme d'expérimentation mise au point par Dysart, issu de [20]	59
3.5	Cycle en V en Ingénierie Système	62
3.6	Diagramme de classe UML de la plateforme MEXICO-PDT décrivant son architecture statique	63

3.7	Schéma bloc du module de traitement	63
3.8	Schéma bloc du module excitation	64
3.9	Schéma bloc du module de spectrométrie	64
3.10	Schéma bloc du module RAPTOR	65
3.11	Plateforme MEXICO intégrée en situation	66
1.1	Schéma représentant la constitution de NP-CONT (à gauche) et NP-PEP (à droite), avec : en jaune, le cœur en oxyde de gadolinium, en violet l'enveloppe de silice, en rouge les molécules de PS, en bleu les polymères hydrophiles (surfactants) et en vert les peptides	78
1.2	Exemple d'une image IRM (a gauche) et de sa région d'intérêt sélectionnée automatiquement	80
1.3	Modèle à deux compartiments de la pharmacocinétique des NP	81
1.4	Exemple d'une prédiction de rétention de nanoparticules	82
1.5	Signaux de mesure (croix bleues) et les sorties estimées (méthode directe en vert et indirecte en rouge)	85
1.6	Exemple de résultat du test de blancheur pour le rat 3 avec en (a) la fonction d'autocorrelation à l'intérieur d'un intervalle de confiance à 99 % pour le modèle à temps continu et en (b) une fonction qui sort des bornes pour le modèle à temps discret	86
1.7	Déroulement des expériences	89
1.8	Coefficients de variation des paramètres estimés pour différentes valeurs de t_{0_2} pour le Rat 1	91
1.9	Comparaison des moyennes des paramètres pharmacocinétiques ainsi que des écarts-types associés	92
2.1	Illustration du transfert de molécules fluorescentes par GJIC. (ROI : <i>Region of Interest</i>)	96
2.2	(a) Image de fluorescence par microscopie confocale d'une section de sphéroïde (5 μm d'épaisseur) de cellules KB chargée avec 0.5 μM de calcéine AM et (b) observation macroscopique d'une sphéroïde entière de FaDu	98
2.3	Processus de discrimination, de l'expérimentation <i>in vitro</i> aux résultats finaux	99
2.4	Description entrée/sortie du phénomène de Gap-FRAP	99
2.5	Exemple de résultat du test de blancheur : (a) la fonction d'autocorrelation à l'intérieur d'un intervalle de confiance à 99 % pour KB et en (b) celle pour FaDu	102
2.6	Distribution statistique des estimés	102
2.7	Exemples de sorties simulées pour KB (à gauche) et FaDu (à droite), chacune accompagnée du tracé de leurs résidus	104
3.1	Chambre dorsale posée sur une souris <i>nude</i>	107
3.2	Déroulement des expérimentations <i>in vivo</i>	108
3.3	Exemple d'observation macroscopique à travers la fenêtre dorsale. On y distingue la tumeur plus claire au centre ainsi que le réseau vasculaire qui la parcourt	109
3.4	Exemple d'application du filtre de Savitzky-Golay sur la 500 ^{ème} ligne d'une image	110
3.5	Résultat de la segmentation avec en blanc les vaisseaux sanguins détectés dans la tumeur (région d'intérêt)	110
3.6	Résultat de la squelettisation	111

3.7 Exemples de signaux moyens (ainsi que leurs écarts types) pouvant être extraits des séquences d'images (7 souris traitées, 9 souris contrôles)	112
---	-----

Introduction générale

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au sein du Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN, Université de Lorraine, CNRS UMR 7039) dans le département Santé Biologie Signal (SBS). Ils s'inscrivent dans le domaine interdisciplinaire relativement récent de la Biologie Intégrative. Ce cadre de recherche vise à répondre à des questions d'ordre biologique grâce à l'application d'outils et de méthodes d'autres disciplines. Il s'agit, dans ce contexte intégratif, de permettre l'exploration, la collecte ainsi que la compréhension de nouvelles données au travers la production de modèles mathématiques afin d'expliquer, de prédire, voire de contrôler, des fonctions biologiques, le plus souvent dans une optique thérapeutique.

Nous nous sommes concentrés ici sur des applications biologiques relatives au cancer et plus particulièrement à leur traitement. D'après les données de GLOBOCAN 2008¹, le cancer était à l'origine de 13 % de la mortalité mondiale en 2008, soit 7.6 millions de décès. Les projections de l'époque prévoyaient une mortalité due au cancer qui pourrait dépasser les 13.1 millions de décès en 2030. Autant dire que tous les angles de recherche pouvant aider à vaincre ce fléau sont devenus une priorité dans beaucoup de pays, la Biologie Intégrative en fait partie.

La première partie de mes travaux est consacrée à une recherche technologique dont l'objectif est le développement d'un dispositif innovant permettant de contrôler plus efficacement la phase cytotoxique de la thérapie photodynamique (PDT). Cette thérapie contre le cancer est actuellement utilisée et développée au CRAN depuis 1988 en collaboration avec le Centre Hospitalier Universitaire de Nancy et de l'Institut de Cancérologie de Lorraine dans le cadre de recherches interdisciplinaires réunissant biologistes, médecins et automaticiens. Les verrous actuels freinant le développement clinique de cette thérapie sont (1) le manque de reproductibilité inter-patient des réponses du traitement et (2) l'amplitude de la douleur ressentie par les patients. La solution proposée pour répondre à ces deux points de blocage repose sur une stratégie d'asservissement du photoblanchiment. Ce phénomène correspond à la dégradation progressive de l'agent photosensibilisant par les espèces réactives de l'oxygène, espèces cytotoxiques produites pendant le traitement. Le système d'asservissement développé utilise un observateur d'état qui a nécessité de résoudre en pratique des problèmes d'identifiabilité et d'identification d'un processus non-linéaire. Le résultat de ce travail est matérialisé par une plateforme pilote opérationnelle qui fut validée par des tests *in vitro*.

La seconde partie de l'étude s'inscrit dans le cadre d'une recherche appliquée sur le thème de l'identification à temps continu de systèmes biologiques à partir de séquences d'images au travers de trois cas d'études aux échelles cellulaire, tissulaire et animale.

Une première étude est dédiée à l'identification de la pharmacocinétique intratumorale de

1. Projet mis en place par l'Organisation Mondiale de la Santé visant à fournir des statistiques mondiales (incidence, mortalité, *etc.*) sur les principaux types de cancers.

nanoparticules (NP) multifonctionnelles dans des cerveaux de rats. Elle propose l'introduction d'une méthode d'identification à temps continu dans le protocole d'analyse des caractéristiques pharmacocinétiques des nanoparticules. Ce sont les paramètres du modèle qui sont examinés dans une étude comparative de l'incorporation et de l'élimination de deux catégories de nanomédicaments. Le modèle est également utilisé dans la proposition d'un plan d'expériences *a posteriori*, dans le but d'optimiser l'usage de l'IRM lorsque les données initiales ne permettent pas d'assurer une précision acceptable sur les résultats.

Une seconde étude est dédiée à la modélisation à partir de données expérimentales de la fonctionnalité des jonctions communicantes intercellulaires. L'objectif est de souligner la pertinence des techniques d'identification de systèmes, comparativement aux approches de modélisation par équations à dérivées partielles, pour établir un diagnostic fiable sur la différence de fonctionnalité entre deux lignées de cellules cancéreuses. L'enjeu serait à terme de pouvoir ainsi proposer un nouveau protocole de diagnostic, capable de discriminer les cellules cancéreuses de cellules saines. Encore faut-il pouvoir disposer d'une technique relativement simple à l'usage et si possible non supervisée.

Enfin, un troisième cas d'étude aborde le problème de l'identification d'une cohorte de systèmes à partir de petits échantillons de données. En biologie animale les études sont toujours menées sur des groupes d'animaux. Il est tout-à-fait possible d'appliquer des techniques d'identification à chacun des animaux du groupe. Toutefois, cela revient à augmenter sensiblement le nombre total de paramètres à estimer. Cela peut-être handicapant lorsqu'on dispose d'une trentaine de points seulement dans les signaux de mesure. Nous posons ici un projet de recherche destiné à tester la pertinence d'une solution consistant à introduire une part stochastique dans une structure de modèle choisie afin d'en estimer globalement les paramètres.

Première partie

Identification et contrôle de la thérapie photodynamique

Introduction à la thérapie photodynamique

Sommaire

1.1	Introduction à la thérapie photodynamique	5
1.1.1	Historique	6
1.1.2	Facteurs régissant l'efficacité du traitement	9
1.1.3	Mécanismes d'éradication tumorale après PDT	18
1.1.4	Condition expérimentale : étude <i>in vivo</i>	20
1.2	Phase phototoxique du traitement <i>in vivo</i>	25
1.2.1	Réactions photochimiques	25
1.2.2	Construction d'un modèle	29
1.3	Conclusion	31

Depuis 1988, le CRAN travaille en partenariat étroit avec les médecins et les biologistes sur la thérapie photodynamique, conjointement avec le Centre Alexis Vautrin (Centre de Lutte contre le Cancer de Nancy). Cette thérapie implique l'action combinée de trois composantes : un agent photosensibilisant, l'oxygène et de la lumière.

Ce chapitre commence par décrire les généralités sur la thérapie photodynamique : historique, étude des facteurs régissant l'efficacité du traitement, mécanismes d'éradication tumorale, ainsi qu'une description du cadre expérimental. Ensuite nous nous concentrons sur la phase d'activation de l'agent photosensibilisant. Cette phase suppose une séquence de réactions ayant comme finalité la production d'espèces réactives de l'oxygène. Un modèle des photoréactions, constitué de six équations différentielles non linéaires, est développé à la fin du chapitre.

1.1 Introduction à la thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique ou PDT (PhotoDynamic Therapy) est préconisée dans le traitement de certaines maladies dermatologiques, ophtalmologiques et en oncologie. Celle-ci associe l'action conjuguée d'une molécule photoactivable (agent photosensibilisant ou photosensibilisateur, PS), de la lumière et de l'oxygène. Les premières applications cancérologiques datent de 1975 (Dougherty aux États-Unis et Hayata au Japon). Cette thérapie se distingue de la photochimiothérapie qui n'implique pas l'oxygène et de la photothérapie utilisant les propriétés intrinsèques de la lumière.

Dans cette première partie nous présentons une synthèse bibliographique, issue en majeure partie des mémoires de thèse de Lorraine Tirand [21] et Noémie Thomas [16]. Nous commençons par un bref historique de cette thérapie. Ensuite, les propriétés « idéales » d'un agent photosensibilisant sont détaillées, suivies par les différents mécanismes d'éradication tumorale et la description du cadre expérimental.

1.1.1 Historique

Les effets thérapeutiques de la lumière sont connus depuis l'Antiquité. Les égyptiens utilisaient déjà la lumière combinée à des substances naturelles pour traiter des maladies de peau. Ce n'est qu'à la fin du XIX^{ème} siècle que le concept de photosensibilisation apparaît lorsque Oscar Raab décrit pour la première fois le phénomène phototoxique en associant un colorant (l'acridine) à la lumière [2]. En 1903, Jesionek et von Tappeiner (alors professeur de Raab) traitent un cancer cutané par application topique d'éosine suivie d'une exposition à la lumière blanche. En 1904, Tappeiner suppose que l'oxygène est essentiel pour le processus et introduit le terme « d'action photodynamique » [22]. Cette supposition sera confirmée en 1909 par Hasselbach qui rédigera le premier rapport sur le caractère phototoxique de l'hématoporphyrine (Hp), un dérivé de l'hème [6]. En 1924, Policard met en évidence la fluorescence spontanée de tumeurs exposées à la lumière ultraviolette, phénomène interprété comme étant dû à l'accumulation de l'Hp endogène (biosynthétisée par le corps) dans les cellules tumorales [23]. En 1948, Figge confirme l'affinité de cette substance pour les tissus tumoraux et suggère la possibilité d'utiliser l'Hp pour localiser les zones tumorales chez l'homme [24]. En 1955, une série d'expériences réalisées par Schwartz prouve que l'hématoporphyrine commerciale n'est pas un produit pur. Il constate que le produit pur qu'il a isolé est moins sélectif au niveau tumoral que le produit commercial [8]. En 1961, Lipson propose de purifier l'Hp par action d'un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique. Le produit obtenu, appelé HpD pour « Hematoporphyrin Derivative » sera utilisé pour traiter des patients atteints de tumeurs cancéreuses du poumon [9]. Il est constitué d'un mélange complexe de porphyrines.

Ce n'est qu'au cours des années 1970, avec les expérimentations de Dougherty, que la PDT connaît un véritable essor. Des traitements à base d'hématoporphyrine dérivée (HpD) et de lumière rouge ont montré de très bons résultats lors d'études précliniques et cliniques [13]. L'HpD a notamment donné naissance à une fraction enrichie en composés actifs, le porfimer sodium ou Photofrin, constitué d'un mélange de porphyrines présentes dans différents états (monomères, dimères et oligomères) ou des liaisons chimiques différentes (éthers et esters) [25].

La Figure 1.1 représente la chronologie des avancées en PDT.

Le principe de cette thérapie, illustré aussi à la Figure 1.2, est le suivant :

- on injecte d'abord dans le milieu² un agent photosensibilisant (PS) (principalement par voie intra-veineuse ou topique) non toxique à l'obscurité. Le PS va ensuite s'accumuler préférentiellement dans les tissus tumoraux plutôt que dans les tissus sains adjacents. Cette phase est connue sous le nom de « phase d'incorporation » (ou phase I) ;
- après un certain intervalle de temps (correspondant à la durée nécessaire à l'incorporation du PS dans les cellules cancéreuses), appelé intervalle drogue-lumière (drug-light interval), ce médicament est activé par une lumière de longueur d'onde et d'irradiance appropriées. Cette deuxième phase est appelée « phase photocytotoxique » (ou phase II). Cette phase d'activation du médicament photoactivable implique une cascade de réactions conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène dont l'oxygène singulet³, principal respon-

2. Le milieu désigne soit une culture, soit un organisme vivant selon le contexte *in vitro*/*in vivo* de l'étude

3. Oxygène singulet – oxygène moléculaire dans son état excité particulièrement réactif.

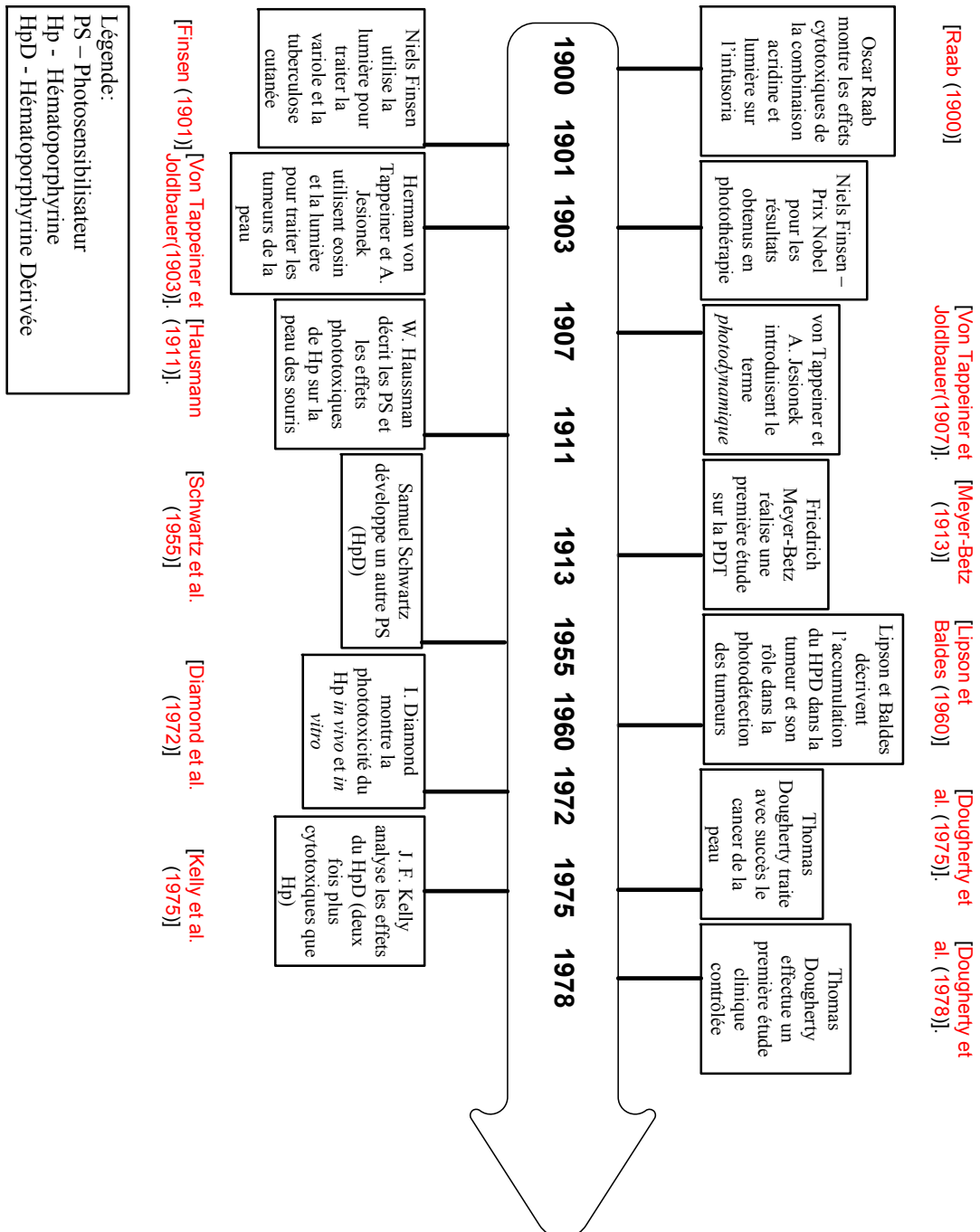


FIGURE 1.1 – Historique de la PDT, modifié de [1]. Références bibliographiques employées dans la figure : [2–13]

sable de la destruction des cellules cancéreuses.

- Les dégâts causés par les espèces réactives de l'oxygène peuvent conduire ultérieurement à deux issues possibles : la survie ou l'éradication du tissu tumoral (phase III).

La Figure 1.2 est une bonne illustration des facteurs régissant l'efficacité du traitement : le médicament (ses caractéristiques chimiques, photophysiques et biologiques), l'intervalle drog-

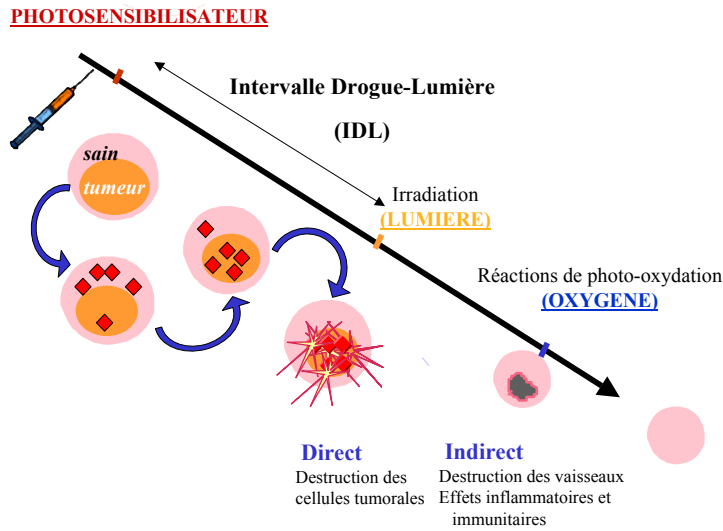


FIGURE 1.2 – Principe de la thérapie photodynamique

lumière (IDL), les caractéristiques du signal lumineux (longueur d'onde, temps d'illumination, intensité lumineuse), les propriétés de l'interaction tissus-lumière et la disponibilité en oxygène moléculaire. Ces facteurs vont être analysés dans la partie suivante dans un cadre d'étude assez général.

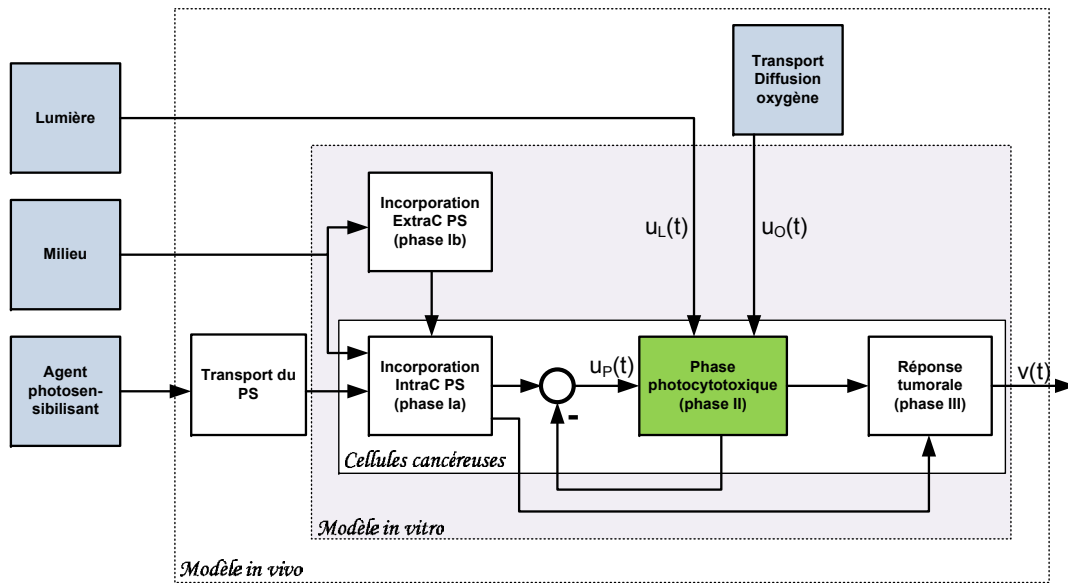


FIGURE 1.3 – Schéma-bloc de la PDT : $u_P(t)$ désigne l'apport du PS ; $u_L(t)$ le signal d'illumination de la zone tumorale, $u_O(t)$ l'apport en oxygène moléculaire et $v(t)$ le volume de la tumeur.

La Figure 1.3 représente ces trois phases du traitement au sein d'un schéma-bloc dans lequel seules les principales variables ont été indiquées. Mon sujet de thèse s'est concentré sur la phase II du traitement.

1.1.2 Facteurs régissant l'efficacité du traitement

Le photosensibilisateur idéal

Comme nous l'avons déjà précisé, la PDT repose sur l'action conjuguée des trois agents : la lumière, la disponibilité en molécules d'oxygène et les propriétés photophysiques des PS.

Les PS de première génération ont été synthétisés dans les années 70. Ils sont des dérivés de l'HpD, Photofrin I et II) se caractérisant par une faible sélectivité pour les tissus cibles, associée à une faible clairance [26]. L'utilisation de PS de première génération présente de nombreux inconvénients qui ont conduit à la définition du PS idéal, devant posséder les caractéristiques chimiques, photophysiques et biologiques répertoriées ci-dessous :

- pureté chimique, composition constante, facilité de synthèse ;
- toxicité à l'obscurité faible, voire nulle ;
- caractéristiques photophysiques spécifiques :
 - coefficient d'extinction molaire élevé, à des longueurs d'onde situées dans la « fenêtre thérapeutique », *i.e.* dans la région rouge du spectre de la lumière visible, voire dans le proche infrarouge (600-850 nm) (voir Figure 1.7), afin de permettre une pénétration tissulaire et une absorption optimale de la lumière par le PS ;
 - bon rendement quantique en oxygène singulet. Pour ce faire, le rendement quantique de formation de l'état triplet du PS doit être élevé ; la durée de vie du PS à l'état singulet excité doit être grande, et son énergie suffisante pour permettre le transfert d'énergie à l'oxygène ;
- solubilité en milieu aqueux, afin de faciliter l'administration systémique ;
- clairance élevée ;
- sélectivité pour le tissu tumoral.

Afin de se rapprocher des caractéristiques de ce PS idéal, de nouveaux PS, dits de deuxième génération, ont été élaborés. Ces PS sont principalement des dérivés de chlorine, bactériochlorine ou phthalocyanine. Ce sont des composés purs avec notamment une bande d'absorption se situant entre 650 et 800 nm.

Le plus souvent, le développement d'agents photosensibilisants consiste à élaborer des composés qui vont naturellement créer des dommages sélectifs vis-à-vis des cellules tumorales. Bien que la majorité des PS ne s'accumule pas dans les cellules cancéreuses de façon sélective, la plupart des études précliniques démontre que les PS sont présents dans les tissus tumoraux en quantité beaucoup plus importante que dans les muscles et la peau [27], ce qui semble être dû à la prolifération rapide des tumeurs et leur physiologie anormale [25]. Contrairement aux vaisseaux sanguins normaux, les néo-vaisseaux tumoraux sont plus perméables ce qui facilite l'épanchement des molécules à travers l'espace interstitiel des tumeurs. Grâce à l'augmentation de perméabilité et de rétention (Enhanced Permeability and Retention, EPR), les agents thérapeutiques sont capables de s'accumuler dans les tissus tumoraux [28]. Bien que la plupart des PS soient des petites molécules, ils se fixent généralement aux protéines plasmatiques et se comportent ainsi comme des macromolécules. Une fois que les PS sont passés à travers la membrane interstitielle tumorale, il leur est nécessaire de s'associer aux membranes ou d'être internalisés dans les cellules cancéreuses pour générer une phototoxicité. Les propriétés photophysiques des PS et leur capacité à se fixer aux protéines plasmatiques jouent un rôle important pour déterminer de quelle façon et avec quelle intensité les PS s'incorporent dans le tissu tumoral [29–31].

Bien que les PS de deuxième génération présentent de nombreuses qualités photodynamiques par rapport aux PS de première génération, des progrès restent à faire pour améliorer leur sélectivité vis-à-vis des tissus tumoraux. Ceci a conduit à l'élaboration de PS de troisième génération,

PS de deuxième génération modifiés de manière à cibler de façon passive (vectorisation) ou active (adressage) les cellules tumorales.

Interaction tissus – lumière

Les ouvrages, traitant de l'interaction tissus-lumière, [14, 15, 32] mettent en évidence la complexité des phénomènes impliqués et l'impossibilité de connaître avec précision le nombre des photons absorbés par les molécules photosensibilisantes.

L'irradiation d'un tissu biologique par un laser génère une grande variété de mécanismes d'interaction, due principalement au grand nombre de paramètres mis en jeu lors de ce type d'interaction :

- les paramètres optiques du tissu (réflexion, absorption, diffusion) et sa structure hétérogène et multicouches⁴, qui conditionnent la pénétration de la lumière dans la peau ;
- les paramètres physiques (thermique et mécanique) de la cible et du tissu environnant ;
- les paramètres liés à la source laser (longueur d'onde, durée d'émission, énergie appliquée, taille du spot, fluence et irradiance) qui influencent les mécanismes d'interaction.

En effet, nous pouvons distinguer, sur la Figure 1.4, quatre catégories d'action de la lumière : effet photochimique⁵, effet photothermique⁶, effet photomécanique⁷ et effet photoablatif⁸.

Nous nous intéressons ici seulement aux effets photochimiques de l'interaction tissus-lumière. Ainsi, la connaissance des propriétés de réflexion, d'absorption et de diffusion d'un tissu choisi est essentielle pour prédire la réussite du traitement (voir aussi Figure 1.5).

Réflexion et réfraction La réflexion et la réfraction sont régies par les lois de Fresnel [33]. Lorsqu'un faisceau de lumière passe d'un milieu à un autre, d'indice différent (comme l'air et la peau), une partie de ce faisceau est réfléchi au niveau de la frontière entre les deux milieux (phénomène de réflexion) alors qu'une seconde partie traverse cette frontière et pénètre l'autre milieu (phénomène de réfraction) (voir Figure 1.6). Dans les milieux opaques, comme la peau, la réfraction est négligée face aux phénomènes d'absorption et de diffusion. La connaissance précise

4. La peau est schématiquement constituée d'une superposition de trois couches d'épaisseurs variables (épiderme, derme, hypoderme) et ayant chacune une composition très hétérogène. L'atteinte sélective d'une cible située en profondeur de cet organe est donc complexe et dépend de nombreux facteurs : la longueur d'onde, la puissance, la dose d'énergie et le temps d'illumination.

5. L'action photochimique est obtenue avec des durées d'illuminations s'étalant de la dizaine de secondes à la dizaine de minutes avec des irradiances très faibles. Cet effet est plus souvent nommé photothérapie dynamique.

6. Le mécanisme photothermique est obtenu avec des durées d'émission allant de quelques centaines de microsecondes à quelques secondes et des irradiances de l'ordre de 10 W/cm^2 à 10^6 W/cm^2 . L'intérêt principal du processus d'interaction du flux laser avec les tissus réside, dans le cas des effets photothermiques, en un processus complexe résultant de trois phénomènes successifs : une conversion de la lumière laser en chaleur, un transfert de chaleur dans le tissu et une réaction tissulaire dépendante de la température. Cette interaction conduit à la dénaturation ou à la destruction d'un volume tissulaire.

7. La génération d'impulsions laser submicrosecondes, associée au fait de pouvoir focaliser quasi ponctuellement le faisceau grâce à la cohérence spatiale des lasers, permet d'obtenir des densités surfaciques de puissance de crête très supérieure au GW/cm^2 qui sont à l'origine des effets photomécaniques. Les interactions de ce type de laser avec les tissus biologiques sont particulières puisque le temps d'interaction est très court par rapport au temps de relaxation thermique du tissu. Ceci permet d'obtenir de hautes températures sans carbonisation notable des tissus adjacents. Ainsi, les effets radiatifs du champ électrique induit par une impulsion laser très brève se manifestent dans un volume extrêmement restreint.

8. L'effet photoablatif, appelé aussi photodécomposition ablative, est basé sur l'utilisation de photons présentant une énergie supérieure à l'énergie de liaisons des molécules biologiques. Le processus photoablatif consiste ainsi en une dissociation ou une rupture de la matière et de l'expulsion des fragments à une vitesse supersonique.

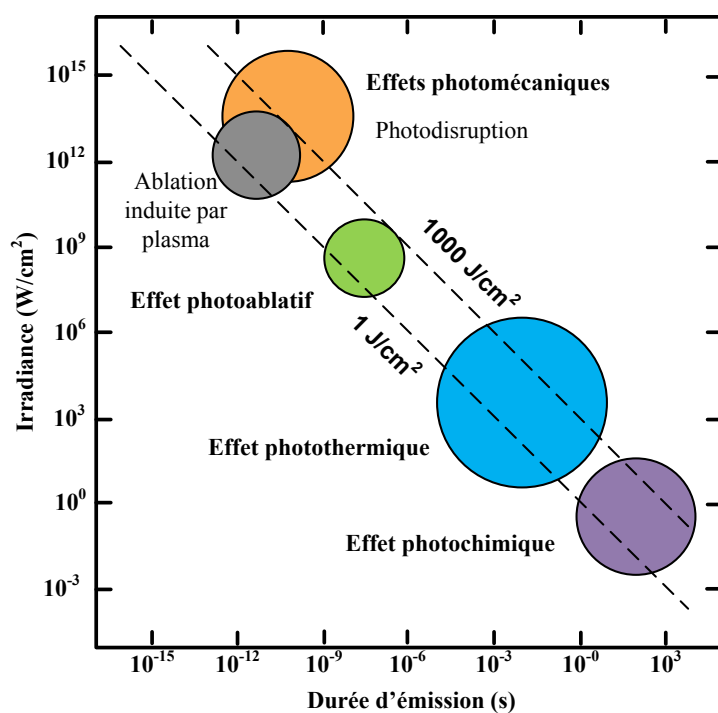


FIGURE 1.4 – Carte des interactions lumière-tissus (la puissance d’une source laser en fonction du temps d’exposition). Les cercles ne donnent qu’une estimation approximative des paramètres laser associés, extrait de [14]. Plusieurs effets peuvent être soulignés : effet photochimique, effet photothermique, effet photoablatif et effet photothermique.

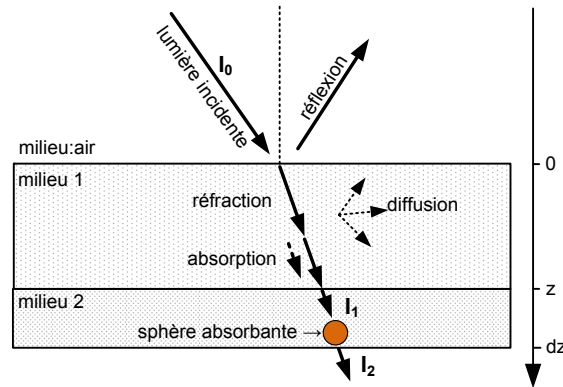


FIGURE 1.5 – Principaux phénomènes de l'interaction lumière – tissus : réflexion, réfraction, diffusion et absorption

de la réflexion de la lumière par les tissus est une nécessité afin d'évaluer la quantité exacte d'énergie qui sera soit absorbée, soit diffusée dans le tissu.

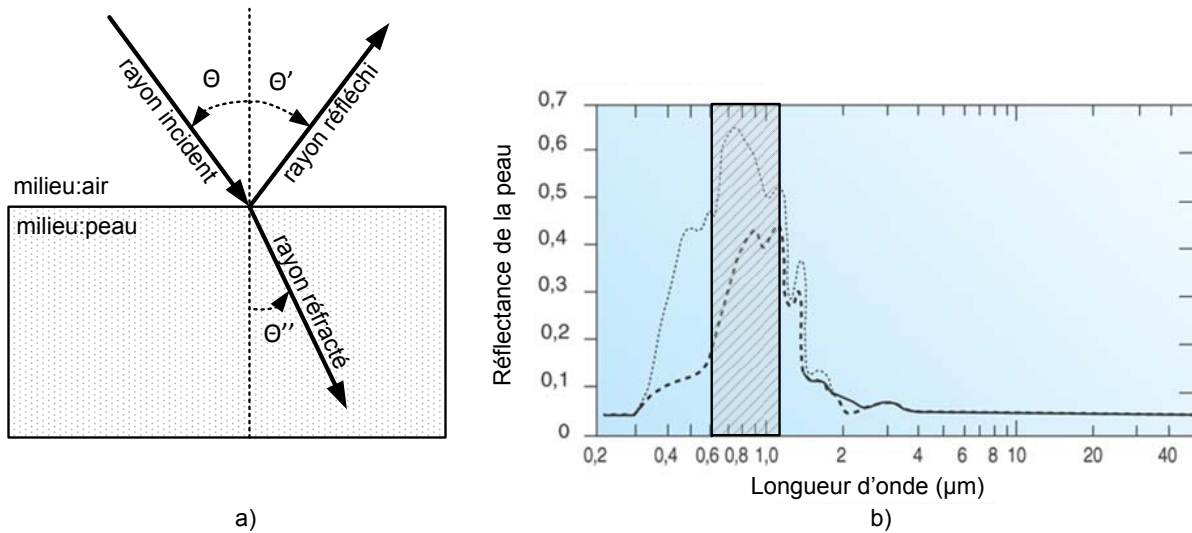


FIGURE 1.6 – Réflexion et réfraction : a) Représentation graphique des deux phénomènes, b) Réflectance de la peau humaine (extrait de [15]). La courbe de réflectance est définie par le rapport de l'énergie réémise sur la quantité d'énergie reçue et cela pour toutes les longueurs d'onde couvrant le spectre visible, voire le proche infrarouge et l'ultraviolet.

Absorbance et diffusion Lorsqu'une onde électromagnétique incidente traverse un matériau non diffusif, son atténuation est seulement due au phénomène d'absorption. Lors de ce processus, l'énergie lumineuse est, soit convertie en chaleur, soit entraîne la photodisruption des molécules.

Alors que l'absorption dans la région infrarouge (IR) est principalement attribuée à l'eau, les protéines absorbent plus dans la région ultraviolet (UV). En ce qui concerne la mélanine et l'hémoglobine, leur absorption se fait principalement dans le spectre visible avec toutefois de fortes variations. L'hémoglobine, constituant principal des tissus vascularisés (comme la peau), présente plusieurs pics d'absorption à 280 nm, 420 nm, 540 nm et 580 nm alors que l'absorption de la mélanine (présente dans l'épiderme) décroît de façon quasi exponentielle en fonction de

la longueur d'onde. Étant donné que ni les macromolécules ni l'eau n'absorbent fortement dans l'infrarouge proche, la « fenêtre thérapeutique » est délimitée entre environ 600 nm et 1200 nm (pour la PDT entre 600 et 800 nm). Dans cette gamme spectrale, le rayonnement pénètre dans les tissus biologiques à une perte inférieure, permettant ainsi le traitement des tissus plus profonds.

La Figure 1.7 représente les spectres d'absorption de molécules biologiques élémentaires : la mélanine, l'hémoglobine, les protéines.

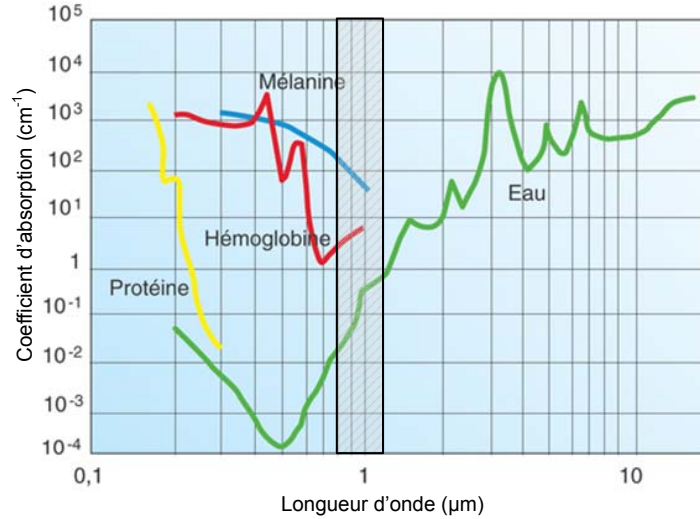


FIGURE 1.7 – Spectres d'absorption des principales molécules biologiques (extrait de [15]). En optique, le coefficient d'absorption est défini par le rapport entre l'absorbance et la longueur du chemin parcourue par le rayon lumineux.

Cependant, la peau n'étant pas un milieu optique idéal, la lumière est soumise d'abord à un phénomène de diffusion optique qui conduit à de multiples modifications de trajectoires liées aux réflexions, réfractions et diffractions présentes dans tout milieu hétérogène comme les tissus vivants.

Dans le rouge et proche infrarouge, où l'absorption de la peau est relativement faible, la diffusion est le mécanisme optique dominant. Ce phénomène conduit à plus forte pénétration de la lumière en profondeur et par conséquent à des volumes illuminés plus importants. La pénétration de la lumière dans la peau dépend donc : du coefficient d'absorption, α_a et du coefficient de diffusion, α_s .

La perte d'intensité de lumière, due à l'absorption et la diffusion, suit une loi de Beer-Lambert

$$I_1 = I_0 \exp(-\alpha_{t,1} \cdot c_1 \cdot z) \quad (1.1)$$

où I_0 représente l'intensité de la lumière incidente, I_1 l'intensité après passage à travers le milieu 1 (peau) de longueur z , tandis que $\alpha_{t,1}$ est le coefficient total d'atténuation du milieu 1, et c_1 est sa concentration en espèces absorbantes. $\alpha_{t,1}$ correspond au coefficient total d'atténuation du milieu 1 et est fonction de α_a et de α_s , voir (1.3). A la Figure 1.5, la zone tumorale correspond au milieu 2. L'intensité de la lumière qui traverse ce milieu s'écrit :

$$\begin{aligned} I_2 &= I_1 \exp(-\alpha_{t,2} \cdot c_2 \cdot dz) \\ &= I_0 \exp(-\alpha_{t,1} \cdot c_1 \cdot z) \exp(-\alpha_{t,2} \cdot c_2 \cdot dz) \end{aligned} \quad (1.2)$$

avec c_2 la concentration en espèces absorbantes du milieu 2 (voir Figure 1.5). Le coefficient total d'atténuation peut ainsi être exprimé comme la somme des deux coefficients, d'absorption (α_a) et de diffusion (α_s) :

$$\alpha_t = \alpha_a + \alpha_s \quad (1.3)$$

Pour des valeurs $\alpha_{t,2} \cdot c_2 \cdot dz \ll 1$ (espèces absorbantes faiblement concentrées), l'équation précédente peut être approchée par :

$$I_2 = I_0 \exp(-\alpha_{t,1} \cdot c_1 \cdot z) \cdot (1 - \alpha_{t,2} \cdot c_2 \cdot dz)$$

L'intensité de la lumière absorbée par les molécules de l'agent photosensibilisant s'écrit comme la différence entre I_2 (la lumière transmise) et I_1 la lumière incidente :

$$\begin{aligned} I_{abs} &= I_2 - I_1 \\ &= I_0 \exp(-\alpha_{t,1} \cdot c_1 \cdot z) \cdot (1 - \alpha_{t,2} \cdot c_2 \cdot dz) - I_0 \exp(-\alpha_{t,1} \cdot c_1 \cdot z) \end{aligned}$$

ce qui revient à écrire :

$$I_{abs} = I_0 \exp(-\alpha_{t,1} \cdot c_1 \cdot z) \cdot \alpha_{t,2} \cdot c_2 \cdot dz. \quad (1.4)$$

Ce résultat est utile pour décrire la vitesse d'absorption des photons dans le modèle de la phase photocytotoxique.

Profondeur de pénétration de la lumière dans la peau La Figure 1.8 décrit la variation de la profondeur de pénétration de la lumière dans la peau en fonction de sa longueur d'onde. Comme la profondeur de pénétration d'un faisceau lumineux dans un tissu est directement liée à l'absorption, l'atteinte d'un chromophore situé en profondeur ne pourra être envisageable qu'avec des longueurs d'onde peu absorbées. Ceci justifie la fenêtre thérapeutique située entre 600 et 1200 nm. Mais le choix de la longueur d'onde de la lumière dépend aussi du spectre d'absorption de l'agent photosensibilisant. On cherche en effet une absorption minimale ($\min_{\lambda_A} I_1(\lambda_A)/I_0(\lambda_A)$) par le milieu (profondeur de pénétration importante de la lumière) mais une absorption maximale par le PS ($\max_{\lambda_A} I_2(\lambda_A)/I_0(\lambda_A)$).

En première approximation, l'atténuation de la lumière suit une loi exponentielle (voir éq. (1.4)). Ainsi, à 755 nm pour 100 % de la lumière incidente à la surface de la peau, théoriquement, 37 % pénètre jusqu'à 3,13 mm (voir aussi Figure 1.8). Cette valeur constitue la valeur maximale pouvant être atteinte à cette longueur d'onde.

Diamètre du spot La Figure 1.9 illustre le lien entre la profondeur de pénétration de la lumière en fonction du diamètre du spot. Elle montre que pour une longueur d'onde donnée, l'augmentation du diamètre du spot ne permet pas d'obtenir une action en profondeur significativement accrue [15].

Oxygène

Les tumeurs requièrent pour leur croissance un approvisionnement en nutriments et en oxygène. Les métabolites toxiques qu'elles produisent doivent quant à eux être éliminés rapidement. Or, pour des tailles tumorales supérieures à quelques mm^3 , les processus de diffusion de l'oxygène depuis les vaisseaux sanguins jusqu'aux cellules tumorales deviennent insuffisants. Sachant que, dans les tissus, on estime que la limite de diffusion de l'oxygène correspond à une distance de 100–150 μm entre le capillaire et les cellules, ce qui correspond à environ 3–5 couches de cellules autour d'un vaisseau. Pour des tailles de tumeurs supérieures, le phénomène d'angiogénèse entre en jeu. Cet aspect est abordé dans le chapitre 3 de la seconde partie de cette thèse.

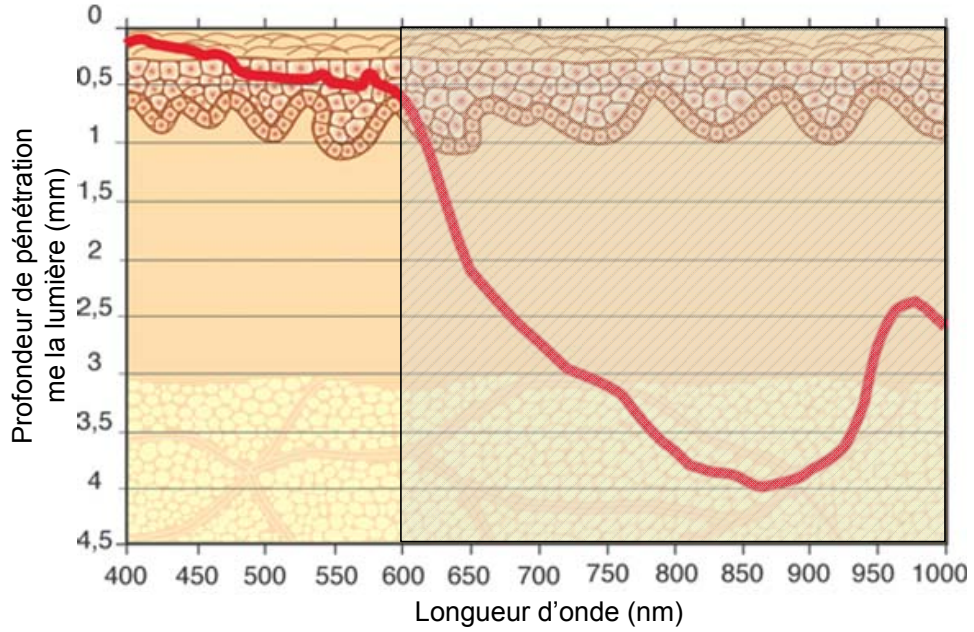


FIGURE 1.8 – Profondeur de pénétration de la lumière dans la peau pour différentes longueurs d'onde (extrait de [15])

Dosimétrie

Il est généralement admis que l'absence d'une dosimétrie précise en PDT représente actuellement le principal obstacle à l'amélioration de la reproductibilité des réponses thérapeutiques de la PDT. J'entends ici par dosimétrie, une méthode permettant de déterminer le *dosage* des facteurs incidents (concentration locale en PS, densité des photons envoyée, temps d'illumination, intervalle drogue lumière) pour obtenir un effet souhaité sur la tumeur, son élimination la plupart du temps. La détermination d'une méthode de dosimétrie précise constitue une voie de recherche primordiale. Il existe quatre classes de dosimétrie en PDT [34,35] et toutes reposent sur un modèle.

Dosimétrie explicite. Cette technique correspond à la stratégie de base. Elle implique la mesure des principaux composants de la thérapie, c'est-à-dire les doses de lumière, d'oxygène et la concentration intracellulaire de l'agent photosensibilisant. Ces trois constituants sont regroupés dans un modèle de dose des radicaux oxydants produits, défini par :

$$[R] = k_s b \epsilon \varphi_{\lambda_A} T [S_0] \Phi f \quad (1.5)$$

où $[R]$ est une concentration de radicaux oxydants. φ_{λ_A} désigne l'éclairement énergétique (*fluence rate*, souvent traduit par irradiance dans la communauté PDT ; elle correspond à une densité de puissance lumineuse par unité de surface) reçue par la surface du tissu à traiter et λ_A correspond à une longueur d'onde d'absorption du PS. T est le temps d'exposition à la lumière et $[S_0]$ est la concentration intracellulaire d'agent photosensibilisant. k_s est le coefficient de rétro-diffusion du tissu, b est un rendement de conversion, ϵ est le coefficient d'extinction de l'agent photosensibilisant et Φ est un rendement quantique de conversion du médicament en radicaux oxydants.

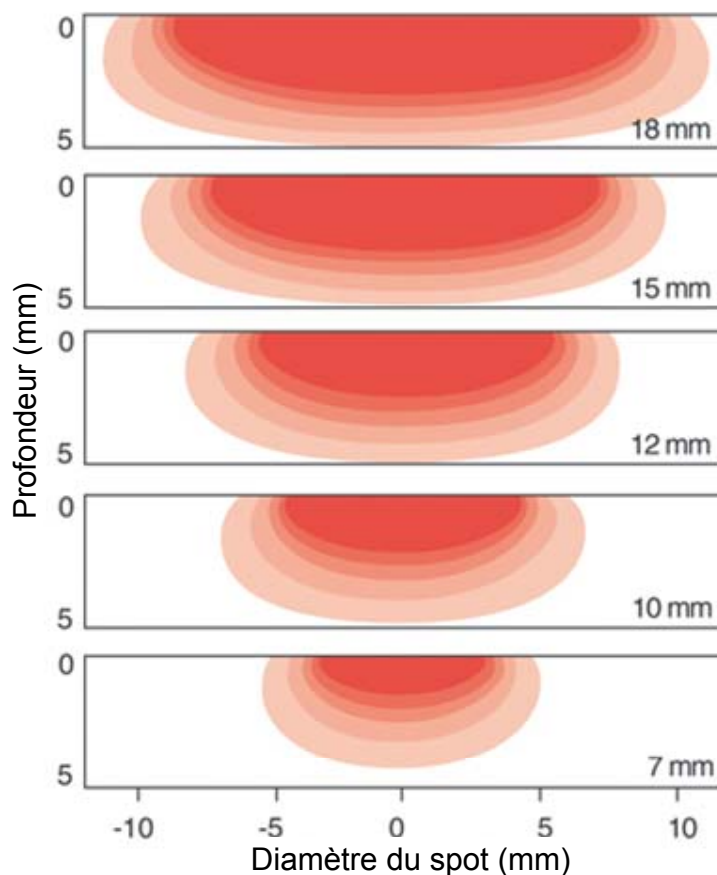


FIGURE 1.9 – Cette figure illustre le fait que pour une profondeur de pénétration donnée (dépendante de la longueur d’onde), l’augmentation même considérable du diamètre du spot ne permet pas d’obtenir une action en profondeur significativement différente (extrait de [15])

f désigne la fraction des radicaux oxydants générés attaquant les cibles sensibles des cellules, tandis que l’autre fraction ($1 - f$) ne cause que des effets mineurs. En dépit de son utilisation actuelle dans les applications cliniques, ce modèle est sujet à plusieurs controverses :

- l’équation (1.5) montre une simple réciprocité entre la concentration de l’agent photosensibilisant et la lumière, alors que plusieurs expériences ont montré des résultats contradictoires [36, 37] ;
- le rendement quantique (Φ) est en réalité une fonction du taux d’oxygénation de la tumeur. Ce dernier est souvent variable dans le temps et reste difficile à mesurer durant le traitement [38–41] ;
- les sites intracellulaires endommagés par la PDT dépendent beaucoup de la localisation du PS dans les cellules. Les sites d’action de la PDT sont principalement les mitochondries, le reticulum endoplasmique, l’appareil de Golgi, les lysosomes et les lipides membranaires [42, 43]. Une re-localisation des PS peut se produire pendant la PDT. Certains sites sont plus critiques que d’autres mais ce facteur n’est pas pris en compte dans (1.5) ;
- plusieurs quantités impliquées dans cette équation sont en réalité variantes dans le temps. En particulier, Potter *et al.* ont montré qu’une réduction de la concentration du PS durant le traitement était un facteur non négligeable, mais absent de cette formule [44]. Plus généralement, l’équation (1.5) n’est qu’une description statique du processus dynamique de

la PDT [41, 45, 46].

Dosimétrie implicite. Cette approche propose d'utiliser une seule grandeur dont l'évolution dépend de l'effet conjugué des trois variables de base de la PDT (doses de lumière, de médicament administré et d'oxygène). Cette grandeur doit nous renseigner sur les dommages biologiques prévisibles et donc sur les issues thérapeutiques du traitement. La variable la plus courtisée pour jouer ce rôle est probablement la concentration intra-tumorale de l'agent photosensibilisant. En effet, la plupart des agents utilisés en thérapie photodynamique, tels que les porphyrines ou chlorines, subissent une photodégradation progressive au cours de l'illumination. Cette dégradation, aussi appelée photoblanchiment, se traduit par une diminution de leur capacité à absorber la lumière. Le photoblanchiment met en jeu deux mécanismes :

1. la photodégradation, qui correspond à une modification profonde de la structure du médicament conduisant à la formation de photoproduits n'absorbant peu ou pas la lumière ;
2. la phototransformation qui correspond à une perte de l'absorbance et de la fluorescence du photosensibilisateur à certaines longueurs d'ondes mais le chromophore est conservé.

Le phénomène de photoblanchiment est communément évalué par la mesure de la décroissance de l'intensité de fluorescence photoinduite du médicament. Deux techniques de mesure peuvent être mises en oeuvre.

1. Une première approche consiste à utiliser une méthode invasive, nécessitant l'exérèse de tumeurs xénogreffées chez des souris *nude* ayant reçu l'agent photosensibilisant, puis d'estimer les concentrations du PS avant et après illumination par chromatographie liquide haute performance. Cette approche fournit des résultats précis sur la concentration du PS et des photoproduits. Mais elle ne permet pas d'observer en temps réel le photoblanchiment du PS durant le traitement.
2. Une seconde approche, celle que nous envisageons, consiste à utiliser une technique non invasive par spectrofluorimétrie fibrée adaptée à des estimations de concentrations en molécules photoactivables pendant l'illumination de la tumeur. Moins précise et surtout plus superficielle que la première technique, cette approche permet en revanche de recueillir des spectres de fluorescence au cours du traitement et ainsi, d'estimer le phénomène de photoblanchiment.

Mesure des réponses biologiques/biophysiques des tissus. Il s'agit d'une approche alternative pour suivre l'évolution du traitement et prédire les dommages sur les tissus comme les dommages vasculaires et les nécroses induites par le traitement. Les méthodes utilisées dans ce but incluent la spectroscopie par impédance électrique [47], la mesure du flux sanguin par laser Doppler [48], l'analyse de la diffusion par spectroscopie de corrélation de fluorescence [49], la tomographie Doppler par cohérence optique [50], aussi bien que les méthodes d'imagerie moléculaire ou radiologique telles que la tomographie à émission de positron (PET) [51]. Il est encore difficile de savoir si ces techniques pourront prédire efficacement les réponses thérapeutiques de la PDT car elles nécessitent en particulier des changements rapides et significatifs des caractéristiques biologiques et spectrales des tissus.

Dosimétrie directe. Cette dernière technique implique la mesure directe des concentrations des espèces réactives de l'oxygène et en particulier l'oxygène singulet. Comme pour l'approche de dosimétrie implicite, cette stratégie ramène le problème de dosimétrie à une seule dimension, celle de l'oxygène singulet mais directement cette fois. Plusieurs travaux ont montré des premiers

résultats *in vivo* [18,52,53] en laboratoire mais l'instrumentation actuelle requise pour ces travaux ne permet pas d'envisager des applications cliniques dans l'immédiat.

1.1.3 Mécanismes d'éradication tumorale après PDT

Plusieurs mécanismes contribuent à l'éradication tumorale (voir Figure 1.10) :

- un effet direct de destruction des cellules tumorales par nécrose, apoptose ou autophagie ;
- un effet indirect par destruction de la vascularisation tumorale provoquant une privation de la tumeur en nutriments et oxygène et par conséquent, la destruction tumorale ;
- un effet indirect dû à une réponse inflammatoire et immunitaire de l'hôte.

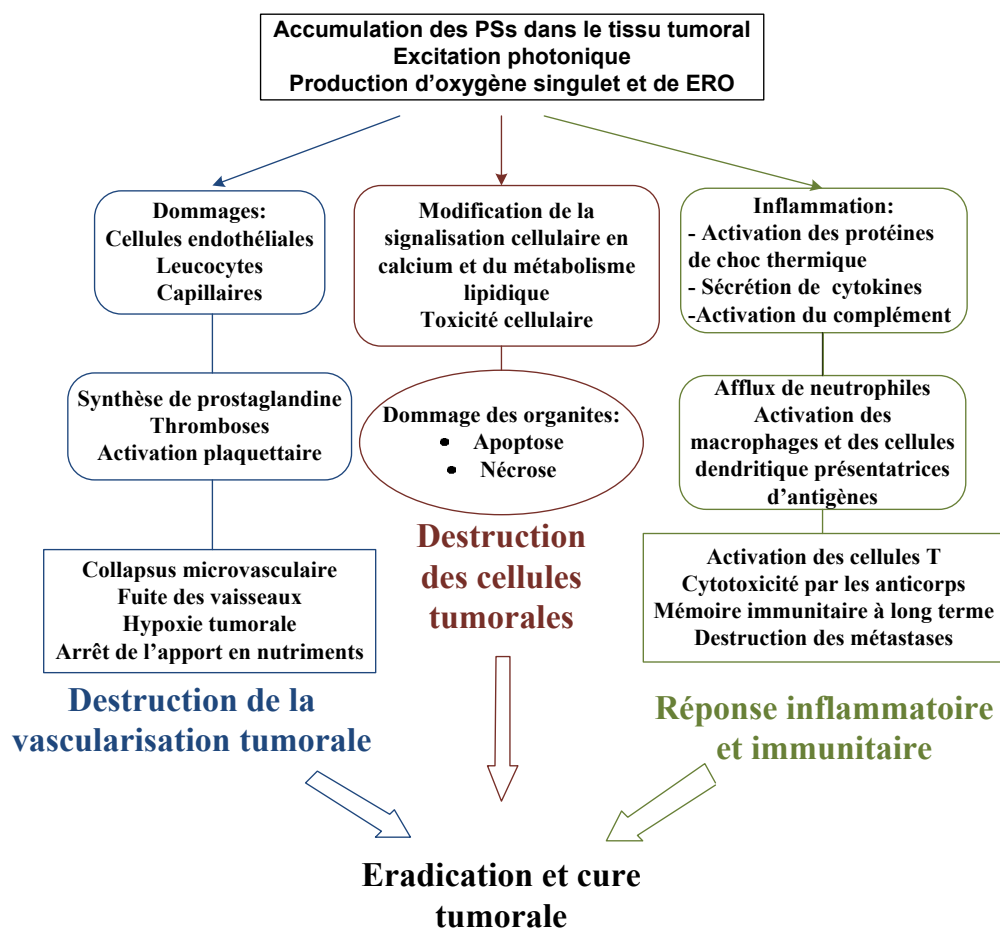


FIGURE 1.10 – Mécanismes de destruction tumorale après PDT, extrait de [16], avec ERO - espèces réactives de l'oxygène

La prépondérance de l'un ou l'autre de ces effets dépend du type de tumeur, du PS (caractéristiques pharmacocinétiques, localisation intratissulaire et intracellulaire, etc.) et des modalités utilisées de la PDT [54]. Ces trois mécanismes peuvent être combinés et interagissent entre eux, mais l'importance de chacun d'eux pour l'éradication tumorale reste encore à définir. En revanche, il a été démontré que la combinaison de ces trois phénomènes est indispensable pour une éradication tumorale optimale à long terme [55].

Effets directs Suivant le protocole utilisé, une fraction plus ou moins importante de PS peut être présente dans les cellules tumorales au moment de l'illumination. Les espèces cytotoxiques produites vont alors causer des dommages cellulaires, conséquences de l'altération des fonctions des organites cellulaires et des systèmes membranaires. Les dommages se traduisent par deux effets principaux : la nécrose et l'apoptose. La concentration, les propriétés physicochimiques, la localisation subcellulaire du PS, la concentration en oxygène, l'intensité de la lumière absorbée, et le type cellulaire peuvent influencer le mode de mortalité cellulaire [54, 56].

La nécrose est une forme rapide et violente de dégénération. C'est une mort non programmée et accidentelle causée par des dommages physiques ou chimiques sévères. Elle se manifeste par le gonflement du cytoplasme, une destruction des organites et une peroxydation lipidique provoquant la désorganisation de la membrane plasmique. Les enzymes cytoplasmiques et lysosomales ainsi libérées sont à l'origine de réactions inflammatoires.

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à des signaux intra- et extra-cellulaires. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Contrairement à la nécrose, elle ne provoque pas d'inflammation : les membranes plasmiques ne sont pas détruites, et la cellule émet des signaux qui permettront sa phagocytose par des globules blancs, notamment des macrophages.

De récentes études ont montré l'implication d'un autre type de mort cellulaire programmée suite à la PDT : l'autophagie [57, 58]. Cette autodigestion se fait par l'entremise des lysosomes, qui contiennent un grand nombre d'enzymes qui dégradent la plupart des macromolécules biologiques.

Effets indirects : réactions immunitaires et inflammatoires et effets anti-vasculaires

Les effets de la PDT anticancéreuse sur la réponse immunitaire se présentent sous deux aspects : l'activité antitumorale de la PDT induit, soit l'inflammation des cellules, soit une réponse immunitaire antitumorale à long terme. Ces effets peuvent être provoqués par des dommages cytotoxiques qui ne sont pas nécessairement létaux pour toutes les cellules tumorales et qui peuvent être à l'origine d'un stimulus inflammatoire. La PDT induit des modifications de la membrane plasmique et des membranes des organites cellulaires en activant les phospholipases membranaires [59]. Ainsi, les phospholipides sont rapidement dégradés et les médiateurs de l'inflammation sont déversés massivement dans le milieu extracellulaire [60].

L'effet anti-vasculaire de la PDT consiste en des dommages vasculaires survenant après PDT et contribuant à long terme à l'éradication tumorale [61]. Le degré de réponse vasculaire est fortement dépendant des conditions de PDT utilisées, en terme de quantité de PS administrée, d'intervalle drogue-lumière et de dose de lumière [62–64].

Le collapsus vasculaire peut être rapidement observé après PDT et peut provoquer une hypoxie tumorale post-PDT persistante et sévère [55]. La PDT peut aussi provoquer une vasoconstriction, une fuite des macromolécules depuis les vaisseaux, l'adhésion de leucocytes et la formation de thrombi, ces événements étant tous liés à l'activation plaquettaire et à la libération de thromboxane. Ces effets sont dus aux dommages directs des cellules endothéliales. La PDT peut également provoquer une vasoconstriction par inhibition ou relargage d'oxyde nitrique (NO) par l'endothélium [65]. Ces deux événements initiateurs potentiels de l'effet anti-vasculaire (dommages aux cellules endothéliales et vasoconstriction) conduisent à une destruction tumorale par collapsus vasculaire, arrêt du flux sanguin ou hémorragie [66].

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour potentialiser l'effet anti-vasculaire de la PDT,

soit en agissant sur le protocole de traitement, soit en utilisant des PS ayant un mode d'action vasculaire.

Ces stratégies de Vascular Targeted Photodynamic Therapy (VTP) ont des applications pour le traitement de la dégénérescence liée à l'âge [67], les angiomes plans [68] et le traitement du cancer de la prostate [69].

Dans notre étude de modélisation de la thérapie photodynamique, nous avons pris en considération comme mécanisme d'éradication tumorale seulement les effets directs.

1.1.4 Condition expérimentale : étude *in vivo*

Nous avons utilisé un modèle de gliome malin humain, xénogreffé en ectopique chez la souris nude. Ce modèle de tumeur induit par la lignée tumorale U87 est décrit dans la littérature comme étant résistant à la radiothérapie [70], d'où l'intérêt d'évaluer sa réponse à la PDT.

Détails sur le modèle animal

Nous avons utilisé pour nos expérimentations des souris nude Fox femelles, pesant 20 à 25 g, provenant de chez Harlan (Gannat, France). A leur arrivée à l'animalerie centrale de la Faculté de Médecine de Nancy à l'âge de 6 semaines, les animaux sont placés dans des cages contenant de la litière, par groupes de 5 ou 6, et reçoivent de l'eau et une alimentation non stériles ad libitum. Les premières manipulations sur les animaux ne débutent que 7 à 10 jours après leur arrivée.

La lignée U87 (glioblastome multiforme humain, The American Type Culture Collection, ATCC HTB-14) est conservée à -80°C . Après décongélation, les cellules sont cultivées en monocouche dans des flacons de culture de 75 cm^2 (Falcon, Dutscher, Brumath, France), comme décrit dans [21]. Au début de notre série d'expérimentations, des souris ont été injectées, avec 10^6 cellules U87 dans $100\text{ }\mu\text{L}$ de glucose 5% (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), au niveau de la face externe des pattes postérieures droite et gauche, et ont servi de premières souris donneuses.

Par la suite, les souris sont greffées avec des fragments tumoraux directement issus de souris donneuses. Lorsque la tumeur d'une souris donneuse atteint un volume d'environ 1000 mm^3 , elle est sacrifiée par dislocation cervicale, après anesthésie de l'animal. Le tissu tumoral est prélevé, rincé dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%), et utilisé immédiatement. Il est alors coupé finement, à l'aide d'un scalpel, de façon à obtenir des fragments d'environ 1 à 2 mm. Les parties blanches, d'apparence nécrosée, sont éliminées, alors que les fragments roses, vascularisés, sont utilisés pour les greffes.

Les souris receveuses sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale (0.01 mL/g de poids corporel) de 60 mg/kg de kétamine (Kétalar, Panpharma, Fougère, France) et 8 mg/kg de xylazine (Rompun, Bayer Pharma, Puteaux, France), qui sont un anesthésique et un myorelaxant, respectivement. L'anesthésie survient dans les 5 à 10 min suivant l'injection pour une durée d'au moins 30 min. L'animal est alors fixé sur une planchette en polystyrène par ses quatre membres, en décubitus dorsal, au moyen de ruban adhésif de type Micropore, 3 M. Les greffons U87 sont implantés en sous-cutané au niveau du pli inguinal gauche de la souris, près de l'artère fémorale. A ce niveau, la peau et le tissu conjonctif sont incisés, et les fragments déposés. Les points de suture cutanée sont réalisés avec du fil de suture Prolène 5/0 stérile (Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France). A l'issue de l'intervention, les animaux sont marqués au niveau des oreilles, au moyen d'un système de tatouage (Micro-Tattoo System, Harvard Apparatus, Les Ulis, France).

Protocole PDT

Lorsque le diamètre des tumeurs atteint 5 ± 1 mm (15 à 20 jours après la greffe), la dose de photosensibilisant TPC-Ahx-ATWLPPR (voir les spectres à la Figure 1.11) est injectée aux souris ($200 \mu\text{L}/25\text{g}$ de poids corporel) par voie i.v., dans une veine latérale de la queue. La solution stock de PS, solubilisé dans le DMSO, est diluée dans un mélange de PEG 400 : éthanol : eau (3 : 2 : 5). Au bout de 24 heures (IDL), la souris est anesthésiée et la tumeur irradiée à l'aide d'un laser à colorant (SpectraPhysics 375B, Les Ulis, France), pompé par un laser argon (Spectra-Physics 2020), à une longueur d'onde de 652 nm, avec un spot de 1 cm (afin de laisser une « marge de sécurité » d'environ 2 mm autour de la tumeur).

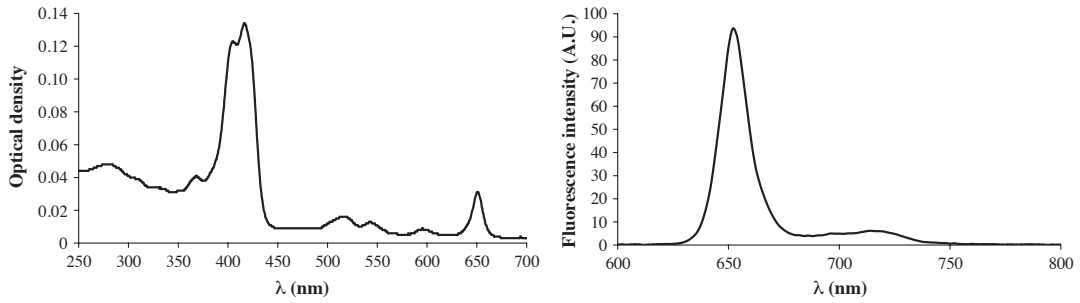


FIGURE 1.11 – Spectres d'absorption (à gauche) et d'émission (à droite) de TPC-Ahx-ATWLPPR dans l'éthanol, issu de [17]

Dose photodynamique La thérapie photodynamique reste encore peu développée dans les applications cliniques actuelles. Elle est essentiellement utilisée sur la base de doses prescrites de PS et de lumière et d'un intervalle drogue-lumière fixé *a priori*. Ces doses sont déterminées à partir d'un modèle physique simplifié [40, 41, 71], défini par la formule suivante :

$$\text{Dose photodynamique} \cong [S_0] \cdot u_L \cdot t_L \cdot [^3O_2] \cdot \varepsilon \cdot \Phi_\Delta \cdot f \quad (1.6)$$

où $[S_0]$ est la concentration d'agent photosensibilisant présente dans le tissu (en M/L ou M). u_L désigne l'irradiance (correspondant à une densité de puissance lumineuse par unité de surface, en W/cm^2) reçue par la surface du tissu à traiter. t_L est le temps d'exposition à la lumière et $[^3O_2]$ est la concentration d'oxygène moléculaire présent dans le tissu (en M). ε est le coefficient d'extinction molaire de l'agent photosensibilisant à la longueur d'onde d'irradiation (en $M \cdot L^{-1} \cdot cm^{-1}$, ou bien M/cm) et Φ_Δ est un rendement quantique en oxygène singulet du PS. f désigne la fraction des radicaux oxydants générés attaquant les cibles sensibles des cellules, tandis que l'autre fraction ($1 - f$) ne cause que des effets mineurs. En dépit de son utilisation actuelle dans les applications cliniques, ce modèle est sujet à plusieurs controverses [72].

La puissance en sortie de fibre a été précédemment mesurée à l'aide d'un puissance-mètre

$$P(\text{mW}) = u_L(\text{mW}/\text{cm}^2) \times 0.79 \text{ cm}^2$$

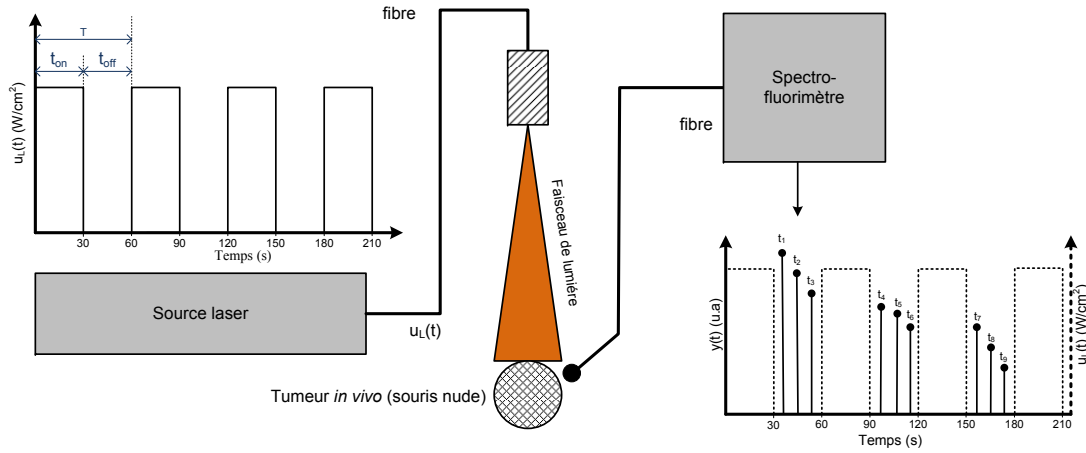
et le temps d'irradiation adapté de façon à avoir la fluence requise

$$t_L(\text{s}) = \text{fluence} (J/\text{cm}^2) / u_L(\text{mW}/\text{cm}^2) \times 1000.$$

Lors de nos expériences, l'irradiance, $u_L(t)$ a été choisie comme un signal carré, d'amplitude $95 \text{ mW}/\text{cm}^2$ et de période $T = 1 \text{ min}$ (voir aussi Figure 1.12).

L'intensité de la fluorescence $y(t)$ est recueillie seulement pendant les demi-périodes (t_{off}) où le laser est éteint et avec une période d'échantillonnage de temps égale à $T_s = 7$ s, soit trois échantillons pour chaque demi-cycle (limite technique du système d'acquisition de données). La durée totale de l'expérience est limitée à environ 42 min.

Suivant l'intervalle drogue-lumière (IDL), différents mécanismes d'éradication tumorale sont visés : (1) si IDL est de l'ordre de 4 heures, alors nous nous intéressons à la destruction de la vascularisation tumorale (effet indirect), (2) si IDL est de l'ordre de 24 heures, alors l'effet direct va être prépondérant. Bien sûr ces valeurs sont spécifiques au PS TPC-Ahx-ATWLPPR.



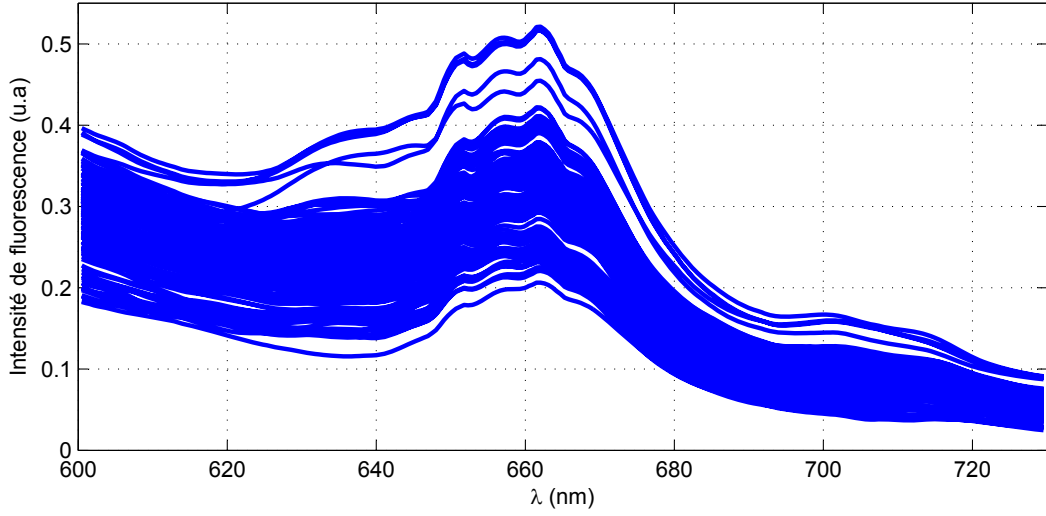


FIGURE 1.13 – Spectres de fluorescence recueillis lors des expériences *in vivo*, pour des longueurs d'onde situées entre 600 nm et 730 nm et pour tous les instants de mesure t_k , avec $k \in \{1, \dots, 126\}$.

de mélange gaussien de la forme suivante :

$$\hat{S}_f(\lambda) = \sum_{k=1}^q \left(\frac{\hat{I}_f(\lambda_k)}{2 \cdot \hat{\sigma}_k^2} \cdot \exp \left(-(\lambda - \lambda_k)^2 \right) \right) \quad (1.9)$$

où q est le nombre de composantes gaussiennes, λ_k est la longueur d'onde de la $k^{\text{ème}}$ gaussienne, $\hat{\sigma}_k$ caractérise sa largeur et $\hat{I}_f(\lambda_k)$ correspond à son aire (dans la pratique, pour une longueur d'onde d'excitation fixée, l'intégration du spectre de fluorescence d'un PS sur λ_F est proportionnelle à son intensité de fluorescence, [73]). Pour obtenir ce dernier, il faut donc résoudre un problème de déconvolution à partir d'un modèle de mélange Gaussien, voir (1.9). Nous avons utilisé un algorithme développé au laboratoire par Vincent Mazet [75]. Cet algorithme repose sur une méthode de séparation de sources pour des mélanges gaussiens. Il est fondé sur une approche bayésienne couplée à une méthode de Monte Carlo par chaînes de Markov qui consiste à considérer le problème comme une décomposition en motifs élémentaires (dans ce cas, des fonctions gaussiennes). Il a permis de détecter et d'isoler cinq composantes ($q = 5$) situées à 600, 634, 661 (proche de 650, vraisemblablement celle du PS, voir [17, 21]), 698 et 728 nm. Une fois la composante gaussienne du PS (voir Figure 1.14) retrouvée, son aire ($\hat{a}_3$) fournit une estimation de l'intensité de fluorescence du PS émise autour de 661 nm. Pour compenser les variabilités des spectres dues notamment à un mauvais remplacement de la fibre du spectrofluorimètre à chaque phase d'extinction du laser, nous utilisons le pic des flavines⁹ comme référence stable dans le temps entre tous les spectres.

À la Figure 1.14, nous avons illustré la procédure de calcul de l'intensité de fluorescence à un instant donné. Les résultats ainsi obtenus pour tout instant de mesure t_k , avec $k \in \{1, \dots, 126\}$ ont été représentés à la Figure 1.15.

9. Les flavines font parties des fluorophores endogènes naturellement présents dans les tissus, leur concentration reste constante durant les traitements PDT et peuvent donc servir à normaliser les spectres mesurés. Leur pic de fluorescence se situe aux alentours de 550 nm, [76].

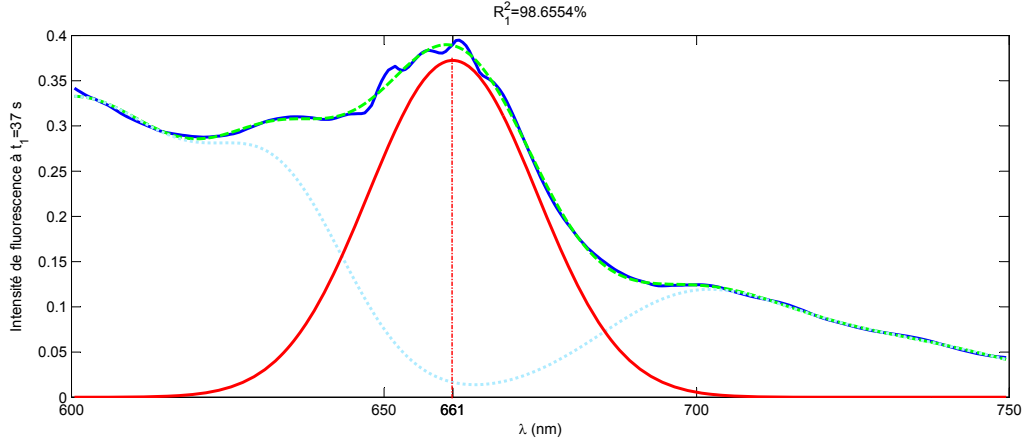


FIGURE 1.14 – Représentation graphique de la procédure de calcul de l'intensité de fluorescence à l'instant $T_1 = 37 s$. La courbe en bleu représente le spectre mesuré, tandis que celle en vert (tirets) correspond au spectre estimé (à partir de l'éq. 1.9 avec $q = 5$). La courbe en bleu ciel (pointillé) correspond au spectre sans la 3ème composante (la fluorescence du PS), tandis que celle en rouge représente la composante gaussienne située à 661 nm, d'aire $\hat{a}_3 = 0.3724$ et de largeur $\hat{\sigma}_3 = 13.4525$. R_1^2 désigne les coefficients de détermination entre les spectres mesurés et estimés.

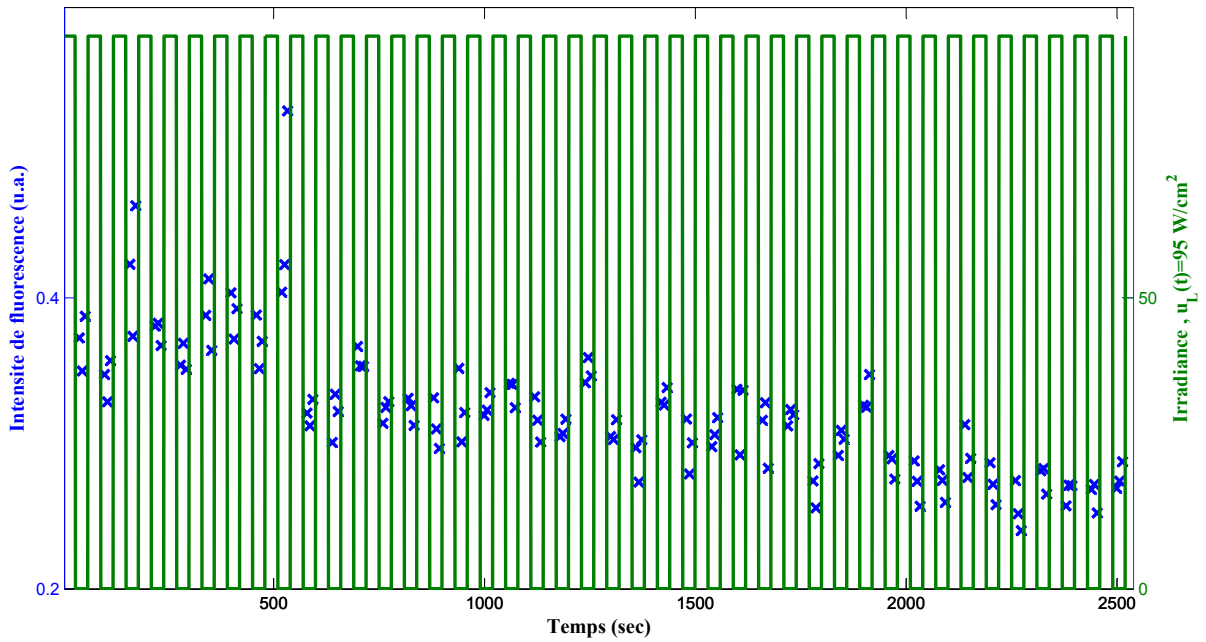


FIGURE 1.15 – Intensité de fluorescence (gauche, $\times$) correspondant au paramètre $\hat{a}_3$ du modèle de mélange Gaussien (1.9) pour tous les instants de mesure t_k , avec $k = 1, \dots, 126$ (durée totale de l'expérience : 42 min = 2520 s), et signal d'illumination (droite, en vert) (un signal carré, d'amplitude 95 mW/cm^2 et de période $T = 1$ min).

Symb.	Description	Unité
v_A	Vitesse d'absorption des photons	$mM \cdot s^{-1}$
u_P	Vitesse d'incorporation du PS	$mM \cdot s^{-1}$
u_O	Vitesse d'incorporation d'oxygène	$mM \cdot s^{-1}$
u_L	Irradianance	mW/cm^{-2}
y	Intensité de fluorescence	<i>u.a</i>
$[S_0]$	PS. intracellulaire à l'état repos	mM
$[S_1]$	PS. intracellulaire à l'état singulet excité	mM
$[T_1]$	PS. intracellulaire à l'état triplet excité	mM
$[^3O_2]$	Oxygène à l'état triplet repos	mM
$[^1O_2]$	Oxygène à l'état singulet excité	mM
$[M]$	Substrat organique intracellulaire	mM

TABLE 1.1 – Principales variables de la phase cytotoxique

1.2 Phase phototoxique du traitement *in vivo*

Les équations présentées dans cette section décrivent plusieurs comportements dynamiques à l'échelle d'une seule cellule. Toutefois, la modélisation de la PDT implique d'étudier le comportement d'une population de cellules cancéreuses correspondant, soit à une culture *in vitro*, soit à une tumeur dans le cas d'une étude *in vivo*. La variabilité des caractéristiques d'une cellule à une autre peut être appréhendée en considérant les paramètres des modèles comme des variables aléatoires. La plupart des variables utilisées dans cette thèse correspondent donc à des moyennes sur l'ensemble de la population cellulaire. De plus, certains phénomènes biologiques, comme l'agrégation des molécules du photosensibilisateur ou le processus de désexcitation de l'oxygène par phénomène de quenching¹⁰ ne seront pas considérés pour simplifier le travail de modélisation de la thérapie. Les erreurs induites par ces simplifications sont représentées par une erreur aléatoire ajoutée en sortie du modèle.

Les principales variables utilisées dans cette thèse, en dehors des notations standards des éléments chimiques, sont répertoriées dans le tableau 1.1.

1.2.1 Réactions photochimiques

Les réactions photochimiques induites par l'illumination de la tumeur après incorporation du photosensibilisant sont généralement décrites sur un plan énergétique par un diagramme de Jablonski représenté à la Figure 1.16.

Les diagrammes de Jablonski (ou Perrin-Jablonski) sont utiles pour visualiser les divers transitions (radiatives et non-radiatives) entre états électroniques : absorption d'un photon, conversion interne, fluorescence, conversion (ou passage) intersystème, phosphorescence, transfert d'énergie, luminescence etc.

Absorption (A) Le PS est initialement dans son état fondamental, qui est un état singulet (S_0). L'absorption (A) d'un photon, émis à une longueur d'onde appropriée ($\lambda_A \in [630nm, 690nm]$), le fait passer à un état électronique excité :



10. Quenching ou phénomène de désexcitation de l'oxygène - transfert d'énergie vers une molécule sans altérer la nature chimique de celle-ci.

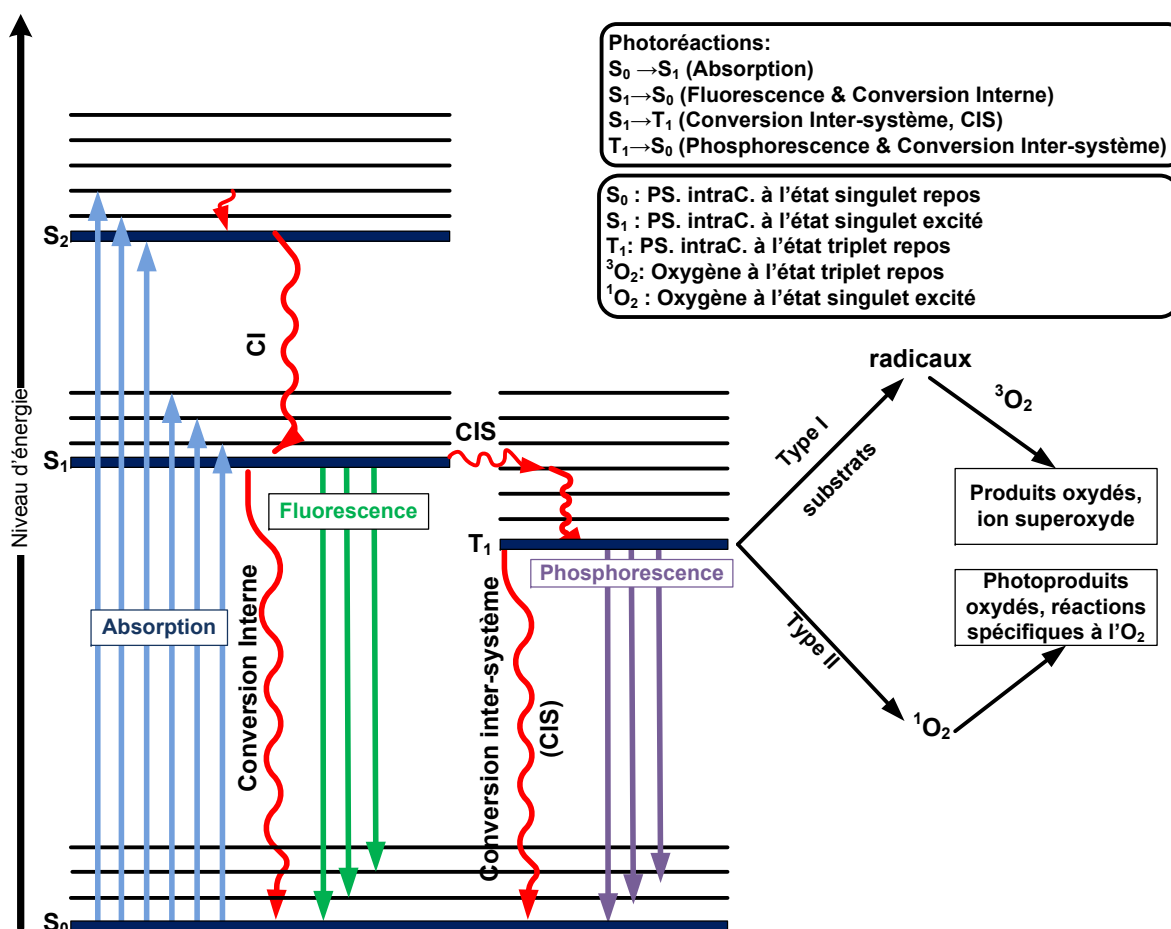


FIGURE 1.16 – Diagramme de Jablonski des photoréactions induites durant la phase cytotoxique en PDT

Absorption : 10^{-15} s
Relaxation vibrationnelle : $10^{-12} - 10^{-10} \text{ s}$
Durée de vie à l'état excité S_1 : $10^{-10} - 10^{-7} \text{ s}$
Conversion intersystème : $10^{-10} - 10^{-8} \text{ s}$
Conversion interne : $10^{-11} - 10^{-9} \text{ s}$
Durée de vie à l'état excité S_1 : $10^{-6} - 1 \text{ s}$

TABLE 1.2 – Temps caractéristiques moyens

où h représente la constante de Planck ($h = 6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$). $\nu_A = c/\lambda_A$ correspond à la fréquence de l'onde incidente et λ_A désigne la longueur d'onde d'excitation. Les états S_1 et S_2 - PS intracellulaire à état singulet excité - sont à courte durée de vie (voir tab. 1.2) et il existe plusieurs possibilités de retour à un état basal (voir Figure 1.16) : par conversion interne ou fluorescence, ou bien conversion intersystème suivie de désexcitations radiatives ou non radiatives.

Conversion interne (CI) La conversion interne (CI) est une transition non radiative (ce surplus d'énergie est converti en énergie cinétique – vibrations moléculaires – communiquée aux molécules environnantes) décrite par les équations suivantes :



La conversion interne de S_1 vers S_0 est possible, mais moins efficace que de S_2 vers S_1 en raison d'écart important d'énergie entre S_1 et S_0 . Par conséquent, elle peut entrer en compétition avec la fluorescence et la conversion intersystème.

Fluorescence (F) L'émission d'un photon accompagnant la transition



est appelée fluorescence. L'émission de fluorescence se produit à partir de l'état S_1 . Le spectre de fluorescence est situé à des longueurs d'onde plus grandes (ce qui correspond à des énergies plus basses) que le spectre d'absorption en raison de perte d'énergie par relaxation vibrationnelle dans l'état excité.

Conversion intersystème (CIS) Une troisième voie possible de désexcitation à partir de S_1 est la conversion (ou passage ou croisement) intersystème (CIS)(*intersystem crossing*), *i.e.* le passage à l'état triplet :



Ceci est une transition non radiative entre deux niveaux vibrationnels appartenant à des états électroniques de multiplicités différentes.

Le passage entre des états de multiplicité différente est un principe interdit, mais le couplage spin-orbite peut être suffisamment important pour le rendre possible [73].

Passage T_1 à S_0 A ce stade, le retour à l'état fondamental correspond à une transition radiante (phosphorescence, P) ou non radiante (conversion intersystème 2, notée TS) :



L'état triplet, T_1 a un niveau d'énergie plus bas que celui de l'état singulet excité, S_1 mais sa durée de vie est plus longue (typiquement $> 500 \text{ ns}$ pour la plupart des photosensibilisants). Cette caractéristique augmente la probabilité de transfert d'énergie (T) vers d'autres molécules comme l'oxygène, $^3\text{O}_2$. Ce transfert s'effectue selon deux mécanismes distincts. Les réactions de type *I* (voir fig. 1.17 pour une représentation schématique des réactions de type *I* et *II* faisant intervenir

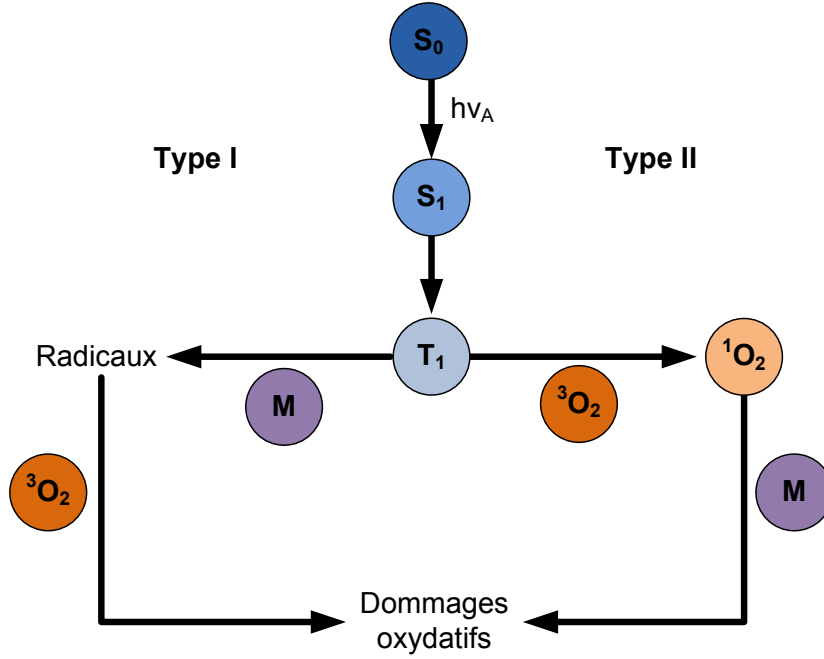


FIGURE 1.17 – Les réactions photochimiques de type I et II faisant intervenir le PS à l'état triplet suite à son activation par la lumière

le PS à l'état triplet) sont caractérisées par un arrachement d'électron ou d'atome d'hydrogène au substrat [77,78]. Dans notre étude, pour les PS étudiés, ces réactions sont supposées minoritaires par rapport aux réactions de type II ; elles ne seront donc pas prises en compte dans la suite de cette modélisation.

Réactions de type II Les réactions de type II correspondent à l'interaction directe de l'état excité triplet du photosensibilisant avec une molécule d'oxygène, au repos à l'état triplet. Cette interaction provoque le retour à l'état singulet du photosensibilisant et la formation de l'oxygène singulet comme indiqué par l'équation suivante



Cette réaction n'est possible que si le PS possède une différence d'énergie entre T_1 et S_0 supérieure à la différence d'énergie entre ${}^1O_2$ et ${}^3O_2$, soit $94 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ [79]. L'oxygène singulet, ${}^1O_2$ possède une durée de vie très courte (quelques μs dans l'eau et 25 à 100 μs dans les milieux organiques non polaires) mais est très réactif et susceptible de réagir avec des substrats cellulaires M situés dans son environnement proche (distance comprise entre 10 et 45 nm) [80]. :



où $M(O)$ désigne un substrat oxydé.

De façon similaire, les molécules d'oxygène peuvent réagir et dégrader les molécules du photosensibilisant, phénomène connu sous le nom de photoblanchiment (PB) ou photomodification. Ce phénomène est à l'origine de la baisse en concentration du PS au cours du temps. Le phénomène de photoblanchiment est généralement décrit comme suit :



No.	Type de réaction	Réaction photochimique	Vitesse
1	Absorption (A)	$S_0 + h\nu_A \rightarrow S_1$	$k_A \cdot u_L \cdot [S_0]$
2	Conversion Interne (CI)	$S_1 \xrightarrow{CI} S_0$	$k_{CI} [S_1]$
3	Fuorescence (F)	$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_F$	$k_F [S_1]$
4	Conversion Intersystème (CIS)	$S_1 \xrightarrow{CIS} T_1$	$k_{CIS} [S_1]$
5	Phosphorescence (P)	$T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_P$	$k_P [T_1]$
6	Conversion Intersystème 2 (TS)	$T_1 \xrightarrow{TS} S_0$	$k_{TS} [T_1]$
7	Luminescence (L)	$^1O_2 \rightarrow ^3O_2 + h\nu_L$	$k_l [^1O_2]$
8	Transfert d'énergie (T)	$T_1 + ^3O_2 \rightarrow S_0 + ^1O_2$	$k_T [T_1] [^3O_2]$
9	Photoblanchiment (Pb)	$^1O_2 + S_0 \rightarrow ^3O_2 + S(O)$	$k_{Pb} [^1O_2] [S_0]$
10	Oxydation (ox)	$^1O_2 + M \rightarrow ^3O_2 + M(O)$	$k_{ox} [^1O_2] [M]$
11	Réaction entre S_1 et M (SM)	$S_1 + M \rightarrow \text{Photoproduits}$	$k_{SM} [S_1] [M]$
12	Réaction entre T_1 et M (TM)	$T_1 + M \rightarrow \text{Photoproduits}$	$k_{TM} [T_1] [M]$

TABLE 1.3 – Photoréactions de la PDT

où $P(O)$ désigne un photoproduit du PS.

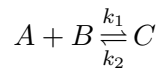
L'oxygène singulet $^1O_2$ peut également revenir à son état fondamental par émission de luminescence (1270 nm) :



Une liste de toutes les réactions considérées dans cette étude de modélisation est donnée dans le tableau 1.3. [81] contient une liste complète de toutes les réactions possibles.

1.2.2 Construction d'un modèle

Généralités sur la cinétique chimique Considérons la réaction entre deux entités réactives, A et B , conduisant à un produit C .



Les objets appelés « entités réactives » peuvent être des molécules, des macromolécules de type protéines, ou encore des particules. La vitesse, ou cinétique, de cette réaction dépend du nombre de collisions entre les différentes entités. La fréquence des collisions dépend directement des concentrations en A et B . Même si chaque collision n'aboutit pas forcément à une réaction, la vitesse de réaction dépend, d'un point de vue macroscopique, des concentrations en chacune des entités A , B et C (notées ici avec $[A]$, $[B]$, respectivement $[C]$). L'écriture la plus simple de la vitesse de réaction v est :

$$\begin{aligned} v &= \frac{d[C]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} \\ &= k_1 \cdot [A] \cdot [B] - k_2 \cdot [C] \end{aligned}$$

Construction d'un modèle associé à la PDT (phase II) Le comportement cinétique et dynamique des réactions 1 à 7 dans le tableau 1.3 est généralement défini par des équations différentielles linéaires du premier ordre établies en partant des vitesses de réactions définies en cinétique chimique. En revanche, les réactions de type II, notées 8 à 12, sont représentées par des équations différentielles non-linéaires. En regroupant ces équations différentielles, on obtient

une représentation d'état non linéaire définie comme suit :

$$\begin{cases} \frac{d[S_0]}{dt} &= u_P(t) + (k_P + k_{TS})[T_1] + k_T[T_1][^3O_2] - k_{Pb}[^1O_2][S_0] - \\ &\quad - k_A[S_0]u_L(t) + (k_F + k_{CI})[S_1] \\ \frac{d[S_1]}{dt} &= k_A[S_0]u_L(t) - (k_F + k_{CI} + k_{CIS})[S_1] - k_{SM}[S_1][M] \\ \frac{d[T_1]}{dt} &= k_{CIS}[S_1] - (k_P + k_{TS})[T_1] - k_T[T_1][^3O_2] - k_{TM}[T_1][M] \\ \frac{d[^3O_2]}{dt} &= u_O(t) + k_{ox}[M][^1O_2] + k_{Pb}[^1O_2][S_0] + k_l[^1O_2] - k_T[T_1][^3O_2] \\ \frac{d[^1O_2]}{dt} &= k_T[T_1][^3O_2] - k_{ox}[M][^1O_2] - k_l[^1O_2] - k_{Pb}[^1O_2][S_0] \\ \frac{d[M]}{dt} &= -k_{ox}[M][^1O_2] - k_{SM}[S_1][M] - k_{TM}[T_1][M] \end{cases} \quad (1.21)$$

où $X = ([S_0], [S_1], [T_1], [^3O_2], [^1O_2], [M])^T$ désigne le vecteur d'état ; v_A est la vitesse d'absorption des photons [82] ; u_L la densité de puissance lumineuse générée par la source laser. u_P désigne la vitesse d'incorporation de nouvelles molécules du PS dans les cellules cancéreuses et u_O est la vitesse d'incorporation des molécules d'oxygène dans les cellules (plus difficilement manipulable que u_P et u_L), cette variable peut être considérée soit comme une entrée soit comme une perturbation. u_P et u_L correspondent aux deux variables d'entrée de la phase photocytotoxique.

Le vecteur des paramètres est donné par :

$$\theta^T = [k_A \quad k_f \quad k_{CIS} \quad k_p \quad k_T \quad k_{ox} \quad k_{Pb} \quad k_L \quad k_{TM} \quad k_{SM}] \quad (1.22)$$

avec $k_f = k_F + k_{CI}$ et $k_p = k_P + k_{TS}$. Les définitions de ces différents paramètres sont données dans le tableau 1.3.

Compte tenu de la valeur de l'intervalle drogue-lumière (IDL = 24 heures) choisie lors de nos expériences, u_P peut être considéré comme nul, *i.e.* plus d'incorporation de PS dans les cellules.

Mesure des concentrations – lien avec l'intensité de fluorescence Dans [83] la mesure du rapport d'intensité de phosphorescence – fluorescence est utilisée pour observer l'évolution du niveau d'oxygène durant la PDT. Les résultats présentés n'ont toutefois été obtenus que dans un cadre expérimental *in vitro*. Le niveau faible d'intensité de phosphorescence limite l'applicabilité de cette approche dans le cas *in vivo*. Il existe d'autres techniques de mesure de l'oxygène comme celle fondée sur les sondes polarographiques [21], technique électrochimique de mesure de la pression partielle d'oxygène (pO_2). Toutefois, la durée d'analyse associée à cette technique implique une période d'échantillonnage trop grande par rapport aux caractéristiques du signal utilisé dans le protocole expérimental de la Figure 1.12.

Plusieurs travaux [18, 52, 53] ont démontré la faisabilité de mesurer l'intensité de luminescence de l'oxygène singulet en condition *in vivo*, mais ils nécessitent une technologie appropriée encore en phase de développement. Finalement, dans le cadre expérimental actuel, nous ne pouvons mesurer que l'intensité de fluorescence $I_F(\lambda_F)$ émise par le PS et qui constitue notre unique variable de sortie.

$$I_F(\lambda_F) = \gamma \cdot [S_0]$$

Cette relation montre la proportionnalité entre l'intensité de fluorescence et la concentration $[S_0]$ (suffisamment faible) du PS. $I_f(\lambda_F)$ est considérée comme variable de sortie de la phase photocytotoxique et l'équation (1.8) devient une équation de sortie venant compléter la représentation d'état définie précédemment.

1.3 Conclusion

Malgré toutes les connaissances sur les réactions biophysiques impliquées dans les traitements par thérapie photodynamique, l'issue des traitements reste souvent incertaine. Cette variabilité peut être imputée à plusieurs facteurs spatiaux ou temporels. Par exemple, la biodistribution du PS et de l'oxygène dans les tissus tumoraux n'est jamais homogène (la mauvaise vascularisation des tumeurs aura tendance à créer des zones hypoxiques), par ailleurs la dose de lumière n'est pas administrée de la même manière partout sur les tissus cancéreux, en effet, les propriétés optiques sont également hétérogènes et peuvent varier au cours du temps (micro-hémorragies, inflammations). Le modèle physique présenté dans cette partie suppose que les paramètres optiques (à travers k_a) sont connus et invariants au cours du temps. De ce fait, compte tenu de la complexité évidente de cette thérapie, il est très difficile de le valider de manière *in vivo*, limitant ainsi son utilisation dans un contexte clinique.

Or la principale motivation de ces travaux de thèse est de permettre le contrôle de la PDT par le biais d'un dispositif médical embarquant, entre autre chose, un modèle de la phase cytotoxique de la PDT. Ce modèle sera utilisé pour la synthèse d'une loi de commande en temps réel lors des traitements. Afin de garantir un résultat optimal, il devient alors primordial de minimiser la variabilité inter-patients sur la réponse thérapeutique et donc de rendre la commande la plus robuste possible. Dans la partie suivante, nous proposons un modèle fidèle du comportement cytotoxique de la thérapie photodynamique ainsi que son identification et validation à partir de données expérimentales. Une stratégie d'asservissement est développée et testée en condition *in vitro*.

Modélisation, estimation et asservissement du photoblanchiment

Sommaire

2.1	Motivation principale	33
2.2	Simulation du modèle physique	34
2.2.1	Inconvénients du modèle physique	35
2.3	Identification d'un modèle simplifié de photoblanchiment linéaire par parties	36
2.3.1	Caractérisation d'une structure de modèle linéaire par morceaux . .	36
2.3.2	Application au photoblanchiment dans un contexte idéal	39
2.3.3	Réduction de la structure du modèle	40
2.3.4	Identification d'une structure de modèle de type boîte grise	41
2.3.5	Représentation d'état augmentée pour prendre en compte un photoblanchiment parasite du système de mesure	44
2.3.6	Identification à partir de données <i>in vitro</i>	46
2.4	Observateur de photoblanchiment	48
2.4.1	Observateur de Kalman	48
2.5	Asservissement de la trajectoire de photoblanchiment	50
2.5.1	Signal d'activation	51
2.5.2	Algorithme d'asservissement	52
2.5.3	Test <i>in vitro</i>	53

2.1 Motivation principale

Un des principaux obstacles à une utilisation clinique courante de la PDT réside dans le manque de reproductibilité des réponses thérapeutiques. Afin de maîtriser cette variabilité nous proposons, dans ce chapitre, d'asservir un indicateur de l'efficacité du traitement à une trajectoire de référence fixée par le praticien. Une telle solution soulève plusieurs verrous scientifiques couvrant l'ensemble des disciplines de l'automatique : la recherche d'un bon indicateur mesurable, l'identifiabilité et l'identification d'un modèle parcimonieux, la conception d'un observateur, la synthèse d'une loi de commande et enfin l'implantation technologique de la solution proposée.

2.2 Simulation du modèle physique

Le modèle (1.21) a été implémenté sous SimuLink sous la forme d'un schéma bloc réalisé durant la thèse de Simona Dobre [84]. Il a ensuite été simulé avec un jeu de paramètres dont les valeurs sont issues d'une étude bibliographique (voir table 2.1). La sortie simulée est tracée à la Figure 2.1.

TABLE 2.1 – Valeurs des photoparamètres ainsi que des conditions initiales utilisées pour la simulation du modèle physique

Paramètre	Valeur	Condition initiale	Valeur
k_a	13.7	$[S_0]_0$	13.7
k_f	2×10^7	$[S_1]_0$	0
k_{CIS}	8×10^7	$[T_1]_0$	0
k_T	1×10^5	$[^3O_2]_0$	83×10^{-6}
k_l	1×10^5	$[^1O_2]_0$	0
k_{ox}	1×10^5	$[M]_0$	830×10^{-6}
k_{Pb}	1.6×10^6	u_P	0
k_p	1250	u_O	1.66×10^{-5}

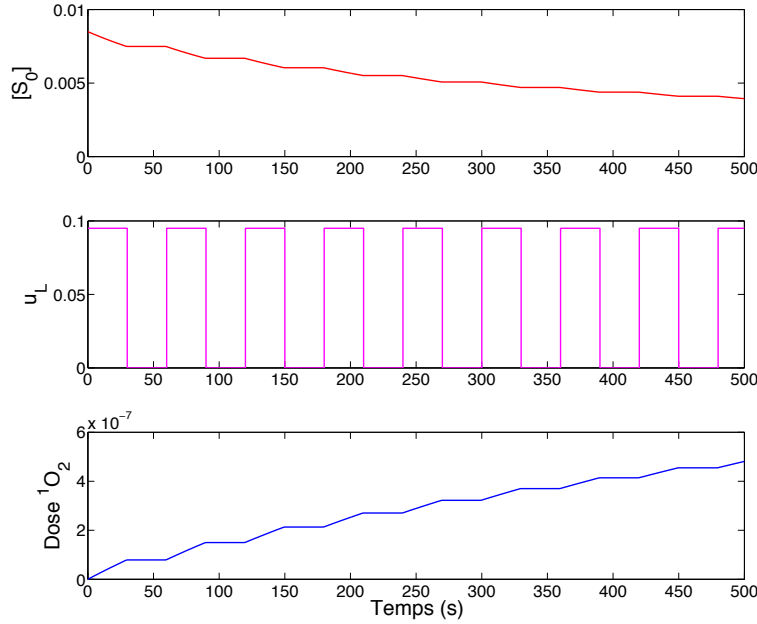


FIGURE 2.1 – Résultats de simulation du modèle physique des photoréactions de type II issues de la PDT

On y observe, du haut vers le bas, la concentration (en rouge) de l'agent photosensibilisant (autrement dit la courbe de photoblanchiment du médicament photoactivable), en magenta le

signal carré du rayon lumineux appliqué sur la zone à traiter, et en bleu la dose d'oxygène singulet (espèce photocytotoxique à l'origine de l'efficacité thérapeutique). Le déclin de $[S_0]$ correspond au phénomène connu sous le nom de photoblanchiment du photosensibilisateur, c'est-à-dire une altération des propriétés du fluorophore causée par les molécules d'oxygène singulet. La dose d'oxygène singulet générée pendant le traitement est très difficilement mesurable en l'état actuel de la technologie disponible sur le marché. Cependant, en comparant la première et la dernière courbe, nous pouvons directement confirmer que la courbe de photoblanchiment est un bon indicateur de la production d'oxygène singulet car l'indice de corrélation calculé entre ces deux courbes est de -0.99 . Ce résultat corrobore notre choix d'utiliser ce signal comme marqueur temporel mesurable de la photocytotoxicité (production d'espèces cytotoxiques) durant le traitement.

2.2.1 Inconvénients du modèle physique

Dans le cas de la thérapie photodynamique, le développement d'un modèle de simulation du comportement dynamique du phénomène de photoblanchiment est un challenge. Il y a trois raisons principales à cela :

- le comportement non linéaire du phénomène de photoblanchiment visible sur les réponses du simulateur présentées à la Figure 2.1. En effet, on observe clairement un comportement asymétrique de la réponse lorsque le signal d'excitation lumineuse est activé ou pas. Le modèle physique (1.21) indique la présence de termes bilinéaires et quadratiques à l'origine de ce comportement. Toutefois ce modèle demeure trop complexe pour être utilisé dans un objectif de commande ou pour la synthèse d'un observateur. En outre, les résultats d'une analyse de sensibilité globale réalisée dans la thèse de Simona Dobre, [84], a montré que beaucoup de paramètres étaient peu sensibilisants vis-à-vis du signal de fluorescence émis par l'agent photosensibilisant. Un modèle plus parcimonieux en paramètres est donc envisageable.
- De plus, en pratique on ne peut mesurer les spectres de fluorescence de l'agent photosensibilisant que pendant les phases où le LASER de traitement est éteint sinon il sature le signal en raison de sa forte puissance. Nous sommes donc "aveugles" la moitié du temps et cette difficulté pose un problème d'identifiabilité pratique du modèle. Par ailleurs, une seule des cinq variables mises en jeu est directement mesurable. De ce peu d'information, le processus d'identification aura bien du mal à estimer une valeur unique et suffisamment précise pour chacun des huit paramètres du modèle physique. Pour l'heure, à part quelques exceptions [18–20, 41], très peu d'études ont témoigné d'une réussite dans la mesure de la concentration d'oxygène singulet ($[^1O_2]$) par le biais de la détection de son intensité de luminescence à 1272 nm. En pratique, ces techniques restent encore très difficiles à reproduire, en particulier à cause des variations interpatients, mais également à cause de la relative complexité et au coût des appareillages mis en œuvre pour mesurer la faible luminescence de l'oxygène singulet.
- Les nombreux paramètres du modèle sont le plus souvent inconnus et doivent donc être identifiés à partir de données expérimentales, ou être choisis dans la littérature (plus courant étant donné que l'identifiabilité pratique du modèle est quasi-impossible, [84]). Ces valeurs disponibles dans la littérature possèdent parfois une très grande plage de variations (voir tableau 2.2), en effet, ces paramètres dépendent pour la plupart directement du contexte expérimental (les différents types de milieux rencontrés ne réagissent pas de la même façon, les PS utilisés ne possèdent pas les mêmes caractéristiques photophysiques, *etc.*). Se baser uniquement sur des valeurs de paramètres issues de la littérature ne peut conduire qu'à

introduire une part non négligeable d'incertitude sur la sortie simulée.

Pour toutes ces raisons, nous avons décidé d'adapter et d'appliquer une méthode d'identification de système dynamique au phénomène de photoblanchiment. L'objectif final sera d'utiliser ce modèle pour la conception d'un observateur d'état du photoblanchiment, lui-même intégré dans la réalisation d'une méthode d'asservissement de la trajectoire de photoblanchiment.

2.3 Identification d'un modèle simplifié de photoblanchiment linéaire par parties

L'identification de système consiste à rechercher un modèle mathématique d'un système dynamique à partir de signaux de mesure sur ses variables d'entrée-sortie. Ce modèle est caractérisé par une structure et des paramètres qu'il convient de choisir et d'ajuster, afin de reproduire au mieux le comportement entrée-sortie du système. Selon que l'on dispose ou pas de connaissance *a priori* sur la structure ou les paramètres, on parle alors de *boîtes grises* ou *boîtes noires* pour désigner ces modèles.

Traditionnellement, les méthodes d'identification de système sont employées afin de déterminer des modèles permettant la synthèse de lois de commande. Ce domaine d'utilisation conventionnel n'est toutefois pas le seul et les méthodes sont aussi utilisées pour :

- l'estimation de paramètres physiques non directement mesurables ;
- le diagnostic de systèmes à base de modèle ;
- la simulation, utilisée à des fins de conception, de prévision ou de formation ;
- l'interprétation d'essais.

Bien que les méthodes soient essentiellement développées par des automaticiens et des mathématiciens appliqués, elles peuvent être appliquées dans des domaines très variés allant des processus de fabrication à l'économétrie, en passant par la biologie, les moyens de transport ou les processus environnementaux [91].

Dans cette partie nous proposons de modéliser la dynamique de photoblanchiment en nous basant sur une approche de type boîte grise fondée sur une structure de modèle linéaire par morceaux. Les paramètres du modèle seront ensuite estimés directement à partir de signaux de mesure expérimentaux.

2.3.1 Caractérisation d'une structure de modèle linéaire par morceaux

A partir du modèle d'état non-linéaire présenté à la Section 1.2.2, deux possibilités peuvent être envisagées :

1. utiliser un modèle non-linéaire simplifié. La thèse de Simona Dobre, [84, 92], a cherché à développer cet axe, à l'aide de méthode d'analyse de sensibilité pour simplifier le modèle en supprimant les paramètres trop peu sensibilisants. Les résultats montraient la présence de quatre paramètres significatifs sur huit. Toutefois, la structure du modèle restait trop complexe dans la perspective de construction d'un observateur ;
2. une autre solution serait de linéariser le modèle. Mais la pertinence de ce type de solution dépend de la nature de la non-linéarité. Ici, on observe clairement dans les simulations un comportement différent en présence ou non de lumière (variable d'entrée). Ce fait est expliqué par la présence d'un terme bilinéaire dans la première équation du modèle physique (Section 1.2.2). Dans le cas de ce type de système et lorsque les signaux d'entrée sont binaires ou générés par un bloqueur d'ordre zéro, alors une solution possible de simplification

TABLE 2.2 – Valeurs des photoparamètres proposées dans la littérature

Paramètre	PS	Valeur	Source
k_a	TPC-Ahx-ATWLPPR	13.7	[85]
	mTHPC	633	[20]
	Photofrin	46.67	[86]
k_f	TPC-Ahx-ATWLPPR	2.21×10^7	[85]
	Photofrin	2×10^7	[87]
k_{CIS}	TPC-Ahx-ATWLPPR	7.55×10^7	[85]
	Photofrin	8×10^7	[87]
k_T	TPC-Ahx-ATWLPPR	46.5	[85]
	HpD	9.25×10^8	[82]
	DP	6.6×10^8	[88]
	Br-DP	7.5×10^8	[88]
	Br2-DP	5.9×10^8	[88]
k_l	TPC-Ahx-ATWLPPR	9.68×10^5	[85]
	Photofrin	10^6 à 10^7	[87]
	HpD	3.1×10^4 ou 3.1×10^5	[82]
k_{ox}	TPC-Ahx-ATWLPPR	2.53×10^9	[85]
k_{Pb}	TPC-Ahx-ATWLPPR	1.1×10^5	[85]
	mTHPC	$1.2 \cdot 10^7$ à 1.7×10^7	[20]
k_p	TPC-Ahx-ATWLPPR	1.2×10^3	[85]
	Photofrin	10^3 à 10^4	[87]
Condition initiale	PS	Valeur (M)	Source
$[S_0]_0$	TPC-Ahx-ATWLPPR	8.5×10^{-6}	[85]
	Photofrin	1.7×10^{-4}	[39]
	Photofrin, mTHPC, ALA-PpIX	7×10^{-6}	[89]
	mTHPC	7.6×10^{-6}	[20]
$[S_1]_0$	-	0	Admis
$[T_1]_0$	-	0	Admis
$[^3O_2]_0$	TPC-Ahx-ATWLPPR	83×10^{-6}	[85]
	Porphyrine	240×10^{-6}	[90]
	Photofrin, mTHPC, ALA-PpIX	83×10^{-6}	[89]
	Photofrin	$\approx 216 \times 10^{-6}$	[45]
	HpD	120×10^{-6}	[82]
$[^1O_2]_0$	-	0	Admis
$[M]_0$	TPC-Ahx-ATWLPPR	830×10^{-6}	[85]
u_P	-	0	Admis
u_O	TPC-Ahx-ATWLPPR	1.66×10^{-5}	[84]
	Photofrin, mTHPC, ALA-PpIX	7×10^{-4}	[89]

est celle proposée dans [93], en utilisant un modèle ARX par morceaux. C'est cette solution que nous avons choisi de tester en première approche de par sa simplicité de mise en œuvre.

Ici, le déclin du signal de fluorescence dû au photoblanchiment diffère que l'on soit dans :

1. une phase d'illumination (LASER de traitement activé, le photoblanchiment se produit) ;
2. une phase d'obscurité (LASER de traitement désactivé, le photoblanchiment est en suspens).

On entreprend de représenter cette double dynamique par une structure de modèle linéaire par morceaux. Ledit modèle peut être décomposé selon le signe des variations du signal d'entrée en deux structures linéaires dédiées à chacune des réactions du système, [94, 95]. Il peut également être présenté comme un modèle LPV (*Linear Parametrically Varying*, développé dans l'Annexe A) particulier dans lequel la variable de séquençement est dépendante de la variable d'entrée du modèle. Toutefois, .

L'approche choisie est basée sur une première modélisation reposant sur une structure ARX (*Auto Regressive model with eXternal inputs*) qui est ensuite transformée en représentation d'état. Les deux formes de représentation mettent en jeu une variable $b(t)$, binaire et déterministe, permettant la commutation entre les deux modèles linéaires. Sa valeur dépend du signe des variations du signal d'entrée et est considérée comme une nouvelle entrée exogène dans le modèle ARX.

En raison des hypothèses liées à l'intégration du bruit dans le modèle, les paramètres de la structure ARX sont souvent biaisés. Cela pose notamment des problèmes lorsque l'application finale est d'utiliser ces paramètres pour caractériser un système physique, ou de comparer des caractéristiques pharmacocinétiques d'un médicament (voir Section 1.1 de la deuxième partie de cette thèse). Cela étant, dans notre étude, dont l'objectif final est la commande d'un procédé, nous considérons d'avantage la capacité du modèle à reproduire de manière acceptable le comportement observé du système. Par ailleurs, il est souvent admis qu'autoriser un léger biais permet de considérablement diminuer la variance associée, et donc l'erreur quadratique moyenne sur les paramètres.

Modèle ARX par morceaux

Soit une structure classique de modèle ARX suivante, [96] :

$$y(t_k) + a_1 y(t_{k-1}) + \dots + a_{n_a} y(t_{k-n_a}) = b_1 u(t_{k-n_k}) + \dots + b_{n_b} u(t_{k-n_k-n_b+1}) + e(t_k) \quad (2.1)$$

où $y(t_k)$ désigne la variable de sortie et $u(t_k)$ celle d'entrée à l'instant discret t_k . n_a et n_b définissent respectivement les ordres des polynômes autoregressifs et externes. n_k correspond au retard de la sortie $y(t_k)$ par rapport à l'entrée $u(t_k)$. Le vecteur de paramètres est défini par $\theta = [a_1, \dots, a_{n_a}, b_1, \dots, b_{n_b}]^T$. Enfin, le signal d'erreur $e(t_k)$ est un processus stochastique stationnaire et blanc, de moyenne nulle et de variance σ^2 .

Afin de modéliser un comportement asymétrique du phénomène étudié, il suffit de considérer non plus une mais deux structures ARX, toutes deux conditionnées par le signe des variations de $u(t_k)$:

$$\begin{aligned} y(t_k) + a_{1,1} y(t_{k-1}) + \dots + a_{1,n_a} y(t_{k-n_a}) \\ = b_{1,1} u(t_{k-n_k}) + \dots + b_{1,n_b} u(t_{k-n_k-n_b+1}) + e_1(t_k) \quad \text{si} \quad \delta u(t_k) \geq 0 \end{aligned} \quad (2.2)$$

et :

$$\begin{aligned} y(t_k) + a_{2,1} y(t_{k-1}) + \dots + a_{2,n_a} y(t_{k-n_a}) \\ = b_{2,1} u(t_{k-n_k}) + \dots + b_{2,n_b} u(t_{k-n_k-n_b+1}) + e_2(t_k) \quad \text{si} \quad \delta u(t_k) \leq 0 \end{aligned} \quad (2.3)$$

où $\delta u(t_k) = u(t_k) - u(t_{k-1})$ correspond aux variations du signal d'entrée. $e_1(t_k)$ et $e_2(t_k)$ sont deux bruits blancs de moyenne nulle indépendants et identiquement distribués.

Les deux modèles (2.2) et (2.3) peuvent être combinés en une seule relation augmentée de la forme :

$$\begin{aligned} & y(t_k) + a_{1,1}y(t_{k-1}) + (a_{2,1} - a_{1,1})y(t_{k-1})b(t_k) + \dots \\ & \dots + a_{1,n_a}y(t_{k-n_a}) + (a_{2,n_a} - a_{1,n_a})y(t_{k-n_a})b(t_k) \\ & = b_{1,1}u(t_{k-n_k}) + (b_{2,1} - b_{1,1})u(t_{k-n_k})b(t_k) + \dots \\ & \dots + b_{1,n_b}u(t_{k-n_k-n_b+1}) + (b_{2,n_b} - b_{1,n_b})u(t_{k-n_k-n_b+1})b(t_k) \\ & + e_1(t_k) + (e_2(t_k) - e_1(t_k))b(t_k) \end{aligned} \quad (2.4)$$

La variable de séquençement $b(t_k)$ est une variable binaire nécessaire à la sélection des deux modèles linéaires. Elle est définie de la manière suivante :

$$\begin{cases} b(t_k) = 0 & \text{si } \delta u(t_k) > 0 \\ b(t_k) = 1 & \text{si } \delta u(t_k) < 0 \\ b(t_k) = b(t_{k-1}) & \text{si } \delta u(t_k) = 0 \end{cases} \quad (2.5)$$

2.3.2 Application au photoblanchiment dans un contexte idéal

Une structure de modèle ARX, comme décrite précédemment, est appliquée aux signaux d'entrée/sortie discrets avec $n_a = n_b = n_k = 1$. La simplicité de cette structure se justifiera plus tard par l'absence de mesures durant les phases d'illumination. Ne pouvant observer le déclin réel du photoblanchiment, nous choisissons délibérément d'opter pour la structure la plus simple. En outre, le faible nombre de paramètres permettra également d'espérer une convergence plus rapide des algorithmes itératifs d'optimisation utilisés par la suite. La structure de modèle choisie pour décrire la dynamique de photoblanchiment devient donc :

$$\begin{aligned} (1 + a_{1,1}q^{-1})y(t_k) &= (a_{1,1} - a_{2,1})u_1(t_{k-1}) + b_{1,1}u_2(t_{k-1}) \\ &+ (b_{2,1} - b_{1,1})u_3(t_{k-1}) + e(t_k) \end{aligned} \quad (2.6)$$

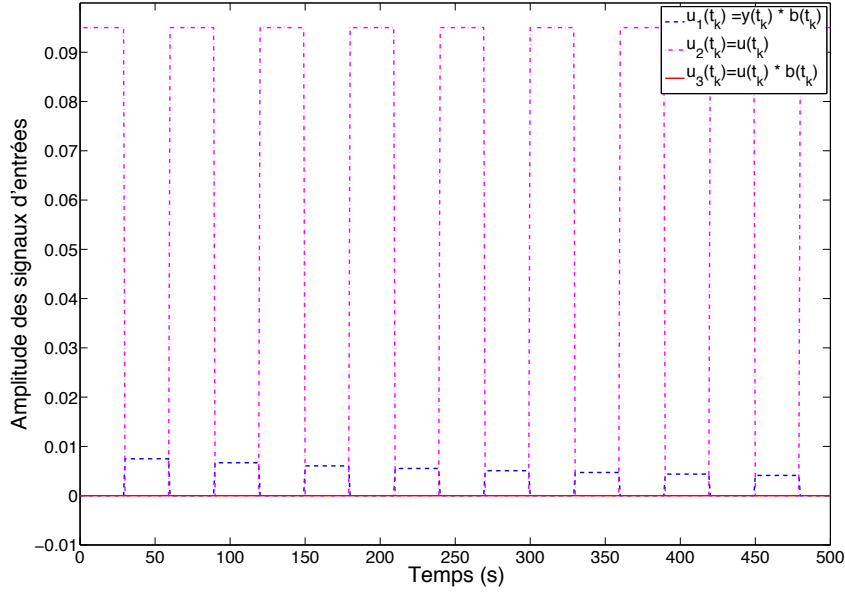
avec $y(t_k)$ l'intensité de fluorescence du PS mesurée, $u_1(t_k) = y(t_k)b(t_k)$, $u_2(t_k) = u(t_k)$, $u_3(t_k) = u(t_k)b(t_k)$, $u(t_k)$ est le signal d'illumination envoyé à la tumeur et $e(t_k) \stackrel{iid}{\sim} \mathcal{N}(0, s^2)$. q^{-1} est l'opérateur de retard. Dans cette application, la variable de séquençement b désigne les phases d'extinction du LASER. Elle est nulle dans les phases d'illumination et unitaire dans les phases d'obscurité.

Dans notre cas, les trois entrées sont présentées à la Figure 2.2, où l'on distingue que la partie du modèle $(b_{2,1} - b_{1,1})$, associée au troisième signal d'entrée $u_3(t_k) = b(t_k)u(t_k)$, n'est pas identifiable dans ces conditions expérimentales puisque $u_3(t_k) = 0$ pendant toute la durée de l'expérience.

Plus précisément, seulement $b_{2,1}$, le gain statique associé aux phases OFF du LASER, n'est pas identifiable. On se rend alors compte que le modèle (2.6) n'est pas identifiable *a posteriori*¹¹. Par conséquent, deux options sont possibles :

- proposer une structure de modèle réduite ;

11. L'identifiabilité *a posteriori* définit la capacité d'un modèle à fournir une solution unique, ou du moins un nombre fini de solutions, à l'estimation des paramètres dans un cadre expérimental (entrées/sorties, conditions initiales et instants de mesures fixés). Elle diffère donc de l'identifiabilité *a priori*, dite structurelle, qui se place dans un contexte idéal et théorique (sans données), [84, 97].


 FIGURE 2.2 – Signaux d'entrée $u_1(t_k)$, $u_2(t_k)$ et $u_3(t_k)$ du modèle ARX

- ou introduire des connaissances *a priori* sur les paramètres du modèles et sur $b_{2,1}$ en particulier.

2.3.3 Réduction de la structure du modèle

Afin de contourner les problèmes liés à l'identifiabilité pratique de $b_{2,1}$, une première solution est de réduire la structure de modèle en supprimant la troisième variable d'entrée, inutile dans notre contexte expérimental. Le modèle (2.6) devient alors :

$$(1 + a_{1,1}q^{-1})y(t_k) = (a_{1,1} - a_{2,1})u_1(t_{k-1}) + b_{1,1}u_2(t_{k-1}) + e(t_k) \quad (2.7)$$

Nous avons ensuite appliqué ce modèle à des données non bruitées fournies par le simulateur (1.21). Les réponses estimées par méthode des moindres carrés linéaires (*via* la fonction `arx` de Matlab) sont comparées avec les données originales à la Figure 2.3.

La capacité du modèle à reproduire le comportement du système est mesurée grâce à l'indice FIT ¹² de qualité de reproduction du comportement, établi à partir de l'erreur quadratique moyenne normalisée :

$$FIT = 100 \left(1 - \frac{\|\hat{y}(t_k) - y_m(t_k)\|_2}{\|y_m(t_k) - \mu_{y_m}\|_2} \right) \quad (2.8)$$

où $y_m(t_k)$ désigne la sortie mesurée, $\hat{y}(t_k)$ la réponse déterministe du modèle et μ_{y_m} la moyenne de $y_m(t_k)$. Plus la valeur de FIT est proche de 100 %, meilleure est la capacité du modèle à reproduire le comportement observé. Dans notre cas, la reproduction est jugée acceptable (plus de 85 %). Toutefois on observe aussi des résidus dont la trajectoire témoigne clairement d'un comportement non-linéaire qui n'a pas été pris en compte dans le modèle. Un examen du modèle physique en Section 1.2.2 montre en effet la présence de termes quadratiques supplémentaires qui

12. Ce critère sera utilisé partout dans cette thèse lorsque l'on parlera de *fitting*.

peuvent expliquer ce biais de comportement. Les valeurs des estimés sont présentés au tableau 2.3 ($c_v = \frac{\sigma_\theta}{\mu_\theta} \times 100$, où σ_θ est l'écart type des estimés fourni par l'algorithme).

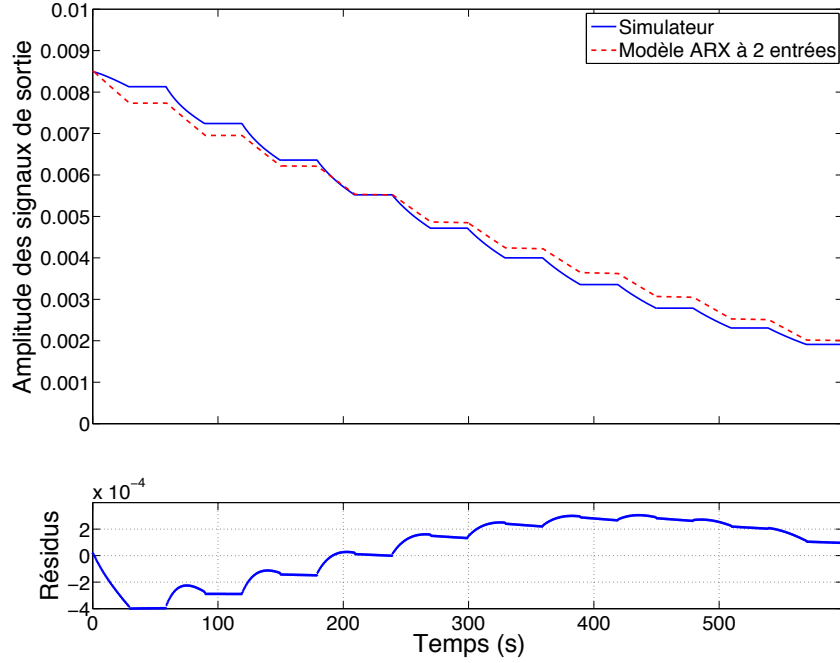


FIGURE 2.3 – Réponse du modèle empirique simplifié (modèle ARX en rouge) comparée à la réponse numérique du simulateur (en bleu) en haut et les résidus associés en bas

TABLE 2.3 – Estimés et leurs incertitudes

Paramètres	Estimés	σ_θ	c_v (%)
$a_{1,1}$	-0.999	5.11×10^{-5}	$5.1 \cdot 10^{-3}$
$a_{1,1} - a_{2,1}$	8.543×10^{-4}	5.63×10^{-5}	6.6
$b_{1,1}$	-6.395×10^{-5}	2.75×10^{-6}	4.3

On remarque que pour ces valeurs, on obtient un paramètre $a_{2,1} \approx -1$. Cette information sera utilisée dans la section suivante.

2.3.4 Identification d'une structure de modèle de type boîte grise

Dans la modélisation expérimentale précédente, nous avons proposé une solution capable de décrire le comportement asymétrique du photoblanchiment lorsque le signal lumineux est activé puis désactivé. Dans cette nouvelle section, nous améliorons la solution pour répondre au problème lié à l'incapacité à mesurer les spectres de fluorescence de l'agent photosensibilisant pendant les phases d'illumination de la tumeur par le LASER de traitement. Pour contourner cet obstacle, nous allons introduire une connaissance *a priori* qui tient en deux points :

- pendant les phases obscures (pas de lumière de traitement), nous supposons qu’il n’y a pas de déclin de fluorescence (intensité constante). Cette hypothèse est corroborée par les réponses du simulateur, voir Figur 2.1. Ce comportement est représenté dans notre modèle par un bloqueur d’ordre zéro.
- pendant les phases d’illumination, phases durant lesquelles nous ne pouvons observer aucune mesure, nous supposons que le comportement suit celui d’un système du premier ordre.

Pour intégrer cette connaissance, nous avons choisi d’utiliser une représentation d’état. Ce choix était initialement dicté par la boîte à outils *System Identification* de Matlab, dont la seule fonction capable d’intégrer une connaissance *a priori* est **idgrey** qui repose sur une représentation d’état. Toutefois, en utilisant d’une part un critère d’estimation fondé sur l’erreur de sortie et d’autre part un algorithme d’optimisation itératif, il est tout-à-fait possible d’utiliser la structure ARX décrite à l’équation (2.7) pour estimer les paramètres du modèle boîte grise.

Représentation d’état

Tout d’abord, nous transformons le modèle ARX (2.6) en une représentation d’état discrète définie par :

$$\begin{cases} x(t_{k+1}) &= -a_{1,1}x(t_k) + BU(t_k) \\ y(t_k) &= x(t_k) + v(t_k) \end{cases} \quad (2.9)$$

où $B = \begin{pmatrix} a_{1,1} - a_{2,1} & b_{1,1} & b_{2,1} - b_{1,1} \end{pmatrix}$, $U^T(t_K) = (x(t_k)b(t_k) \quad u(t_k) \quad u(t_k)b(t_k))$ et $v(t_k) \stackrel{iid}{\sim} \mathcal{N}(0, s^2)$.

Modélisation boîte grise à partir de données expérimentales

Compte tenu de la faible cinétique d’incorporation du PS dans les cellules par rapport à celle du photoblanchiment, il est convenu d’admettre que la quantité de PS (et donc, indirectement, l’intensité de fluorescence observée) ne peut augmenter au cours d’un traitement par PDT. Par conséquent, le comportement de la partie du modèle relative aux phases OFF du traitement peut être considérée comme constante. Cela peut être imposé en fixant $a_{2,1} = -1$ et $b_{2,1} = 0$. Ainsi, seuls $a_{1,1}$ et $b_{1,1}$ seront estimés à partir de données expérimentales. Le modèle (2.9) devient donc :

$$\begin{cases} x(t_{k+1}) &= -a_{1,1}x(t_k) + BU(t_k) \\ y(t_k) &= x(t_k) + v(t_k) \end{cases} \quad (2.10)$$

où $B = \begin{pmatrix} 1 + a_{1,1} & b_{1,1} & -b_{1,1} \end{pmatrix}$, $U^T(t_k) = (x(t_k)b(t_k) \quad u(t_k) \quad u(t_k)b(t_k))$ et $v(t_k) \stackrel{iid}{\sim} \mathcal{N}(0, s^2)$.

Identification intermédiaire à partir de données expérimentales

Dans la pratique, les données d’intensité de fluorescence du PS ne sont accessibles que pendant les phases d’obscurité, autrement dit, les données expérimentales sont incomplètes. Une solution pour identifier un modèle à partir de données de ce type pourrait être de passer par une approche à temps continu, dans laquelle nous serions alors affranchie de la période d’échantillonnage. Or, les algorithmes de la boîte à outils CONTSID ne permettent pas de prendre en compte les connaissances *a priori* sur les paramètres.

Pour répondre à notre problème, nous avons donc utilisé la même structure que précédemment (intégrant une connaissance *a priori*) et un critère d’estimation fondée sur la minimisation de

l'erreur de sortie. Ceci est possible en utilisant la fonction d'optimisation non-linéaire `lsqnonlin` qui minimise la fonction de coût :

$$J(\theta) = \sum_{k=1}^N e(t_k, \theta)^T \cdot e(t_k, \theta) \quad (2.11)$$

où $e(t_k, \theta) = y_m(t_k) - \hat{y}(t_k, \theta)$ avec $\hat{y}(t_k, \theta)$ est la réponse déterministe du modèle (2.17) et θ le vecteur de paramètres, en suivant le critère :

$$\hat{\theta} = \arg \min_{\theta} (J(\theta)) \quad (2.12)$$

Cet algorithme itératif nécessite cependant d'être initialisé, dans notre cas nous avons choisi de le faire à partir des paramètres identifiés du modèle ARX (2.7) à partir des données du simulateur. Il ne fournit pas de matrice de covariance sur les paramètres, leur incertitude a donc été estimées par des simulations de Monte Carlo ($N_{sim} = 1000$) et par *Bootstrapping*.

Les données utilisées pour identifier notre modèle sont issues de réponses en boucle ouverte du système *in vitro* à une excitation périodique de rapport cyclique 50 %.

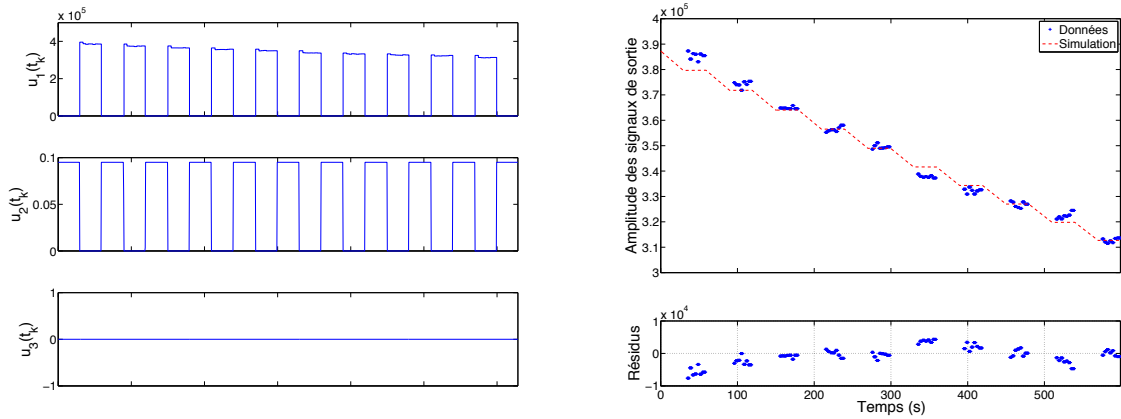


FIGURE 2.4 – À gauche les signaux d'entrées $x(t_k)b(t_k)$, $u(t_k)$ et $u(t_k)b(t_k)$. À droite, la réponse du modèle d'état de type boîte grise (en rouge) comparée aux données mesurées en haut et les résidus associés en bas

Les paramètres estimés sont présentés au tableau 2.4 et la Figure 2.4 présente le résultat de simulation du modèle comparé aux données mesurées. L'adéquation aux données est légèrement supérieure à 87 %.

TABLE 2.4 – Paramètres estimés à partir de données *in vitro*

Paramètres	Estimés	σ_{θ}	c_v (%)
$a_{1,1}$	-0.998	1.57×10^{-6}	1.6×10^{-4}
$b_{1,1}$	-602.48	5.89	8.7×10^{-1}

Une analyse graphique des résidus est présentée à la Figure 2.5 et deux points sont à signaler :

1. le premier tracé montre que les résidus ne sont pas présents de manière homogène par rapport au signal mesuré. En effet, les propriétés statistiques des résidus changent en fonction de la valeur de sortie : ils ne sont donc pas homoscédastiques. Les écarts restent relativement faibles par rapport aux valeurs de la sortie, mais cela montre tout de même que notre modèle n'explique pas la totalité du comportement physique du système. Ce phénomène avait déjà été observé sur les résultats de simulation présentés précédemment.
2. Les deux autres tracés visent à tester l'hypothèse de normalité sur le bruit et montrent des résultats acceptables¹³. Même si l'histogramme n'approche que grossièrement une Gaussienne, on voit clairement que les résidus restent centrés en 0.

Ces observations, associées à la reproduction acceptable du comportement du système, nous permettent de valider notre approche. Cependant, elle peut encore être améliorée en prenant en compte le phénomène de photoblanchiment parasite induit par le spectrofluorimètre grâce à une représentation d'état augmentée.

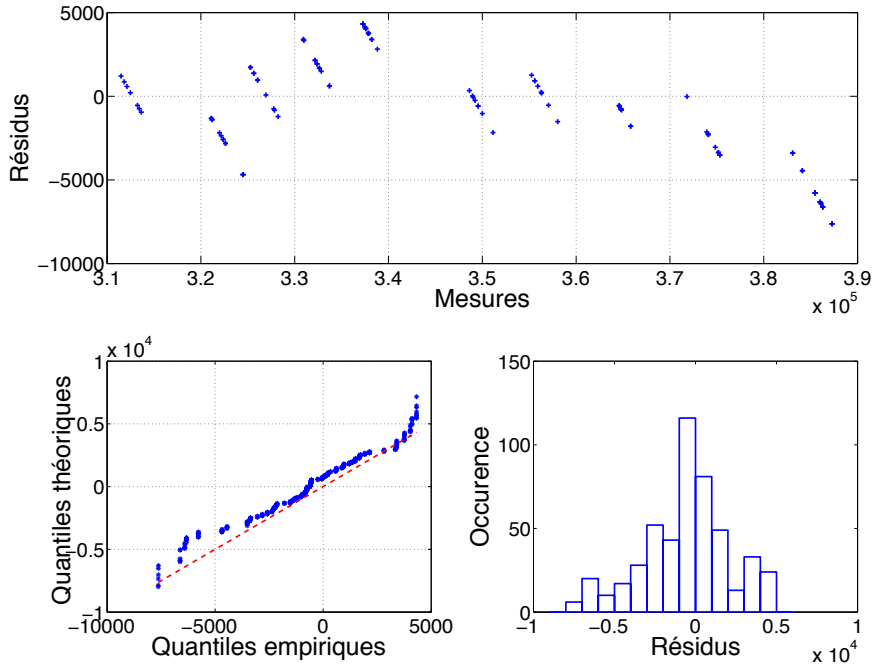


FIGURE 2.5 – Tracé des résidus en fonction des mesures (en haut), tracé quantile-quantile (en bas à gauche) et histogramme des résidus (en bas à droite)

2.3.5 Représentation d'état augmentée pour prendre en compte un photoblanchiment parasite du système de mesure

Dans notre application à la thérapie photodynamique, la variable d'entrée $u(t_k)$ correspond au signal de commande de la source LASER de traitement. Il s'agit d'un signal binaire (ON/OFF) à rapport cyclique variable. Lorsqu'il est actif, l'intensité du signal lumineux est réglée à une

13. Le tracé quantiles-quantiles est un test statistique non paramétrique où l'on trace les quantiles théoriques d'une loi normale en fonction de ceux des résidus. Plus ces derniers se rapprochent de la normalité, plus le tracé obtenu se rapprochera d'une droite.

valeur préalablement choisie par l'utilisateur. Le modèle (2.4) peut être appliqué directement à notre cas d'étude.

Cependant, dans le contexte de nos travaux sur le contrôle de la thérapie photodynamique et plus particulièrement du phénomène de photoblanchiment engendré par la diode LASER de traitement, nous allons décomposer le signal de photoblanchiment mesuré en deux grandeurs :

- d'une part le photoblanchiment "thérapeutique" produit par la diode de traitement (défini par l'équation (2.13)) ;
- et d'autre part, le photoblanchiment "parasite" produit par la diode d'excitation de notre système de mesure (défini par l'équation (2.14)).

En effet, le principe de mesure par spectrofluorimétrie implique d'exciter le système biologique à observer pour pouvoir mesurer l'intensité de la fluorescence émise. Dans notre cas, le spectrofluorimètre va donc provoquer une excitation partielle (en surface de la zone de mesure) de l'agent photosensibilisant. Cette excitation due à l'appareil de mesure va engendrer un photoblanchiment "parasite" qui va s'ajouter au photoblanchiment "thérapeutique". Seul le dernier nous intéresse, il nous faut donc trouver un moyen de les séparer. Ce sera notamment le rôle de l'observateur d'état décrit dans la Section 2.4. Mais auparavant, il est nécessaire de les discriminer dans notre modèle. La Figure 2.6 présente la réponse du spectrofluorimètre seul, sans traitement, on y observe clairement une décroissance de la réponse due en ce point de mesure au photoblanchiment parasite de l'agent photosensibilisant.

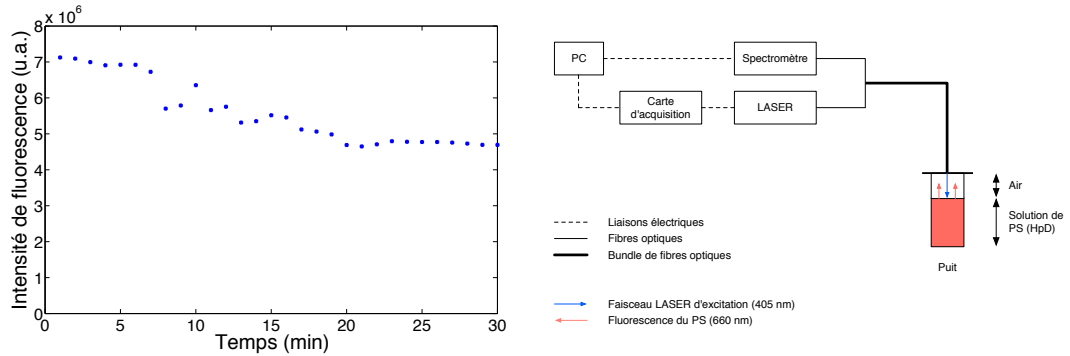


FIGURE 2.6 – Photoblanchiment "parasite" observé (à gauche) lors d'une expérience *in vitro* de spectrofluorimétrie (illustrée à droite)

Dans ce but, nous appliquons la structure de modèle (2.6) aux deux phénomènes de photoblanchiment. Nous choisirons en première approche de nous restreindre à des modèles d'ordre unitaire. Par conséquent les deux modèles ARX utilisés sont décrit par (2.13) et (2.14) :

$$(1 + a_{t_1}q^{-1})x_t(t_k) = (a_{t_1} - a_{t_2})u_1(t_{k-1}) + b_{t_1}u_2(t_{k-1}) + (b_{t_2} - b_{t_1})u_3(t_{k-1}) + e_t(t_k) \quad (2.13)$$

où $x_t(t_k)$ est le signal de photoblanchiment uniquement lié l'entrée $u_t(t_k)$ correspondant à la source LASER thérapeutique, avec : $u_1(t_k) = x_t(t_k)b(t_k)$, $u_2(t_k) = u_t(t_k)$ et $u_3(t_k) = u_t(t_k)b(t_k)$. $[a_{t_1}, b_{t_1}]$ et $[a_{t_2}, b_{t_2}]$ sont respectivement les paramètres des modèles ARX des phases ON et OFF. $b(t_k)$ correspond à la variable binaire de séquençement définie par (2.5). Enfin, $e_t(t_k)$ est un bruit blanc moyenne nulle.

$$(1 + a_pq^{-1})x_p(t_k) = b_pu_p(t_{k-1}) + e_p(t_k) \quad (2.14)$$

avec $x_p(t_k)$ le signal de photoblanchiment parasite lié l'entrée $u_p(t_k)$ correspondant à la source LASER d'excitation. $[a_p, b_p]$ sont les paramètres du modèle ARX et $e_p(t_k)$ dénote le bruit blanc associé au modèle.

Représentation d'état augmenté

Partant des équations aux récurrences (2.13) et (2.14) nous pouvons construire une représentation d'état augmentée prenant en compte les deux structures linéaires :

$$\begin{cases} x_t(t_{k+1}) &= -a_{t_1}x_t(t_k) + (a_{t_1} - a_{t_2})u_1(t_k) + b_{t_1}u_2(t_k) + (b_{t_2} - b_{t_1})u_3(t_k) \\ x_p(t_{k+1}) &= -a_px_e(t_k) + b_pu_e(t_k) \\ y_m(t_k) &= x_t(t_k) + x_p(t_k) + v(t_k) \end{cases} \quad (2.15)$$

où $v(t_k)$ est un bruit blanc stationnaire.

En considérant les vecteurs d'états, d'entrées augmentés et de bruits tels que :

$$X(t_k) = \begin{bmatrix} x_t(t_k) \\ x_p(t_k) \end{bmatrix} \quad U(t_k) = \begin{bmatrix} x_t(t_k)b(t_k) \\ u_t(t_k) \\ u_t(t_k)b(t_k) \\ u_p(t_k) \end{bmatrix} \quad (2.16)$$

le modèle d'état représenté par (2.15) est alors équivalent à un modèle d'état bilinéaire défini par :

$$\begin{cases} X(t_{k+1}) &= AX(t_k) + BU(t_k) \\ y_m(t_k) &= CX(t_k) + DU(t_k) + v(t_k) \end{cases} \quad (2.17)$$

où les matrices A , B , C et D sont construites de la façon suivante :

$$\begin{aligned} A &= \begin{bmatrix} -a_{t_1} & 0 \\ 0 & -a_p \end{bmatrix} & B &= \begin{bmatrix} a_{t_1} - a_{t_2} & b_{t_1} & b_{t_2} - b_{t_1} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & b_p \end{bmatrix} \\ C &= [1 \quad 1] & D &= [0 \quad 0 \quad 0 \quad 0] \end{aligned} \quad (2.18)$$

Comme réalisé à la Section 2.3.4, nous introduisons une connaissance *a priori* sur le comportement du système durant les phases OFF en fixant $a_{t,2} = -1$ et $b_{t_2} = 0$. Le modèle décrit par (2.17) et (2.18) devient alors :

$$\begin{aligned} A &= \begin{bmatrix} -a_{t_1} & 0 \\ 0 & -a_p \end{bmatrix} & B &= \begin{bmatrix} 1 + a_{t_1} & b_{t_1} & -b_{t_1} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & b_p \end{bmatrix} \\ C &= [1 \quad 1] & D &= [0 \quad 0 \quad 0 \quad 0] \end{aligned} \quad (2.19)$$

2.3.6 Identification à partir de données *in vitro*

Dans cette partie, nous proposons l'estimation des paramètres du modèle de photoblanchiment défini par (2.17) et (2.19). La même méthode que celle décrite à la Section 2.3.4 a été appliquée. Comme les deux dynamiques composant notre modèle sont fortement liées et s'agissant toute les deux d'un phénomène de photoblanchiment, les paramètres a_p et b_p ont été initialisés aux mêmes valeurs que a_{t_1} et b_{t_1} . Les résultats de la phase d'estimation sont présentés à la Figure 2.7 ainsi qu'au tableau 2.5. L'indice de qualité de la reproduction du comportement (*FIT*) est d'un peu plus de 92 %.

Par ailleurs, les mêmes représentations graphiques des résidus sont présentées à la Figure 2.8. Ces derniers présentent ici des caractéristiques statistiques bien plus satisfaisantes, notamment en terme de normalité et d'homoscédasticité.

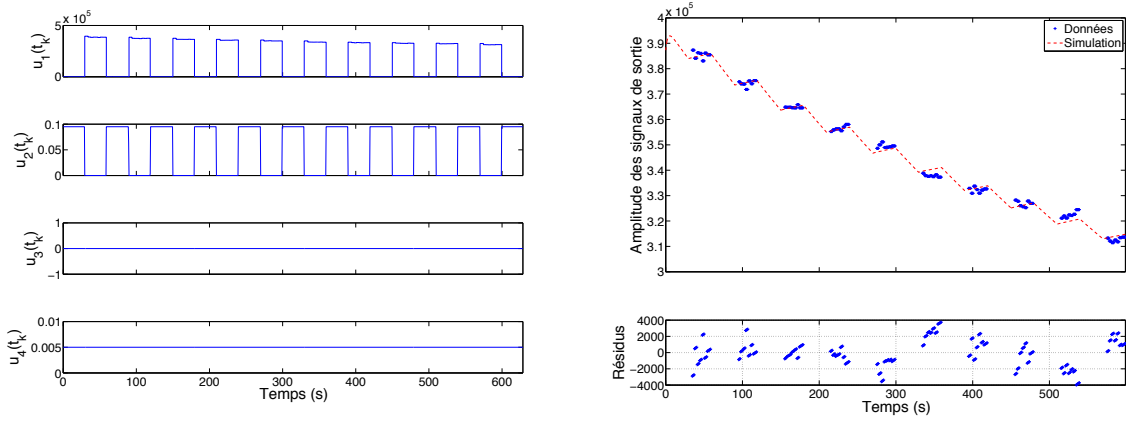


FIGURE 2.7 – À gauche les signaux d'entrées $u_1(t_k) = x_t(t_k)b(t_k)$, $u_2(t_k) = u_t(t_k)$, $u_3(t_k) = u_t(t_k)b(t_k)$ et $u_4(t_k) = u_p(t_k)$. À droite, la réponse du modèle d'état de type boîte grise (en rouge) comparée aux données mesurées en haut et les résidus associés en bas

TABLE 2.5 – Estimés et leurs incertitudes

Paramètres	Estimés	σ_θ	c_v (%)
a_{t_1}	-0.9989	3.0×10^{-6}	3.0×10^{-4}
b_{t_1}	1.97×10^3	8.8	4.5×10^{-1}
a_p	-0.8233	9.5×10^{-5}	1.2×10^{-2}
b_p	1.00×10^6	6.4×10^{-1}	6.4×10^{-5}

Limite de la méthode

L'étude du modèle physique (1.21) ainsi que des paramètres optiques qu'il met en œuvre (notamment k_a), nous montre que le coefficient d'absorption d'un PS est fonction de la longueur d'onde de la lumière. Ainsi, considérer les dynamiques thérapeutique et parasite comme identiques est erroné. En effet, la longueur d'onde de la diode LASER thérapeutique est de 650 nm alors que celle du spectrofluorimètre est à 405 nm. Afin de déterminer l'impact sur les estimés de l'initialisation des paramètres a_p et b_p aux valeurs de a_t et b_t , nous avons réalisé une étude de Monte Carlo sur $N_{sim} = 2000$. Les valeurs d'initialisation ont été tirées aléatoirement suivant les lois uniformes :

$$a_{p_{ini}} \sim \mathcal{U}[-1, 1] \quad (2.20)$$

$$b_{p_{ini}} \sim \mathcal{U}[-1 \times 10^7, 1 \times 10^7] \quad (2.21)$$

et les histogrammes des estimés sont présentés à la Figure 2.9. Ces graphiques montrent que l'algorithme peine à trouver un minimum global et donc une valeur unique aux paramètres a_p et b_p . Cela met en exergue un certain manque d'identifiabilité de ces paramètres dont la cause est vraisemblablement la faible excitation du signal d'entrée $u_p(t_k)$. En effet, comme illustré à la Figure 2.7, l'entrée $u_p(t_k)$ est un simple échelon.

Afin de palier à ce problème, le signal d'entrée parasite devra être à l'avenir plus excitant. Cela implique une modification en perspective du fonctionnement de la plateforme expérimentale. Le

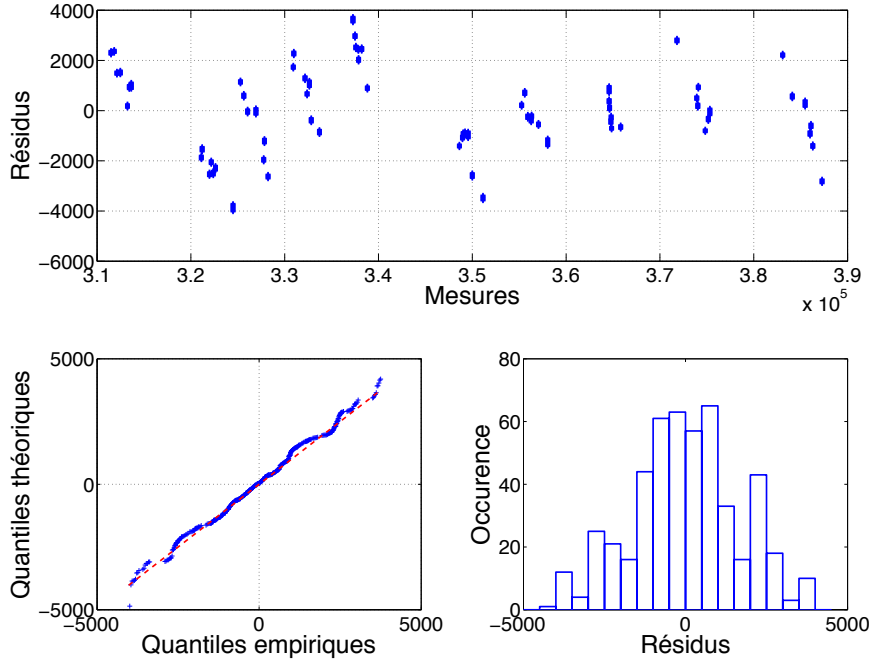


FIGURE 2.8 – Tracé des résidus en fonction des mesures (en haut), tracé quantile-quantile (en bas à gauche) et histogramme des résidus (en bas à droite)

prochain mode de fonctionnement permettra donc d'intégrer une phase d'excitation du système en début de protocole expérimental. Durant cette première phase, seul le module de spectrofluorimétrie fonctionnera avec $u_p(t_k)$ défini comme un signal carré de rapport cyclique 50 %.

2.4 Observateur de photoblanchiment

De par son principe, la spectrofluorimétrie est une méthode "invasive" d'observation. En effet, le spectromètre ne fait que mesurer la réponse de fluorescence produite par une zone de tissus excitée par une source lumineuse à une longueur d'onde appropriée. Cette excitation lumineuse du dispositif de mesure peut provoquer un photoblanchiment nuisible car il est à l'origine d'un biais sur les observations.

Cette section propose la conception d'un observateur d'état qui permet de reconstruire $x_t(t_k)$, c'est-à-dire le photoblanchiment "thérapeutique" à partir de la sortie mesurée $y_m(t_k)$ et du vecteur d'entrées $U(t_k)$. Il existe de nombreuses méthodes permettant de reconstruire un vecteur d'état, la plus utilisée est sans doute celle basée sur le filtre de Kalman.

D'autres observateurs existent (celui de Luenberger, par exemple, [98]) mais le filtre de Kalman présente la particularité d'être optimal si les caractéristiques statistiques du système sont connues. Il est toutefois suffisamment robuste pour offrir des résultats acceptables si les hypothèses de base ne sont pas vérifiées, [99].

2.4.1 Observateur de Kalman

Rappelons le modèle de photoblanchiment défini à l'équation (2.17) :

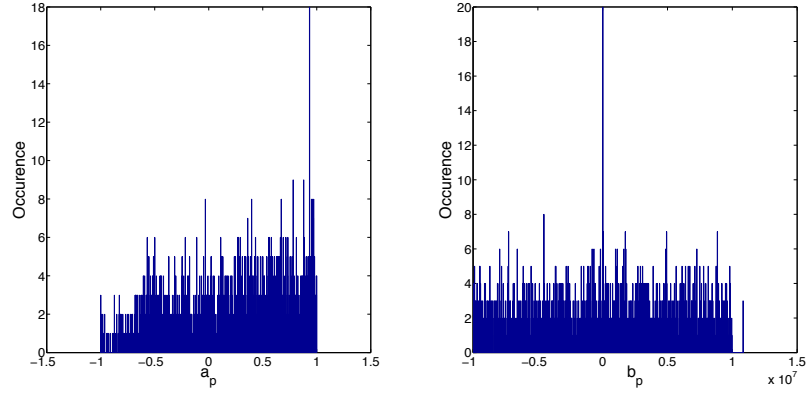


FIGURE 2.9 – Histogrammes de répartition des paramètres estimés

$$\begin{cases} X(t_{k+1}) &= AX(t_k) + BU(t_k) \\ y_m(t_k) &= CX(t_k) + DU(t_k) + v(t_k) \end{cases} \quad (2.22)$$

où M est une matrice identité de dimension 2 et avec

$$\begin{aligned} A &= \begin{bmatrix} -a_{t_1} & 0 \\ 0 & -a_p \end{bmatrix} & B &= \begin{bmatrix} 1 + a_{t_1} & b_{t_1} & -b_{t_1} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & b_p \end{bmatrix} \\ C &= \begin{bmatrix} 1 & 1 \end{bmatrix} & D &= \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \end{aligned} \quad (2.23)$$

et

$$X(t_k) = \begin{bmatrix} x_t(t_k) \\ x_p(t_k) \end{bmatrix} \quad U(t_k) = \begin{bmatrix} x_t(t_k)b(t_k) \\ u_t(t_k) \\ u_t(t_k)b(t_k) \\ u_p(t_k) \end{bmatrix} \quad (2.24)$$

Sous cette forme, ce modèle ne peut fournir qu'une sortie $y_m(t_k)$ qui est une combinaison des deux états $x_t(t_k)$ et $x_p(t_k)$. La conception et l'implémentation d'un filtre de Kalman nous permettront d'estimer $x_t(t_k)$.

Structure de l'observateur

Afin de pouvoir concevoir le filtre de Kalman adéquat, certaines hypothèses doivent être posées :

1. le couple (A, C) est détectable (*i.e.* pas de mode instable et inobservable dans le système, dans notre cas le modèle est observable) ;
2. $v(t_k)$ est un bruit pseudo-blanc Gaussien centré et de matrice de covariance R ;
3. R est inversible.

Partant de ces hypothèses, les équations de récurrence constituant le filtre de Kalman discret sont les suivantes, [99] :

$$P(t_{k|k-1}) = AP(t_{k-1|k-1})A^T \quad (2.25)$$

$$K(t_k) = P(t_{k|k-1})C^T(CP(t_{k|k-1})C^T + R)^{-1} \quad (2.26)$$

$$\hat{X}(t_{k|k-1}) = A\hat{X}(t_{k-1|k-1}) + BU(t_k) \quad (2.27)$$

$$\hat{X}(t_{k|k}) = \hat{X}(t_{k|k-1}) + K(t_k) \left(y_m(t_k) - C\hat{X}(t_{k|k-1}) \right) \quad (2.28)$$

$$P(t_{k|k}) = (I - K(t_k)C) P(t_{k|k-1}) \quad (2.29)$$

où $K(t_k)$ est le gain d'adaptation du filtre de Kalman à l'instant t_k et $\hat{X}(t_{k|k-1})$ est le vecteur d'état prédit à l'instant t_k connaissant toutes les mesures jusqu'à l'instant t_{k-1} et dont la matrice de covariance de l'erreur de prédiction associée est $P(t_{k|k-1})$:

$$P(t_{k|k-1}) = \mathbb{E} \left[\left(X(t_k) - \hat{X}(t_{k|k-1}) \right) \left(X(t_k) - \hat{X}(t_{k|k-1}) \right)^T \right] \quad (2.30)$$

De façon similaire, $\hat{X}(t_{k|k})$ est le vecteur d'état estimé (et recalé) connaissant les mesures à l'instant t_k et auquel on associe la matrice de covariance de l'erreur d'estimation $P(t_{k|k})$:

$$P(t_{k|k}) = \mathbb{E} \left[\left(X(t_k) - \hat{X}(t_{k|k}) \right) \left(X(t_k) - \hat{X}(t_{k|k}) \right)^T \right] \quad (2.31)$$

I est la matrice identité.

D'un point de vue algorithmique, chaque équation est évaluée de manière itérative à tous les instants t_k , par conséquent, les équations (2.25) à (2.29) doivent être initialisées par l'utilisateur. $P(t_{0|0})$ traduit la confiance placée dans l'initialisation et définit la vitesse de convergence du filtre, si l'on connaît parfaitement la valeur initiale du vecteur d'état alors $P(t_{0|0}) = 0$.

Notons également que si le modèle utilisé ainsi que le bruit sont stationnaires, alors les équations (2.25), (2.26) et (2.29) peuvent être calculées hors ligne.

Les essais et l'implantation de cet observateur restent encore à réaliser dans le dispositif RAPTOR de la plateforme MEXICO-PDT (voir Section suivante).

2.5 Asservissement de la trajectoire de photoblanchiment

Comme expliqué précédemment, l'asservissement de la trajectoire de photoblanchiment permet, à partir de l'estimation de l'état de photoblanchiment : $\hat{x}_t(t_k)$, d'ajuster les modalités d'application du signal lumineux (largeur d'impulsion modulée) pour que la courbe de photoblanchiment suive au plus près une trajectoire de référence fixée par le biologiste ou le médecin. Ainsi, le traitement peut être adapté en temps réel de telle sorte que le signal de photoblanchiment suive une évolution prédéterminée en étant peu affecté par les variabilités biologiques entre les sujets, et donc améliorer la reproductibilité du traitement. En résumé, le système d'asservissement repose sur une comparaison d'état avec une trajectoire définie décrite à la Figure 2.10, avec :

- $W(t_k)$, la trajectoire de référence du photoblanchiment ;
- $\epsilon(t_k)$, l'erreur de trajectoire ;
- $u_t(t_k)$, le signal de commande de la diode LASER de traitement ;
- $I_{650}(t)$, le signal d'irradiation thérapeutique ;

- $I_{405}(t)$, le signal d'irradiation d'excitation ;
- $I_F(\lambda, t)$, le spectre d'intensité de fluorescence du PS mesuré ;
- $\tilde{I}_F(\lambda_i, t_k)$, le spectre d'intensité de fluorescence du PS discrétisé en longueur ;
- $y_m(t_k)$, le signal de mesure du photoblanchiment.

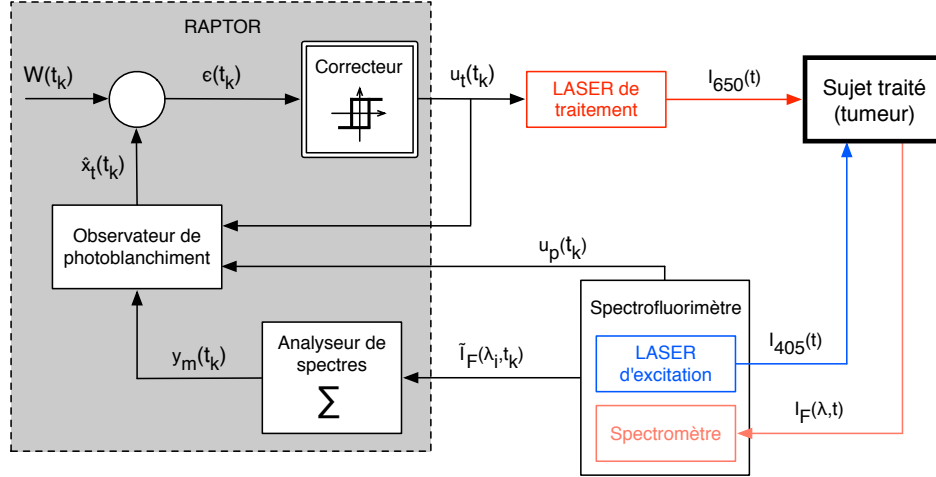


FIGURE 2.10 – Schéma de la boucle d'asservissement du photoblanchiment

Ce schéma a été implanté au sein d'un dispositif innovant intitulé RAPTOR (*ReAltime Photodynamic Therapy cOntrolleR*), en cours de soumission pour un brevet, et plus précisément décrit dans la section suivante. Notons cependant que la partie "Observateur de photoblanchiment" n'est pas encore implantée, l'asservissement se fait pour l'instant sur la grandeur globale de photoblanchiment $y_m(t_k)$.

2.5.1 Signal d'activation

L'unique actionneur lors d'un traitement PDT est la source LASER de traitement illuminant la tumeur à une longueur d'onde adaptée. Ce signal lumineux peut être soit continu (la dose de lumière est administrée en une seule fois), soit fractionné (la dose est administrée en plusieurs fois). De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer quelle modalité d'irradiation était la meilleure et ont souligné que le mode fractionné était le plus efficace. [100–102].

Les phases où la source est éteinte peuvent donc être mises à profit pour observer le photoblanchiment du PS. En effet la bande de longueur d'onde mesurée va de 645 à 750 nm, elle contient donc la longueur d'onde de la lumière de traitement. L'intensité de cette dernière est telle qu'elle provoque une saturation complète de la réponse du spectrofluorimètre, rendant ainsi aveugle ce dernier.

Le concept de l'asservissement de la courbe de photoblanchiment en PDT est synthétisé à la Figure 2.11 et consiste en la modulation du signal d'excitation (en largeur d'impulsion) et en l'utilisation des phases obscures pour récolter des informations sur l'état du photoblanchiment.

Afin de garantir une observation la plus réaliste possible du photoblanchiment, il est important que les phases d'obscurité (d'observation) soient de durée fixe T_{OFF} , tandis que la durée des phases d'irradiation devra être comprise entre 0 et T_{ON} . Les valeurs de T_{ON} et de T_{OFF} seront définies par l'utilisateur.

Par ailleurs, le choix d'un asservissement par modulation de largeur d'impulsions s'explique par deux contraintes :

1. la nécessité d'avoir un signal de traitement entrecoupé, pour d'une part mesurer le photoblanchiment et d'autre part laisser le temps au tissu traité d'être réapprovisionné en oxygène ;
2. l'incapacité technique de moduler l'amplitude de ce signal sur notre plateforme actuelle.

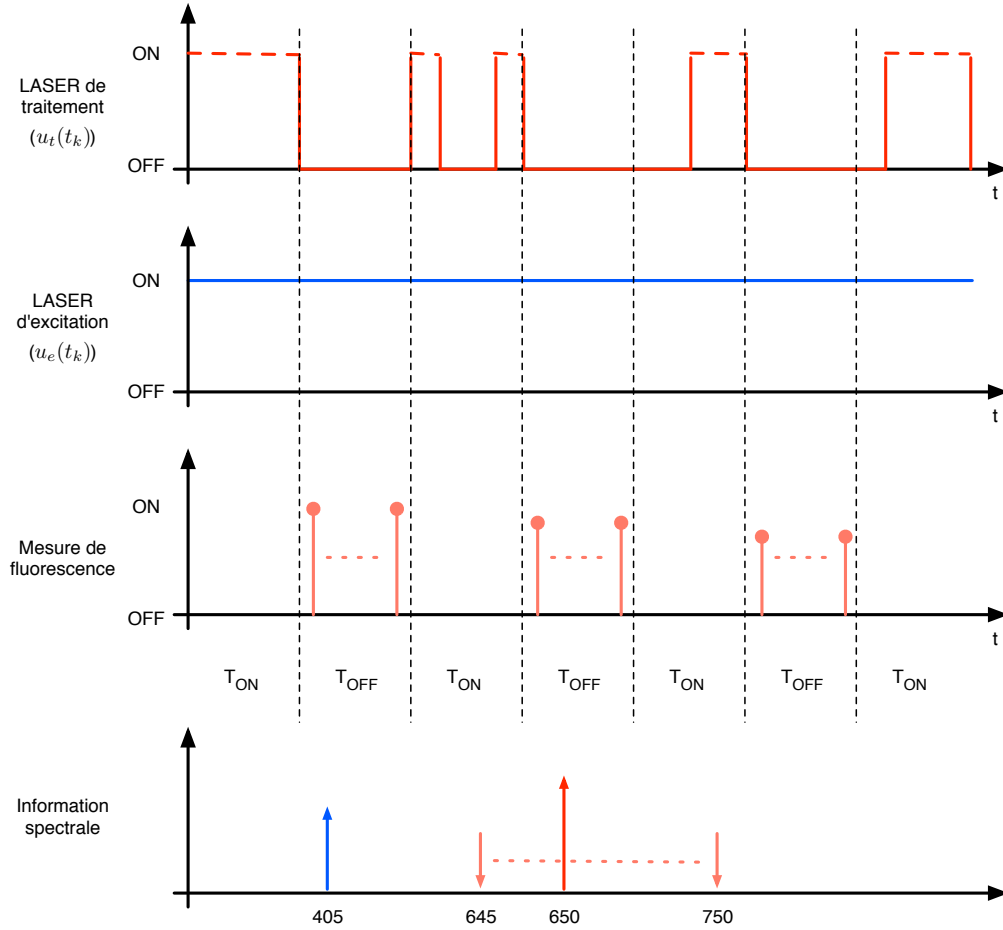


FIGURE 2.11 – Déroulement de l'expérience

2.5.2 Algorithme d'asservissement

Pour résumer, le correcteur mis en œuvre peut donc être considéré comme un système d'asservissement tout-ou-rien (TOR) avec hystérésis dont :

- la période et l'amplitude du signal de commande $u_t(t_k)$ sont fixes durant le traitement (contrainte technique) ;
- chaque période de ce signal est composée de deux phases :
 1. T_{OFF} d'obscurité de durée fixe, durant laquelle l'observation du photoblanchiment est réalisée ;

2. T_{ON} durant laquelle l'erreur de trajectoire $\epsilon(t_k)$ est évaluée et l'activation du LASER de traitement est autorisé :
 - Si $\epsilon(t_k) > \delta$ alors $u_t(t_k) = 1$
 - Si $\epsilon(t_k) < -\delta$ alors $u_t(t_k) = 0$
 - Sinon $u_t(t_k) = u_t(t_{k-1})$
- Le rapport cyclique du signal α varie donc entre 0 et $\alpha_{max} = \frac{T_{ON}}{T_{ON}+T_{OFF}}$.

Ainsi, l'algorithme 1 décrit le processus séquentiel dont le but est de permettre l'asservissement de la courbe de photoblanchiment au cours du traitement PDT. Il est actuellement implanté dans la plateforme MEXICO *via* RAPTOR.

Algorithme 1: Algorithme d'asservissement mis en place dans le dispositif RAPTOR

```

1  tant que  $t_k < Fin_{exp}$  faire
2      si  $t_k \in T_{OFF}$  alors
3           $u_t(t_k) = 0$ 
4          pour  $m = 1$  à  $N_{mesure}$  faire
5              Récolter  $I_F(\lambda, t_k)$ 
6               $\tilde{I}_F(\lambda_i, t_k) = I_F(\lambda, t) \forall \lambda_i = \lambda$  et  $t_k = t$ 
7               $y_m(t_k) = \sum_{\lambda_i=645}^{750} \tilde{I}_F(\lambda_i, t_k)$ 
8          fin
9      sinon
10          $y_m(t_k) = y_m(t_{k-1})$ 
11          $\epsilon(t_k) = y_m(t_k) - W(t_k)$ 
12         si  $\epsilon(t_k) > \delta$  alors
13              $u_t(t_k) = 1$ 
14         sinon si  $\epsilon(t_k) < -\delta$  alors
15              $u_t(t_k) = 0$ 
16         sinon
17              $u_t(t_k) = u_t(t_{k-1})$ 
18         fin
19     fin
20 fin

```

Notons que la variable N_{mesure} est calculée lors de l'initialisation de l'algorithme et est fonction de la durée des phases obscures T_{OFF} ainsi que du temps d'intégration du spectromètre (durée de l'action "Récolter $I_F(\lambda, t_k)$ ").

2.5.3 Test *in vitro*

L'algorithme d'asservissement a été intégré dans la plateforme et mis à l'épreuve lors de campagnes d'expériences dont le but était de discriminer les paramètres de configuration de la plateforme les plus sensibles. Deux exemples d'asservissement sont présentés à la Figure 2.12.

Nous distinguons clairement que la courbe de photoblanchiment suit la pente imposée par la consigne. Toutefois, ces essais ont permis de mettre en évidence une limitation de ce procédé. En effet, si la pente fixée par l'utilisateur est trop importante la courbe de photoblanchiment décroche assez rapidement et n'arrive plus à rejoindre la consigne. Ce manque d'efficacité pourrait être

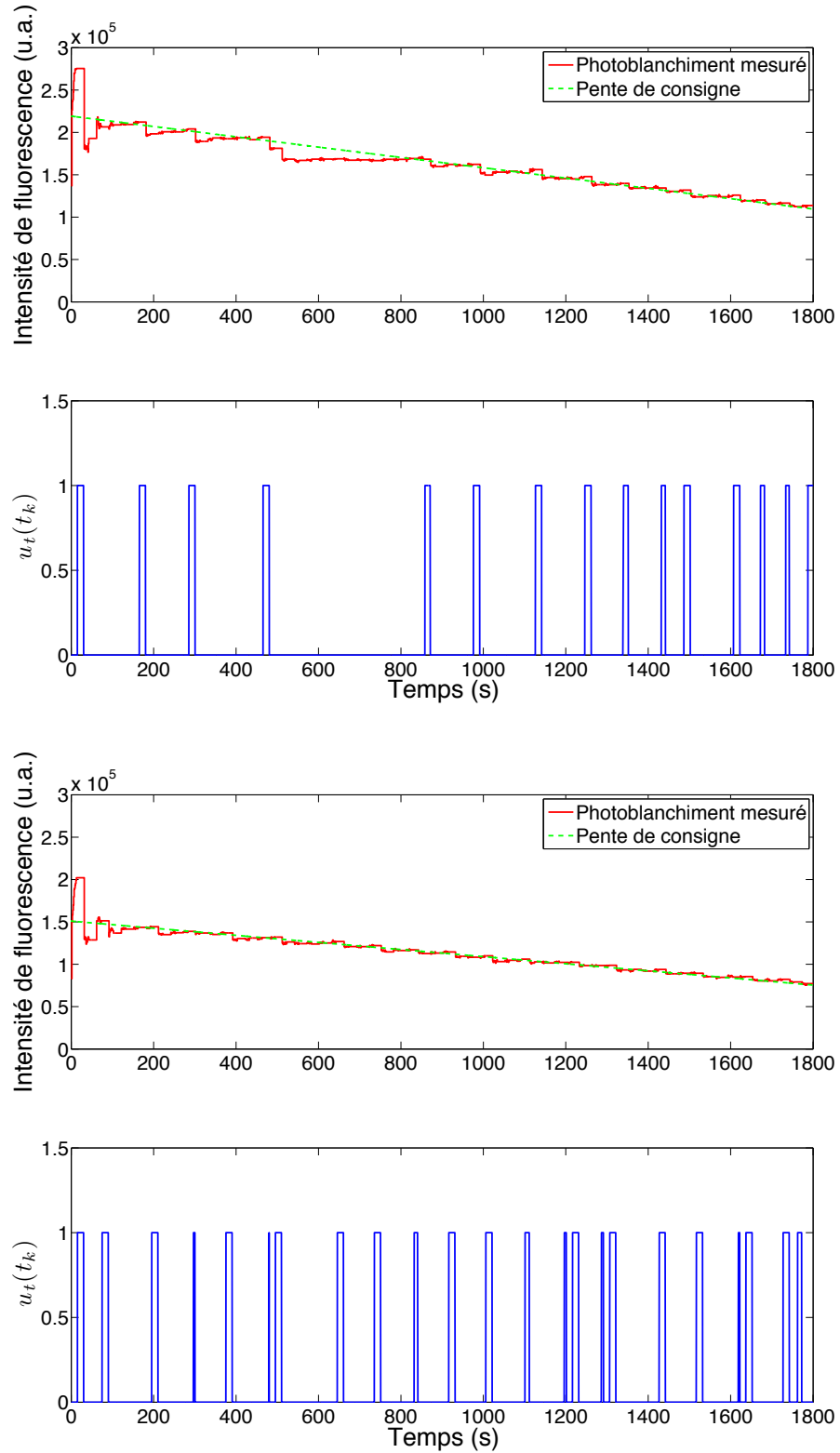


FIGURE 2.12 – Deux exemples d’asservissement de photoblanchiment issus d’expériences *in vitro*

compensé en ajoutant un second degré de liberté au signal d'irradiation : le signal pourrait être modulé en largeur d'impulsion et en amplitude. C'est vraisemblablement vers cette amélioration que vont se tourner nos prochains travaux sur la plateforme.

Dispositif pilote RAPTOR

Sommaire

3.1	État de l'art des plateformes d'expérimentation	57
3.2	Analyse des demandes de brevets	60
3.3	Analyse des spécifications du système RAPTOR	61
3.4	Choix des composants	62
3.4.1	Module traitement	62
3.4.2	Module spectrofluorimétrie	63
3.4.3	Module RAPTOR	64
3.5	Intégration et validation des modules	65

Comme l'indique la Figure 2.10, le système RAPTOR (*ReAltime Photodynamic Therapy cOntrolleR*) s'interface directement avec des systèmes existants : des sources de lumière de type LASER ou LASER LED fibrées et des spectromètres compacts fibrés. C'est aussi *via* RAPTOR que le praticien entre l'ensemble des paramètres de traitement : courbe de référence de photoblanchiment à poursuivre, durée maximale de la session, valeur maximale de la fluence (dose énergétique de lumière), période d'échantillonnage et temps d'intégration des spectres. Le système RAPTOR a deux usages principaux : (1) reconstruire en temps réel la courbe de photoblanchiment à partir des spectres de fluorescence et (2) adapter en temps réel le signal de lumière appliqué au patient pour que la courbe de photoblanchiment reconstruite suive au plus près celle demandée par le praticien.

Le système RAPTOR est une brique innovante venant s'intégrée dans une plateforme technologique dédiée à la thérapie photodynamique et intitulée MEXICO-PDT (Modélisation EXpérimentale et Identification pour le COntôle de la thérapie photodynamique). Le développement de cette plateforme fut financé dans le cadre de l'opération EMC2 (Expérimentation, Modélisation et Contrôle en Cancérologie) du projet AOC (Analyse, Optimisation et Contrôle) au sein du CPER MISN (Modélisation, Information et Systèmes Numériques) entre 2007 et 2013.

3.1 État de l'art des plateformes d'expérimentation

Depuis ces dernières années l'instrumentation mise en oeuvre autour de cette thérapie s'est considérablement développée. Les chercheurs travaillant sur la PDT intègrent de plus en plus de compétences dans d'autres domaines (comme la photophysique, l'informatique ou le traitement de données) afin de mieux observer les phénomènes pouvant se produire durant les phases de traitement. Ainsi de nombreuses plateformes d'expérimentation ont vu le jour, nous allons dans

cette partie faire un état de l'art des différentes technologies couramment employées et ainsi positionner la plateforme MEXICO dans le contexte technologique du domaine de la PDT.

En 2002, l'équipe de Niedre et Patterson a réussi à mesurer la luminescence de l'oxygène singulet dans des conditions *in vitro* et *in vivo* [52]. Ces expériences ont ensuite été validées en 2003 et 2005 [18, 53]. Le phénomène de luminescence de l'oxygène singulet est réellement faible, et pour l'observer il est nécessaire de mettre en oeuvre des capteurs des plus sensibles. La plateforme utilisée pour exciter le PS et pour mesurer la luminescence de l'oxygène singulet est décrite dans ces articles.

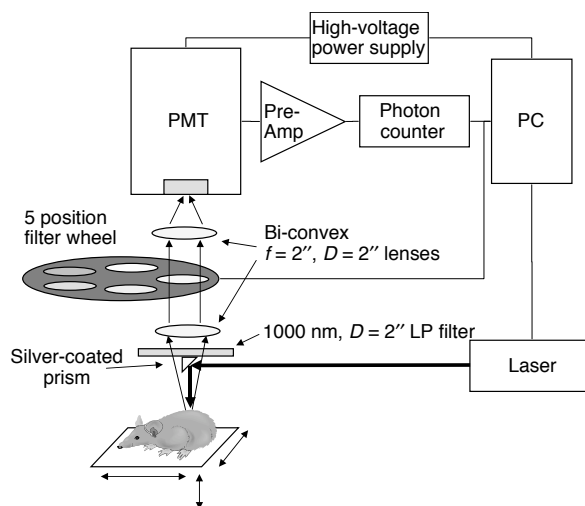


FIGURE 3.1 – Schéma de la plateforme d'expérimentation mise au point par Niedre, [18]

La Figure 3.1 présente le schéma de la plateforme de Niedre, cette dernière est composée d'un PC pilotant un LASER d'excitation, un ensemble d'éléments servant à compter les photons émis (PMT¹⁴, un pré-amplificateur et un compteur de photons) ainsi qu'une roue motorisée contenant 5 filtres (permettant de laisser passer uniquement les photons aux longueurs d'ondes désirées). Cet ensemble d'éléments forme un outil précis et sensible, mais en contrepartie sa complexité le rend difficilement utilisable par des personnes étrangères à sa conception (*e.g.* biologistes ou médecins), d'autre part, sa spécificité le cantonne à la mesure de luminescence de l'oxygène singulet, alors que d'autres espèces peuvent être pertinentes à observer lors d'un traitement PDT.

Notons qu'en 2005, Lee [103] a utilisé la même technologie pour des mesures de luminescence d'oxygène singulet dans des solutions *in vitro* de PS. En 2008, Lee propose une méthode d'acquisition de données de luminescence par le biais d'une caméra proche infra-rouge très sensible [19]. Il y couple une deuxième caméra destinée à prendre la fluorescence du PS. L'équipe réalise alors plusieurs essais *in vitro* sur plusieurs concentrations de PS (Figure 3.2). L'équipe a également expérimenté l'installation sur une souris atteinte d'une tumeur. Le cliché proche infra-rouge est remarquable puisqu'il permet de situer la tumeur et la production d'oxygène singulet dans le corps de la souris, d'une manière tout à fait non-invasive (Figure 3.3)

14. Le tube photomultiplicateur (Photomultiplier Tube) est un composant dont la tension varie entre ses différentes broches en fonction du nombre de photons qui le pénètrent, [103].

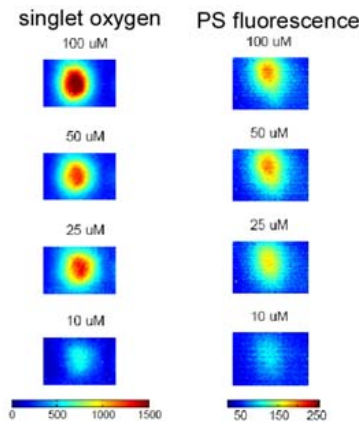


FIGURE 3.2 – Présentation des mesures de luminescence de l'oxygène singulet (à gauche) et de la fluorescence du PS (à droite) en fonction de sa concentration, [19]

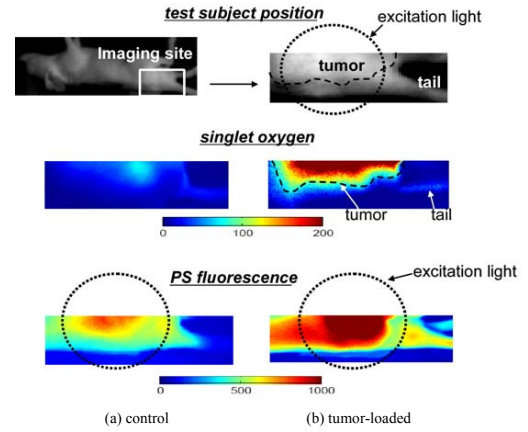


FIGURE 3.3 – Clichés de luminescence de l'oxygène singulet et de fluorescence du PS sur une souris saine (à gauche) et sur une souris atteinte d'une tumeur (à droite), [19]

Cependant toutes les plateformes conçues pour expérimenter la PDT ne sont pas aussi sophistiquées que celles-ci. En effet, la plupart du temps on ne parle même pas de plateforme mais d'ensemble de composants fonctionnant en même temps et pilotés par différentes personnes. L'avantage de ces équipements est que leur mise en oeuvre est relativement aisée, mais l'utilisation reste compliquée puisqu'elle fait intervenir un grand nombre de personnes. Citons Amelink, qui en 2005 présente une installation utilisée pour mesurer les modifications des propriétés optiques des tissus pendant un traitement de PDT, [104]. L'installation décrite dans cet article comprend un LASER de traitement, un LASER d'excitation, une source de lumière blanche et un spectromètre dont les données sont rapatriées sur un PC. Les sources LASER sont coupées grâce à des obturateurs pilotés électriquement.

En 2005, Dysart présente une plateforme d'expérimentation entièrement pilotée par LabView destinée à la mesure de la cinétique de photoblanchiment apparaissant lors d'un traitement PDT, [20]. Il s'agit ici d'une plateforme (figure 3.4) intégrée et automatisée, dont l'utilisation est rendue conviviale grâce au logiciel de supervision LabView. Cependant cette plateforme n'est en fait qu'un outil de mesure, elle n'agit pas en direct (en se basant sur ses mesures) sur le processus PDT. Il s'agit d'un système en boucle ouverte.

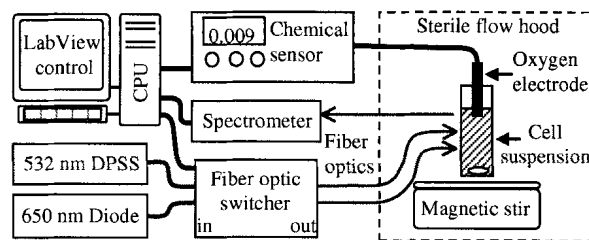


FIGURE 3.4 – Schéma de la plateforme d'expérimentation mise au point par Dysart, issu de [20]

La plateforme MEXICO reprend, dans sa conception, plusieurs éléments des plateformes présentées ci-dessus. Nous proposons un système automatisé et autonome, pilotant une source LASER de traitement et une autre d'excitation, mais également la synchronisation des prises de mesures de fluorescence du PS. Le rapatriement et le traitement des données est donc automatique. Elle calcule la dose de lumière à envoyer à la tumeur en fonction des mesures de fluorescence. Nous avons un système en boucle fermée (Figure 2.10). Le paramétrage s'effectue par le biais de l'interface homme-machine implémentée sous LabView, permettant ainsi une utilisation par des personnes étrangères à sa conception.

3.2 Analyse des demandes de brevets

EP 1637182 A1 Dans cette demande de brevet, les inventeurs (T. Arai *et al.*, Keio, Japon) apportent une solution technique pour contrôler le ratio bénéfice/risque de la PDT appliquée sur des lésions en profondeur. Les auteurs montrent que l'efficacité du traitement dépend de l'intensité des impulsions de lumière et de leur fréquence, [105]. L'intensité doit se trouver dans une gamme définie à l'avance. Une sous- ou une sur-intensité des pics de lumière conduisent à un manque d'efficacité thérapeutique. Les auteurs utilisent ce principe pour traiter la lésion située en profondeur sans toucher gravement les tissus sains situés entre la peau et la zone à traiter et ceux situés en profondeur au-delà de la lésion. Le choix de l'intensité des pics et leur fréquence est réalisé avant le traitement et demeure inchangé ensuite. Ce système ne permet donc pas de contrôler en boucle fermée l'efficacité du traitement. Il n'y a aucune adaptation des conditions de traitement au cours du temps.

DE 19721489 A1 Cette demande de brevet, déposée en 1998 (T. Nagypal *et al.*, Düsseldorf, Allemagne), propose un contrôle en boucle fermée de la PDT en utilisant un large spectre de technologies de mesures différentes, [106]. L'invention utilise un système expert (base de données) pour calculer un nouveau spectre d'excitation de la lumière de traitement. Cette base de données est remplie par des experts médecins et biologistes en se basant sur leurs expériences cliniques passées. Elle contient les informations thérapeutiques nécessaires à l'invention pour réaliser un traitement PDT en fonction du type de cancer. Cette base de données fait donc office de modèle thérapeutique et n'est de fait ni dynamique, ni personnalisée à chaque patient. Le système décrit peut mesurer certains indicateurs biologiques d'effets thérapeutiques (concentration en oxygène, température, pH, *etc.*). Le document ne précise toutefois pas comment les mesures sont utilisées sur la méthode de contrôle (régulation/asservissement) ni sa gestion au cours du temps (la notion de contrôle temps réel n'est pas précisée).

EP 2 431 072 A1 Cette demande déposée en mars 2011 (S. Svanberg *et al.*, Helsingborg, Suède) concerne un système de contrôle et de réglage des paramètres de thérapie photodynamique interstitielle, [107]. L'invention déposée propose, plus particulièrement, un procédé de contrôle de la lumière à l'aide d'une méthode d'évaluation de l'état du tissu pendant le traitement. La solution proposée repose sur une stratégie de régulation de l'état des tissus.

Comme spécifié par les inventeurs : "les données de fluorescence et d'oxygène ne sont pas utilisées dans leurs solutions car aucun modèle de dosimétrie capable d'incorporer ce type d'information n'est disponible actuellement". C'est justement là que nous apportons une innovation supplémentaire car notre solution repose sur un modèle prédictif de l'intensité de fluorescence du photosensibilisateur pendant le traitement.

WO 2009/052503 A2 Cette demande de W. J. Cottrell *et al.*, New-York, États-Unis, re-

pose sur l'invention d'un système d'illumination géré en boucle fermée par un ordinateur et développé pour la thérapie photodynamique, [108]. Ce système dispose d'un modulateur spatial des pixels d'une source de lumière permettant d'obtenir une distribution spectrale du rayon lumineux adapté au type d'agent photosensibilisant utilisé. Il s'agit d'un correcteur de spectre d'excitation qui peut être utilisé conjointement avec tout type de spectromètre ou spectrofluorimètre.

Ce n'est donc pas une solution de contrôle en boucle fermée de l'efficacité du traitement, seulement de l'adéquation du spectre d'excitation aux caractéristiques spectrales du photosensibilisateur utilisé.

WO 2008/137737 A2 Cette demande propose une solution de contrôle en boucle fermée de la PDT en y intégrant des solutions de mesure non-invasives et temps réel fondées essentiellement sur des techniques de spectroscopie, [109]. Cette demande est déjà une extension d'un autre brevet : WO 2006/025940, [110]. Le système de contrôle proposé repose sur une régulation du taux de photoblanchiment (on le maintient à une valeur constante fixée à l'avance). Il ne permet pas en revanche de faire suivre au taux de photoblanchiment une trajectoire temporelle quelconque de déclin.

Notre correcteur répond à cet inconvénient grâce à un système d'asservissement du déclin de photoblanchiment selon un profil de référence imposé par l'utilisateur (médecin) et fondé sur un signal d'excitation périodique à rapport cyclique variable (modulation de la largeur des impulsions lumineuses).

Notons que toutes ces revendications d'invention ne prennent pas en compte l'utilisation d'un observateur d'état pour reconstruire le véritable photoblanchiment ("thérapeutique") lorsque ce phénomène est intégré dans leur schéma de contrôle.

3.3 Analyse des spécifications du système RAPTOR

Afin de garantir le bon déroulement du projet, nous nous sommes inspirés des méthodes et techniques de l'Ingénierie Système¹⁵ dont le principe est présenté à la Figure 3.5. Cette méthode permet, à partir des besoins exprimés par la maîtrise d'ouvrage, de formaliser des exigences techniques que le système à réaliser devra satisfaire. Par ailleurs, ces exigences doivent être vérifiables, par conséquent le moyen de vérification pour chaque exigence est explicité dès le début de la conception. Ceci permet, lors de la qualification du produit final, de s'assurer que le résultat est bien conforme aux besoins initiaux. Cette méthodologie est surtout appliquée dans les projets de grande envergure où la pluridisciplinarité des équipes impliquées peut être un frein à son bon déroulement, notamment à cause des différents langages utilisés.

Dans notre cas, les exigences principales, issues des besoins biologiques, médicaux et également techniques, sont les suivants :

R1 Reconstruction de la courbe de photoblanchiment à partir des spectres mesurés

R1.1 RAPTOR lit et traite en temps réel les spectres fournis par un spectrofluorimètre pour reconstruire et afficher la courbe de photoblanchiment

R1.1.1 Le traitement du spectre doit être réalisé en un temps bien inférieur au temps d'acquisition

15. "L'Ingénierie Système (ou ingénierie de systèmes) est une démarche méthodologique générale qui englobe l'ensemble des activités adéquates pour concevoir, faire évoluer et vérifier un système apportant une solution économique et performante aux besoins d'un client tout en satisfaisant l'ensemble des parties prenantes." définition issue du site Internet de l'Association Française d'Ingénierie Système (www.afis.fr).

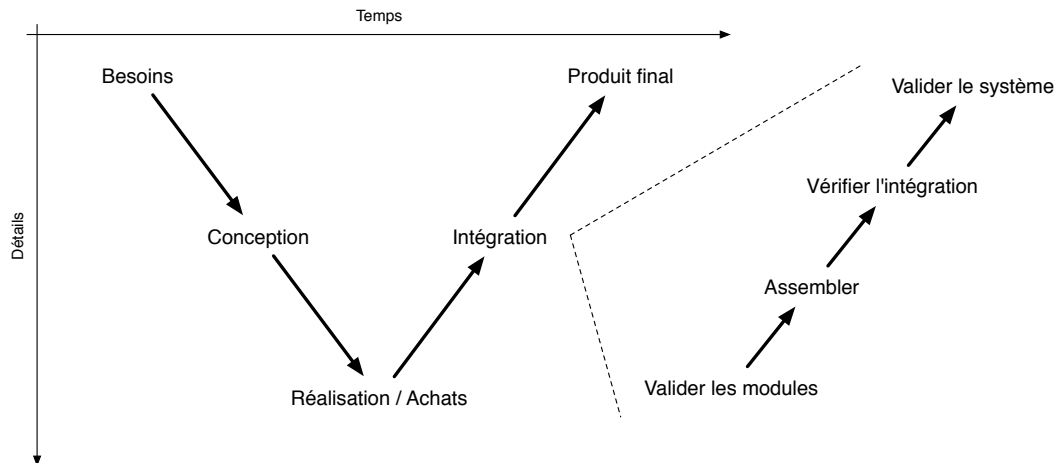


FIGURE 3.5 – Cycle en V en Ingénierie Système

R1.2 Le praticien saisit les paramètres d'acquisition des spectres de fluorescence à RAPTOR

R1.3 RAPTOR alerte le praticien si le rapport signal à bruit du spectre de fluorescence est trop faible

R2 Correction du signal lumineux en temps-réel

R2.1 La trajectoire de photoblanchiment souhaitée est donnée par le praticien

R2.2 Le praticien informe RAPTOR de la durée maximale du traitement

R2.3 Le praticien donne à RAPTOR la valeur de fluence appliquée au patient pendant le traitement

R2.4 RAPTOR calcule et module en temps réel la durée des impulsions lumineuses (traitement adaptatif)

R2.4.1 RAPTOR peut travailler avec une période d'échantillonnage minimale d'une seconde

R2.5 RAPTOR estime le photoblanchiment "thérapeutique" à partir du photoblanchiment global perturbé par la lumière d'excitation du spectrofluorimètre

R2.6 RAPTOR minimise l'erreur de suivi entre la trajectoire de photoblanchiment et celle de la variable d'état de photoblanchiment thérapeutique

3.4 Choix des composants

Nous allons, dans cette partie, énumérer les différents modules choisis lors de la phase de conception et expliquer leur utilité et fonctionnalité (faire le lien avec un besoin précis) au sein de la plateforme. Leur architecture globale au sein de la plateforme MEXICO-PDT est présentée à la Figure 3.6.

3.4.1 Module traitement

Le module traitement est sans doute le plus important puisque c'est grâce à lui que la photoactivation du photosensibilisateur (PS) s'opère et donc que la production d'oxygène singulet est possible.

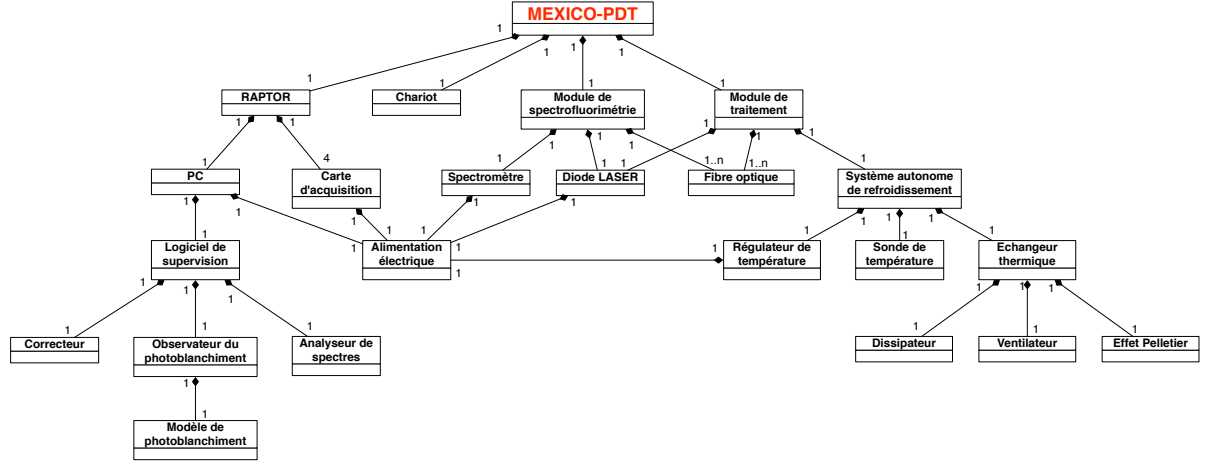


FIGURE 3.6 – Diagramme de classe UML de la plateforme MEXICO-PDT décrivant son architecture statique

Il est constitué de trois éléments : une diode LASER de puissance ($P_{max} = 50$ W en sortie de diode et $\lambda = 650$ nm), une alimentation électrique stabilisée alimentant la diode et d'un montage de fibres optiques.

Le modèle de la diode est DL-module M1F-SS2.650nm dont le fabricant est DILAS. Cette diode, émettant un faisceau rouge dans la plage d'absorption du PS [16], permet l'activation du PS et ainsi la production d'oxygène singulet à l'état excité qui permettra d'endommager les cellules tumorales visées.

Etant relativement puissante, son utilisation nécessite un système de refroidissement autonome, dont la conception et la réalisation ont été laissées à un fournisseur.

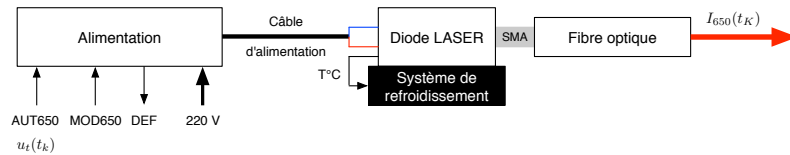


FIGURE 3.7 – Schéma bloc du module de traitement

A la Figure 3.7 nous avons représenté le module de traitement, où "AUT" est l'entrée d'auto-risation de marche (entrée d'interconnexion avec RAPTOR), "MOD650" l'entrée de modulation (cette entrée est câblée mais n'est pas utilisée pour l'instant) et "DEF" la sortie de défaut. L'alimentation générale du module en 220 V est fournie par le module alimentation de la plateforme.

3.4.2 Module spectrofluorimétrie

Module excitation

Cette diode est destinée à exciter le PS dont la réponse en fluorescence permet de quantifier sa concentration au cours de l'expérience. Cela permet d'observer le phénomène de photoblanchiment apparaissant lors de la PDT.

Ce module est également constitué de trois éléments : une diode LASER d'excitation ($\lambda = 405$ nm), une alimentation électrique ainsi qu'un montage de fibres optiques.

Il s'agit du modèle PureBeam 405 conçu par StokerYale et émettant dans le bleu. Cette diode, de faible puissance, ne nécessite pas de montage de refroidissement. D'autre part, la modulation de sa puissance est rendue possible grâce à une connectique prévue à cet effet. A la Figure 3.8 nous

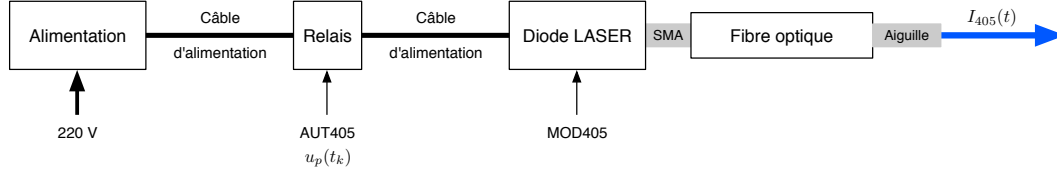


FIGURE 3.8 – Schéma bloc du module excitation

avons représenté le module d'excitation dans sa globalité. Le bloc relais sert à piloter l'ouverture ou la fermeture de la ligne d'alimentation de la diode LASER. L'entrée "ON/OFF" désigne le signal pilotant le relais et donc l'allumage de la diode (*i.e.* $u_p(t_k)$) et l'entrée "MOD405" le signal de modulation envoyé sur la diode pour modifier sa puissance de sortie.

Module spectrométrie

Ce module est destiné à la mesure des intensités de fluorescence du PS et est composé d'un spectromètre (Ocean Optics USB2000+) ainsi que de montages de fibres optiques.

Le spectromètre USB200+ possède une plage de mesure allant de 200 à 1100 nm, ce qui lui permet de mesurer la fluorescence du PS (aux alentours des 650 nm, [41, 84]). La collecte des données se fait *via* le logiciel fourni ou *via* un ensemble de fonctions mises à disposition pour implémentation sous LabView

L'entrée/sortie "USB_SPEC", présent à la Figure 3.9, est la connectique USB qui permet de

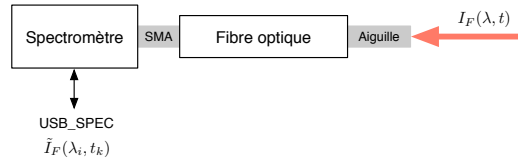


FIGURE 3.9 – Schéma bloc du module de spectrométrie

l'alimenter et de communiquer avec le spectromètre. C'est par ce flux de données que les spectres de fluorescence $\tilde{I}_F(\lambda_i, t_k)$ transitent.

3.4.3 Module RAPTOR

Le module RAPTOR est crucial puisque c'est lui qui pilote la quasi-totalité des modules de la plateforme. Il permet de rendre l'application de la PDT autonome une fois la séquence démarrée. Ce module est constitué d'un ordinateur portable Dell LATITUDE E6500, d'un logiciel de supervision (LabView 8.2) ainsi que d'un ensemble de cartes d'entrées/sorties (cDAQ 9171 + NI 9421 (DI) + NI 9472 (DO) + NI 9215 (AI) + NI 9263 (AO)) de chez National Instruments. Ce module est schématisé à la Figure 3.10. La connectique "USB_DAQ" correspond à la liaison USB entre le PC et la carte cDAQ.

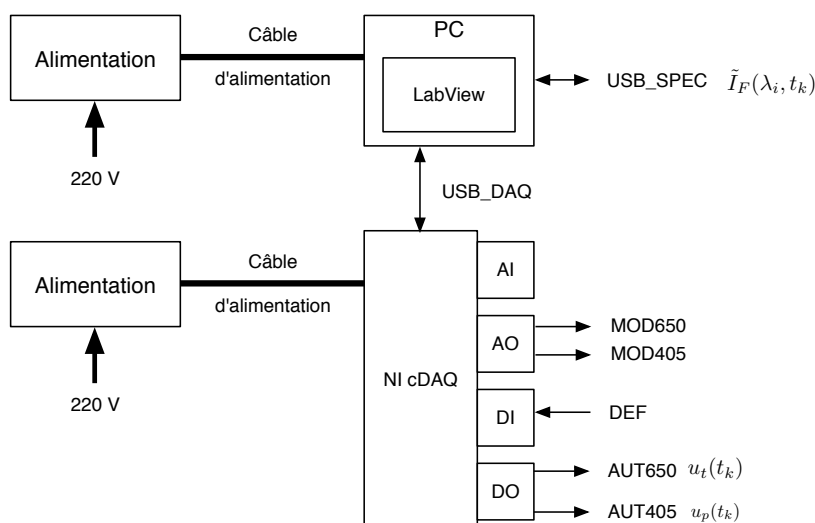


FIGURE 3.10 – Schéma bloc du module RAPTOR

Une interface homme-machine permet à l'utilisateur de configurer le traitement (durée phases ON et OFF, temps d'intégration du spectromètre, durée totale du traitement, la pente de la consigne) ainsi que d'observer en temps réel la courbe de photoblanchiment ainsi que les spectres mesurés.

3.5 Intégration et validation des modules

L'étape d'intégration consiste à valider le fonctionnement de tous les modules séparément, de mettre en œuvre toutes les interfaces nécessaires à leur assemblage (câblage, driver informatique, branchement optique, *etc.*) et à valider le fonctionnement de l'ensemble ainsi créé (une photo de la plateforme MEXICO assemblée est présentée à la Figure 3.11). Il existe différentes manières de valider des exigences, soit par campagne de tests spécifiques à une fonctionnalité d'un module, soit par mise en situation où plusieurs fonctions sont testées en même temps. Un rapide résumé des validations des exigences de RAPTOR est présenté à la table 3.1.

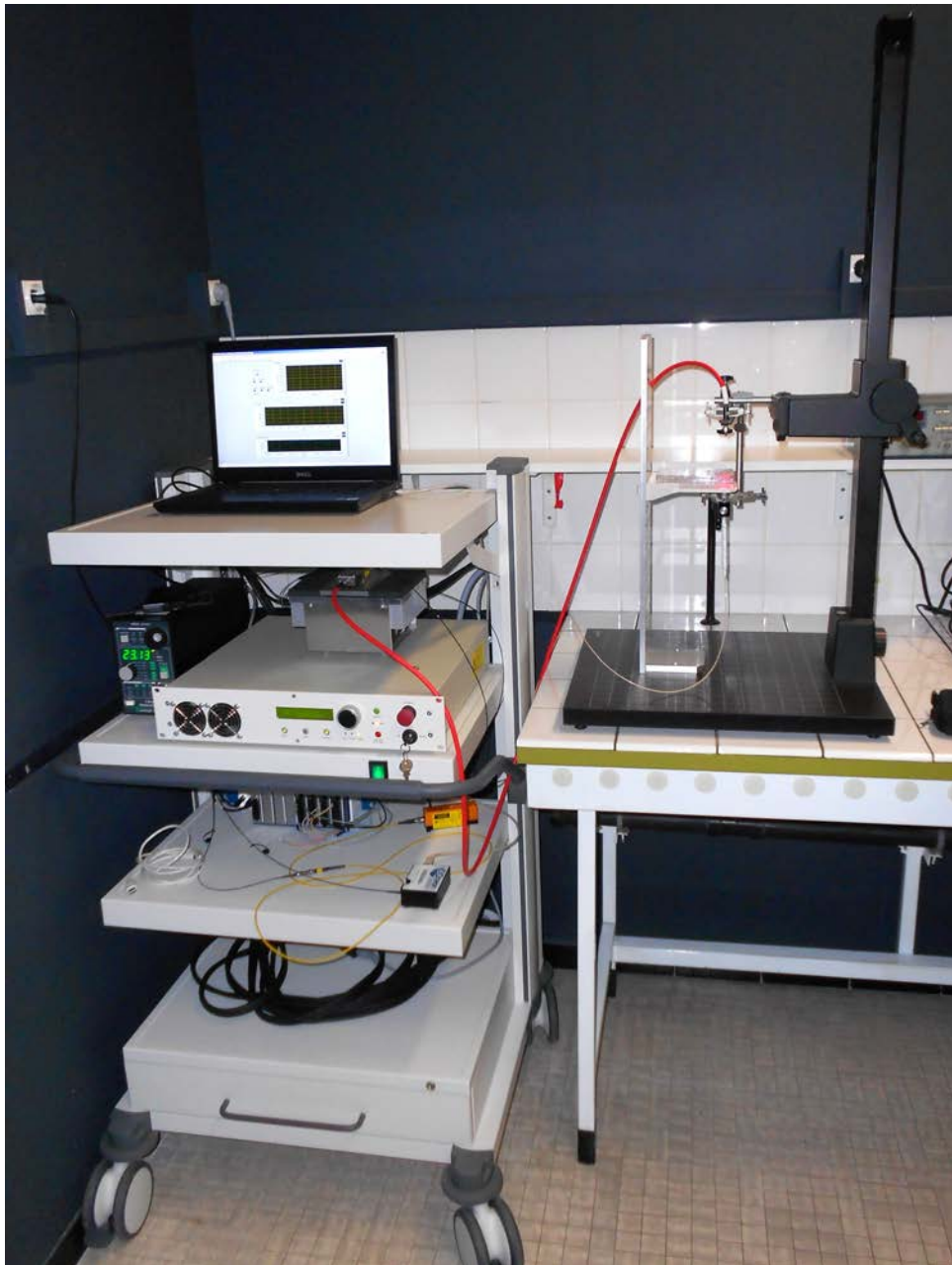


FIGURE 3.11 – Plateforme MEXICO intégrée en situation

TABLE 3.1 – Résumé des exigences et validations du dispositif RAPTOR

Exigences	Solutions techniques principales	Validation
R1 Reconstruction de la courbe de photoblanchiment à partir des spectres mesurés	Spectrofluorimètre, PC	Figure 2.6
R1.1 RAPTOR lit et traite en temps réel les spectres fournis par un spectrofluorimètre pour reconstruire et afficher la courbe de photoblanchiment	Spectrofluorimètre, PC, LabView	Figure 2.6
R1.1.1 Le traitement du spectre doit être réalisé en un temps bien inférieur au temps d'acquisition	PC, LabView	Le temps imparti au traitement d'un spectre est fonction du temps d'observation saisi par le praticien (contrainte logicielle, Section 2.5.2)
R1.2 Le praticien saisit les paramètres d'acquisition des spectres de fluorescence à RAPTOR	Spectrofluorimètre, PC, LabView	L'utilisateur doit saisir le temps d'intégration du spectromètre avant de débiter la séquence
R1.3 RAPTOR alerte le praticien si le rapport signal à bruit du spectre de fluorescence est trop faible	Spectrofluorimètre, PC, LabView	Pas encore implémenté
R2 Correction du signal lumineux en temps-réel	Spectrofluorimètre, LASER de traitement, PC, LabView	Figure 2.12
R2.1 La trajectoire de photoblanchiment souhaitée est donnée par le praticien	PC, LabView	Le coefficient directeur de la pente est demandé à l'utilisateur à l'initialisation de la séquence
R2.2 Le praticien informe RAPTOR de la durée maximale du traitement	PC, LabView	L'utilisateur doit saisir la durée du traitement avant de pouvoir débiter la séquence
R2.3 Le praticien donne à RAPTOR la valeur de fluence appliquée au patient pendant le traitement	PC, LabView	Pas encore implémenté. La dose est calculé manuellement pour l'instant.
R2.4 RAPTOR calcule et module en temps réel la durée des impulsions lumineuses (traitement adaptatif)	PC, LabView	Figure 2.12
R2.4.1 RAPTOR peut travailler avec une période d'échantillonnage minimale d'une seconde	Spectrofluorimètre, PC, LabView	La période d'échantillonnage dépend du temps d'intégration du spectromètre (Section 2.5.2). Des essais ont été réalisés et ont montré qu'en dessous d'un temps d'intégration de 500 ms, le respect des contraintes temporelles n'était plus garanti
R2.5 RAPTOR estime le photoblanchiment "thérapeutique" à partir du photoblanchiment global perturbé par la lumière d'excitation du spectrofluorimètre	Spectrofluorimètre, PC, LabView, Observateur	Validation <i>in silico</i> uniquement pour l'instant, Section 2.4
R2.6 RAPTOR minimise l'erreur de suivi entre la trajectoire de photoblanchiment et celle de la variable d'état de photoblanchiment thérapeutique	PC, LabView	Pas encore implémenté

Conclusion et perspectives de la première partie

Dans cette partie nous avons présenté les principaux éléments qui régissent l'efficacité d'un traitement par thérapie photodynamique et un modèle physique basé sur des équations de cinétique est repris d'une précédente étude, [84]. Ce modèle est composé de 10 paramètres difficiles à estimer compte tenu du problème d'identifiabilité pratique dont souffre le système (une seule grandeur d'état mesurable sur cinq et seulement par intermittence). L'étude de ce modèle simulé grâce à des jeux de paramètres issus de la littérature permet cependant de mettre en avant une forte corrélation entre la dose d'oxygène singulet (agent cytotoxique principalement produit pendant le traitement) et la quantité de PS dans le milieu au cours du traitement. Cette quantité est mesurable et son déclin correspond au photoblanchiment (dégradation au cours du temps du PS par l'oxygène singulet).

Partant de ces observations et mettant en évidence que les issues thérapeutiques souffraient d'une importante variabilité inter-patients, nous avons réalisé une étude dont le but final était d'optimiser l'effet thérapeutique de la PDT tout en contrôlant sa reproductibilité. Pour ce faire, une structure de modèle comportemental simplifié et linéaire par parties a été développée à partir d'une approche d'identification de type boîte grise. Chaque étape de sa conception a été validée par comparaison avec les simulations du modèle physique. Des données issues d'une campagne d'expérimentation *in vitro* ont permis d'identifier le modèle simplifié et de valider son comportement par rapport à un cas réel. Le modèle ainsi développé a permis la conception d'un observateur d'état dont le but est de reconstruire (à partir des signaux d'entrées/sorties) la grandeur de photoblanchiment "thérapeutique" uniquement due au traitement à partir du signal de fluorescence parasité par l'excitation du spectrofluorimètre.

Afin d'optimiser les traitements par PDT, une plateforme d'expérimentation fut développée en parallèle. Cette plateforme permet d'asservir la cinétique de photoblanchiment "thérapeutique" à une trajectoire de référence fixée par le praticien. Elle met en application les travaux plus théoriques décrits précédemment en utilisant la grandeur fournie par l'observateur comme mesure de retour dans la boucle d'asservissement. Une loi d'asservissement similaire (basée sur le signal de photoblanchiment global et non sur la sortie de l'observateur) ainsi mis en place a été testée dans des conditions *in vitro* et montre des résultats prometteurs. Par ailleurs, afin de valoriser ces travaux, une demande de brevet a été déposée sur le dispositif d'asservissement.

Par la suite, l'observateur sera implanté dans le dispositif en question et le tout intégré dans une plateforme portative de démonstration réalisée dans les prochains mois. De par sa conception, le dispositif peut être interfacé avec toute sorte de capteurs qui pourrait fournir un indicateur d'efficacité du traitement (pression partielle de l'oxygène dans les tissus ou luminescence de l'oxygène singulet par exemple).

Deuxième partie

Identification de systèmes biologiques à partir de séquences d'images : 3 cas d'étude

Introduction

Cette deuxième partie présente trois cas d'étude en modélisation et identification de systèmes biologiques à partir de séquences d'images. Ils s'inscrivent tous dans un cadre applicatif où l'objectif final est de répondre, grâce aux outils de notre discipline (traitement d'images, de signaux, modélisation, identification, analyse statistique, *etc.*), à une problématique biologique. Le contexte du premier cas est l'étude de la pharmacocinétique intratumorale de nanoparticules multifonctionnelles dans des cerveaux de rats. Cette étude présente la conception d'un modèle basé sur des connaissances *a priori* (modèle à compartiments) que nous adaptons afin de permettre une meilleure adéquation aux données. L'identification à temps continu de ce modèle à partir d'images IRM *in vivo* permet de conserver le sens biologique des paramètres ainsi que de s'affranchir de la période d'échantillonnage. Par la suite, les paramètres estimés sont analysés afin de caractériser les cinétiques d'incorporation et de relargage de deux types de nanoparticules. Le modèle proposé est également utilisé dans la conception de plans d'expériences visant à optimiser l'usage de l'IRM lorsque les données initiales ne permettent pas d'assurer une précision acceptable sur les résultats.

La seconde étude présente cette fois une modélisation à temps continu de type boîte noire du phénomène de recouvrement de fluorescence observé après un photoblanchiment. La structure du modèle est choisie algorithmiquement suivant le critère d'information de Young qui garantit le meilleur compromis entre adéquation aux données et parcimonie paramétrique. Les données sont issues de séquences d'images de microscopie confocale réalisées lors d'expériences *in vitro* sur deux lignées de cellules cancéreuses. L'analyse des paramètres estimés à partir de ces jeux de données permet de discriminer les deux lignées.

Enfin, la troisième et dernière partie décrit les premiers travaux sur l'étude de l'angiogenèse tumorale et plus particulièrement des effets des thérapies anti-cancers sur le réseau vasculaire associé. Afin d'explorer la faisabilité d'une telle étude, un protocole expérimental *in vivo* a été mis en place. Un anti-angiogénique (le bevacizumab) a été testé sur plusieurs souris dont le réseau vasculaire tumoral est photographié quasi-quotidiennement (grâce à une chambre d'observation implantée sur le dos de chaque animal). Une étape de traitement d'image permet d'extraire plusieurs grandeurs dynamiques explicatives (surface de la tumeur et du réseau vasculaire au cours de l'expérience, développement des bourgeonnements, *etc.*), autant de signaux qui sont supposés être des indicateurs de la croissance tumorale ou du développement vasculaire. Finalement, les perspectives de modélisation sont exposées et se concentrent sur une structure de modélisation à effets aléatoires qui permettrait de prendre en compte les variabilités inter-animaux.

Identification de la pharmacocinétique intratumorale de nanoparticules

Sommaire

1.1	Introduction	75
1.2	Expérimentation <i>in vivo</i>	77
1.2.1	Modèle animal et tumeur xénogreffée	77
1.2.2	Préparation des nanoparticules pour l'étude <i>in vivo</i>	78
1.2.3	Imagerie par résonance magnétique	79
1.3	Segmentation automatique de tumeurs cérébrales	79
1.4	Identification d'un modèle à deux compartiments	80
1.4.1	Modélisation	81
1.4.2	Identifiabilité	82
1.4.3	Etude comparative de deux approches d'identification	83
1.4.4	Résultats d'identification et tests de validation du modèle	84
1.5	Planification d'expériences <i>a posteriori</i>	89
1.5.1	Algorithme d'estimation de t_{0_2}	89
1.5.2	Résultats	90
1.6	Discussion	91
1.7	Conclusions et perspectives	92

1.1 Introduction

Les développements récents sur les nanoparticules multifonctionnelles ont ouvert de nouvelles perspectives en cancérologie en proposant des nanoplatformes capables d'administrer, de mesurer et de contrôler les dommages biologiques causés par des traitements anti-cancers à un niveau sub-cellulaire [111]. Une conséquence directe fut l'émergence de thérapies mettant en œuvre des nanoparticules comme la thérapie par hyperthermie micro-onde [112], la thermoradiographie, la radiothérapie interne [113] ou encore la thérapie photodynamique ciblée (PDT) [114–116].

Comme présenté au premier chapitre, la thérapie photodynamique est un des moyens noninvasifs pour traiter des tumeurs malignes. Elle repose sur l'incorporation sélective d'une molécule photosensibilisante (PS) dans une tumeur suivie par l'exposition à une lumière de longueur d'onde appropriée ou à des rayons X pour déclencher l'effet thérapeutique.

Le contrôle de l'incorporation de l'agent photosensibilisant dans les cellules est un des facteurs importants qui affectent directement l'efficacité thérapeutique de la PDT [77,117]. Plusieurs études se sont axées sur la relation entre la structure moléculaire du PS et son incorporation par des membranes artificielles et des cellules. Ces études incluaient des porphyrins [118] ainsi que des composés structurellement liés, comme les phtalocyanines [119], les chlorines et les pyropheophorbides [120]. Elles concluent que l'incorporation intracellulaire ne peut pas être prédite à partir des propriétés chimiques du PS.

Afin de mieux contrôler l'incorporation intratumorale du PS, des études récentes ont proposé d'embarquer les agents photosensibilisants dans des nanoparticules (NP) multifonctionnelles. Ces récents travaux ont produit une nouvelle génération de nanoparticules embarquant photo- et radiosensibilisants. Dans l'ANR EMED *Target-PDT*¹⁶, des photosensibilisants sont encapsulés dans des nanotransporteurs lipidiques (Lipidots[®]) afin de traiter des cancers de la tête et du cou. Dans les projets ANR P2N *PDTX*¹⁷ et INCA *Nano-Xrays*, des nanoparticules scintillantes sont employées afin de combiner radiothérapie et PDT pour le traitement de cancer du cerveau. Les premiers résultats du projet ANR PCV *Nano-VTP*¹⁸ ont clairement montré que les nanoparticules multifonctionnelles pouvaient être adaptées pour l'imagerie et le traitement de tumeurs cérébrales par PDT interstitielle guidée par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique). L'efficacité thérapeutique de la PDT interstitielle dépend avant tout de la bonne position des fibres optiques dans le cerveau par rapport à la localisation de la tumeur. Ce positionnement est assisté et vérifié par IRM avant d'appliquer la dose de lumière aux tissus biologiques internes.

Dans cette application, le profil désiré des nanostructures est défini par trois exigences pharmacocinétiques :

1. une incorporation rapide par le tissu tumoral ;
2. une internalisation tumorale suffisante pour augmenter le contraste de l'image des cellules tumorales comparé aux tissus sains ;
3. une élimination complète après un délai acceptable par drainage.

Le développement préclinique et clinique d'une telle nanostructure requiert donc d'analyser en profondeur ses caractéristiques pharmacocinétiques. En 2004, le FDA's¹⁹ Critical Path Report propose d'augmenter l'utilisation d'approches basées sur la modélisation pour le développement de nouveaux médicaments, y compris la modélisation de pharmacocinétique et de pharmacodynamie. La détermination d'un modèle paramétrique décrivant les cinétiques d'incorporation d'un agent photosensibilisant dans les cellules vivantes en extrayant des informations des signaux d'entrée et de sortie est un problème typique d'identification [121,122]. Plusieurs articles reportent des applications réussies des techniques d'identification aux problèmes de modélisation de pharmacocinétiques [123–132].

Cependant, jusqu'à maintenant aucune application n'a été reportée concernant la pharmacocinétique d'incorporation de nanoparticules transportant un agent photosensibilisant dans un contexte *in vivo*.

Dans ce chapitre, nous proposons une approche de modélisation dans le but de comparer trois caractéristiques pharmacocinétiques de deux nanoparticules composites. Cette méthode comprend du traitement d'image (segmentation), de la modélisation, de l'identification de système ainsi que des tests statistiques. La caractérisation de la pharmacocinétique des NP est

16. ANR EMED *Target-PDT* (2010-2012)

17. ANR P2N *PDTX* (2011-2013)

18. ANR PCV *Nano-VTP* (2009-2011)

19. U.S. Food and Drug Administration

présentée comme étant un problème d'estimation de paramètres à partir de séquences d'images IRM. Trois exigences principales ont été spécifiées pour la méthode d'estimation développée :

1. elle devra être non-supervisée, *i.e.* les résultats sont indépendants, autant que possible, de l'expertise des biologistes ;
2. elle devra être robuste aux problèmes inverses mal conditionnés du à la présence de cinétiques à constantes de temps très éloignées (rapide *vs* lente) ;
3. le modèle pourra être réutilisé pour concevoir une nouvelle séquence optimale *a posteriori* d'images IRM si une meilleure précision est requise sur certains paramètres.

Nous montrons comment ces spécifications peuvent être satisfaites par la méthode proposée. Deux approches, discrète et continue, sont testées. En effet, les méthodes d'identification directe de modèle à temps continu à partir de données échantillonnées ont connu un regain d'intérêt ces dix dernières années [91]. La majeure partie des méthodes d'estimation sont implantées et disponibles dans la boîte à outil CONTSID²⁰ pour Matlab. L'avantage principal des méthodes d'identification de modèles à temps continu étant de permettre une estimation directe de paramètres physiques.

La méthode expérimentale *in vivo* est décrite dans la Section 1.2. Le processus de segmentation des images IRM est présenté dans la Section 1.3. L'identification du modèle pharmacocinétique est développé dans la Section 1.4. La planification *a posteriori* d'expériences est proposées dans la Section 1.5. Les résultats seront enfin discutés dans la Section 1.6 avant de tirer les conclusions.

1.2 Expérimentation *in vivo*

1.2.1 Modèle animal et tumeur xénogreffée

Quatre rats *nudes* mâles et athymiques (d'un poids moyen de 100 g, rnu/rnu et homozygotes) achetés chez Harlan (Harlan, Gannat, France) ont été utilisés dans cette étude. Les soins des animaux ainsi que l'étude ont été réalisés en accord avec les directives du gouvernement français (directive 2010/63/UE du 22 septembre 2010 appliquée en droit français par le décret n°2013-118) et approuvés par notre numéro d'agrément institutionnel (C 54-547-03). Les rats ont été placés en isolement à 25°C, nourris avec un régime de pellets standards et approvisionnés en eau *ad libitum*. Les cellules de glioblastome humain U87 ont été implantées stéréotaxiquement dans l'hémisphère droit du cerveau. Pour l'implantation, les rats (âgés de 8 semaines, pesant entre 120 et 180 g) ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale (i.p.) d'un mélange de kétamine et xylazine (respectivement 90 et 10 mg/kg) et immobilisés dans un cadre stéréotaxique de Kopf (900M Kopf Instruments, Tujunga, CA).

Après une anesthésie locale par Xylocaïne (AstraZeneca, France) et une préparation antiseptique du crâne, une incision médiane a été pratiquée ainsi qu'un trou de trépan dans le striatum droit (les coordonnées par rapport au bregma sont : +0.5 mm en antéropostérieur, et -4.4 mm en dorsoventral). Les cellules U87 ont été rincées une fois avec du PBS, trypsinées, centrifugées et resuspendues à 5×10^5 cellules/5 μ L de solution tampon salin de Hank (HBSS, 1X). Un volume de 5 μ L de cellules en suspension a été lentement injecté à une profondeur de 4.4 mm dans le putamen caudal droit du cerveau de l'animal en utilisant une microseringue Hamilton de 10 μ L couplée à une pompe à perfusion (0.5 μ L/min). Après injection le trou de trépan a été fermé avec de la cire à os (cire de Horsley, B. Braun, Tattlingen, Allemagne), l'incision dans le scalp a été suturée avec du fil non résorbable Prolène 6/0, enfin la surface a été nettoyée et désinfectée.

20. CONTSID : CONTinuous-time System IDentification, voir www.cran.uhp-nancy.fr/contsid

1.2.2 Préparation des nanoparticules pour l'étude *in vivo*

Nous avons entrepris cette étude afin de valider l'intérêt des nanoplateformes ultrapetites et multifonctionnelles, ces dernières sont composées de peptides déposés en surface afin de cibler la vascularisation de la tumeur *via* neuropiline-1 (NRP-1), d'un agent photosensibilisant et enfin d'un agent de contraste, tout deux destinés à un usage en PDT interstitielle (iPDT) guidée par IRM sur des tumeurs cérébrales.

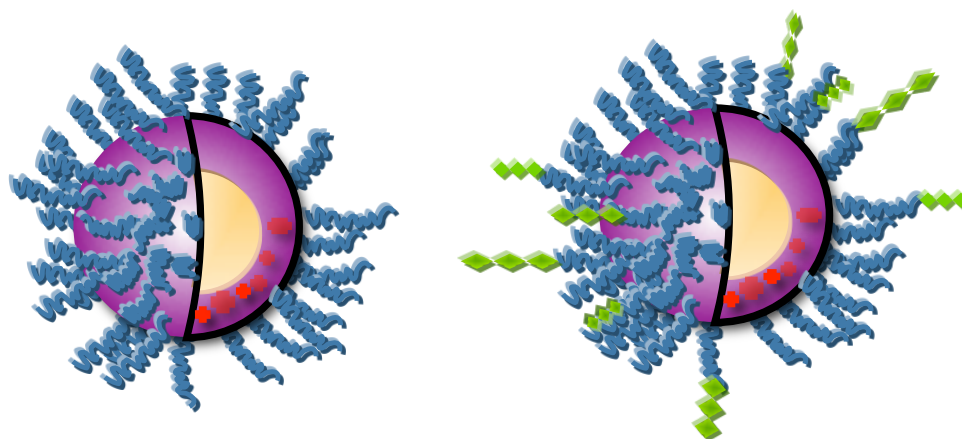


FIGURE 1.1 – Schéma représentant la constitution de NP-CONT (à gauche) et NP-PEP (à droite), avec : en jaune, le cœur en oxyde de gadolinium, en violet l'enveloppe de silice, en rouge les molécules de PS, en bleu les polymères hydrophiles (surfactants) et en vert les peptides

Nous avons développé et optimisé des nanoparticules (NP-PEP) de silice bardées de peptides, encapsulant un noyau d'oxyde de gadolinium comme agent de contraste IRM ainsi que de la chlorine comme photosensibilisant. Plus précisément, ces nanoparticules hybrides non-biodégradables sont constituées d'une coquille en silicium contenant les molécules de chlorure greffées covalamment, d'acide diéthylène triamine penta acétique (DOTAGA, une substance chélatrice active) comme surfactant et de peptides ATWLPPR (H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH) comme unités de ciblage (à raison d'à peu près quatre peptides par NP). Ces nanoparticules sont schématisées à la Figure 1.1.

Des nanoparticules sans photosensibilisant ni peptides de ciblage ont aussi été synthétisées et choisies comme contrôle (NP-CONT).

Des études *in vivo* ont révélé que les nanoparticules pouvaient être visualisées chez les rats portant des tumeurs U87 orthotopiques en utilisant des analyses IRM. Cela permettant l'optimisation de l'implantation des fibres optiques juste avant une iPDT. Après injection intra-veineuse de NP-PEP, l'augmentation du contraste de la tumeur sur l'imagerie IRM nous permet de visualiser les zones proliférantes du tissu tumoral.

L'affinité moléculaire des nanoparticules ciblées par ATWLPPR a été déterminée par un test de *binding* dans une étude publiée par Benachour *et al.* [116]. Cette étude démontre la faculté de ces nanoparticules à cibler les récepteur NRP-1.

La relaxivité longitudinale r_1 du gadolinium a été déterminée pour les nanoparticules avant d'être conjuguées avec les peptides de ciblage. Les valeurs de r_1 obtenues étaient entre 10 et 14 $\text{mM}^{-1}.\text{S}^{-1}$. Ces valeurs sont à peu près 2.5 à 3.5 fois plus grandes que celles d'autres agents à base de gadolinium disponibles en clinique [133].

Les nanoparticules ont été mises en suspension dans de l'eau ultra pure avec du NaCl à 9 ‰ afin d'obtenir une concentration en Gd de 100 mM dans une solution iso-osmolaire à un

pH de 7.4. La solution à injecter a été préparée pour chaque type de nanoparticules étudiées (NP-PEP et NP-CONT) par dilution dans 9‰ NaCl pour obtenir un volume d'injection de 500 μ L par rat (*e.g.* 25 μ mol de gadolinium pour un poids de souris d'environ 250 g).

Deux rats ont été injectés (par intra-veineuse) avec les nanoparticules ciblées NP-PEP (rats 1 et 2) et les deux autres animaux avec les nanoparticules contrôles NP-CONT (rats 3 et 4). Après anesthésie, les rats ont été cathétérisés dans la veine caudale avec un microperfuseur (BD Vacutainer Safety-Lok : 23G $\times$ 3/4" $\times$ 7" 0.6 $\times$ 19 mm $\times$ 178 mm, France). Le cathéter a été rempli par avance avec de l'héparine à 10 % (Heparin 25000 UI), ce qui permet de vérifier le retour veineux, la perméabilité du cathéter et d'éviter son occlusion par coagulation du sang. L'injection se compose de 500 μ L de solution de nanoparticules, suivie par 500 μ L de NaCl à 9 ‰ pour rincer la canule (pendant 1 minute).

1.2.3 Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique des cerveaux de rat a été réalisée avec un système à aimant horizontal de bore de 7 Tesla (Biospec, Brüker, Ettlingen, Germany) équipé d'un système à gradient de 400 mT/m et d'une bobine de surface de 30 mm de diamètre pour recevoir le signal.

Vingt jours après l'inoculation intracrânienne de la tumeur, l'animal a été anesthésié avec un mélange d'air et d'isoflurane à 4 %. L'anesthésie a été maintenue durant toute la procédure d'imagerie avec de l'isoflurane à 1.5 - 2 %. La veine caudale a été cathétérisée et l'animal anesthésié a immédiatement été préparé pour l'IRM. La tête du rat a été fixée avec des barres d'oreille et d'autres d'incisives pour éviter tout mouvement pendant l'acquisition, la respiration a été surveillée en permanence en utilisant une sonde de pression positionnée sur le diaphragme du rat.

Les séquences écho de spin pondérées T2 TurboRARE (*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*, 4200/12 [temps de répétition (msec)/durée de l'écho (msec)], épaisseur des sections : 0.651 mm, champs visuel : 2 $\times$ 2 cm, matrice 512 $\times$ 192) ont été acquises pour des estimations sûres de positionnement et de taille tumorale. Afin d'évaluer les cinétiques des nanoparticules dans la tumeur aussi bien que l'intensité du signal IRM augmenté par lesdites nanoparticules, des séquences FLASH (*Fast Low Angle SHot*, 86/3.6, épaisseur des sections : 0.651 mm, champs visuel : 2 $\times$ 2 cm, matrice 512 $\times$ 192) ont été acquises juste une minute avant l'injection et pendant encore 60 minutes après.

1.3 Segmentation automatique de tumeurs cérébrales

Notre modélisation de la pharmacocinétique requiert premièrement de déterminer les régions d'intérêt (*Region of Interest*, ROI) à partir des séquences d'images IRM. Dans cette application, chaque ROI est délimité par le périmètre de la tumeur.

Quatre séquences d'images IRM des cerveaux de rats ont été prises, chaque prise d'image étant séparée de 30 secondes pendant une heure. Cette durée est suffisamment courte pour raisonnablement supposer que la tumeur ne change pas de taille, c'est pourquoi une seule segmentation par séquence d'images a été réalisée. Cette opération a été appliquée à l'image ayant le niveau de contraste entre la tumeur et le contexte biologique le plus important.

Les NP ont été injectées au début de la session IRM. L'instant t_{0_1} a été arbitrairement choisi au moment de l'administration. Après un court instant, la tumeur commence à briller sur les images IRM (signe d'une concentration importante de NP à l'intérieur).

Il est admis que l'augmentation du contraste due à l'oxyde de gadolinium n'est pas uniforme pour les grandes concentrations [134], cependant, puisque les concentrations mises en jeux dans la

région d'intérêt restent relativement faibles (*i.e.* < 4 nmol) [116], nous pouvons considérer l'intensité des pixels constituant la tumeur comme étant proportionnelle à la quantité de NP présente à l'intérieur de celle-ci. Ainsi l'intensité moyenne des pixels inclus dans la région d'intérêt nous informe sur la quantité de NP dans la tumeur cérébrale.

Cependant, pour des concentrations élevées d'oxyde de gadolinium, la relation non-linéaire entre $y_m(t_k)$ et cette concentration pourrait être prise en compte sous la forme d'un modèle Hammerstein-Wiener, sans en modifier la dynamique, voir [135].

Différentes étapes de segmentation ont été réalisées afin d'obtenir automatiquement le signal de référence utilisé dans la phase d'estimation de la Section 1.4.

Les fonctions et algorithmes utilisés pour la segmentation des images sont disponibles dans la boîte à outils *Image Processing* de Matlab. Un exemple du résultat de segmentation est présenté à la Figure 1.2.

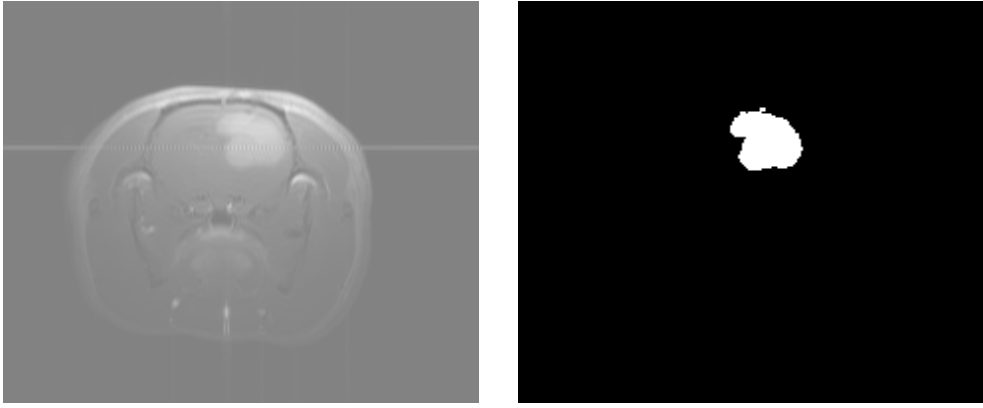


FIGURE 1.2 – Exemple d'une image IRM (a gauche) et de sa région d'intérêt sélectionnée automatiquement

L'intensité moyenne des pixels à l'intérieur du ROI $m(t_k)$ est déterminée en utilisant l'équation (1.1), où N_p est le nombre de pixels constituant le ROI et k l'indice de l'image.

$$m(t_k) = \frac{1}{N_p} \sum_{i=1}^{N_p} p(i, k) \quad (1.1)$$

avec t_k compris dans $[1, \dots, N_t]$ correspondant aux instants. N_t est le nombre total d'échantillons.

$m(t_k)$ est ensuite utilisé pour calculer l'EHC (*Enhancement Contrast ratio*) correspondant noté $y_m(t_k)$, par la suite une normalisation par rapport à la valeur du signal avant injection est appliquée.

$$y_m(t_k) = [m(t_k) - m(t_{0_1})] \frac{100}{m(t_{0_1})} \quad (1.2)$$

1.4 Identification d'un modèle à deux compartiments

Dans cette partie, nous proposons une structure de modèle paramétrique conçue pour la caractérisation de la pharmacocinétique des NP dans la tumeur cérébrale. Les paramètres de ce modèle sont estimés à partir de jeux de données d'entrée/sortie $\{u(t_k); y_m(t_k)\}_{1, \dots, N_t}$ où $u(t_k)$

est la quantité de NP injectée au rat, approximée par un signal échelon. Les paramètres sont finalement utilisés pour comparer les performances pharmacocinétiques des NP testées.

1.4.1 Modélisation

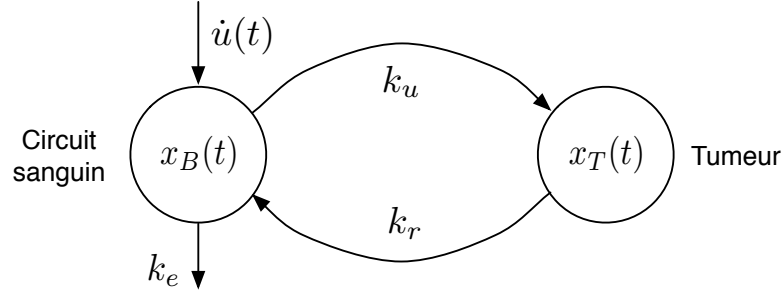


FIGURE 1.3 – Modèle à deux compartiments de la pharmacocinétique des NP

Le modèle à deux compartiments présentés à la Figure 1.3 caractérise la pharmacocinétique des NP. La représentation d'états associées est :

$$\begin{cases} \dot{x}_B(t) = \dot{u}(t) - k_e x_B(t) - k_u x_B(t) + k_r x_T(t) & (1.3) \\ \dot{x}_T(t) = k_u x_B(t) - k_r x_T(t) & (1.4) \\ y(t) = C x_T(t) & (1.5) \end{cases}$$

avec

$$x_B(0) = x_T(0) = 0 \quad (1.6)$$

où $x_B(t)$ et $x_T(t)$ représentent respectivement la quantité de NP dans le système sanguin du rat (premier compartiment) et dans sa tumeur cérébrale (second compartiment). Dans cette étude, le signal d'EHC non bruité $y(t)$ est supposé être proportionnel à la quantité de NP $x_T(t)$, comme décrit dans l'équation (1.5). C est un coefficient de mesure inconnu et dépendant des réglages de l'IRM. Cela requiert donc, pour garantir la validité de cette approche, que ces réglages restent constant pour chaque expérience. Les paramètres k_e , k_u et k_r sont des taux d'échange constants associés à l'élimination, à l'incorporation ainsi qu'au relargage des NP.

Les équations (1.3), (1.4) et (1.5) peuvent être mises sous la forme d'une fonction de transfert :

$$\begin{cases} y(t) = \frac{k_u C p}{p^2 + k_{ure} p + k_{re}} u(t) & (1.7) \end{cases}$$

$$\begin{cases} y_m(t_k) = y(t_k) + e(t_k) & (1.8) \end{cases}$$

où $y_m(t_k)$ est le ratio EHC mesuré qui est supposé corrompu par une séquence discrète blanche de moyenne nulle $e(t_k)$ dont la variance est σ^2 . Ce signal est calculé à partir de (1.2) durant la phase de traitement d'images appliquée aux séquences IRM. $y(t_k)$ correspond aux valeurs échantillonnées de $y(t)$ aux instants t_k . Les coefficients de la fonction de transfert sont tels que $k_{uC} = C \times k_u$, $k_{ure} = k_u + k_r + k_e$ et $k_{re} = k_r \times k_e$. p est l'opérateur différentiel, *i.e.* $p^n \cdot x(t) = \frac{d^n x(t)}{dt^n}$

L'inconvénient de ce modèle à compartiment est qu'il suppose que toutes les NP soient complètement éliminées après un temps suffisamment long. En pratique, il semble qu'une partie non négligeable des NP soit retenue à long terme par l'hôte biologique. Afin d'évaluer la biodistribution de l'oxyde de gadolinium, une analyse par spectromètre de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) a été menée sur différents organes disséqués sur les rats à peu près 75 minutes après l'injection de NP. Les analyses ont montré une quantité restante de NP entre 0.001 % et 0.013 % de la dose injectée à l'intérieur du cerveau des rats 15 minutes après la fin des sessions IRM [116].

Pour estimer la quantité de NP capturées, nous avons ajouté un paramètre k_h au numérateur de la fonction de transfert. Ce terme permet de caractériser l'état stationnaire de la réponse cinétique (*i.e.* un gain statique $\frac{k_{hC}}{k_{re}}$ non nul) comme illustré dans la Figure 1.4. En conséquence de quoi, la fonction de transfert (1.7) devient :

$$y(t) = \frac{k_{uC}p + k_{hC}}{p^2 + k_{ure}p + k_{re}}u(t) \quad (1.9)$$

avec $k_{hC} = C \times k_h$.

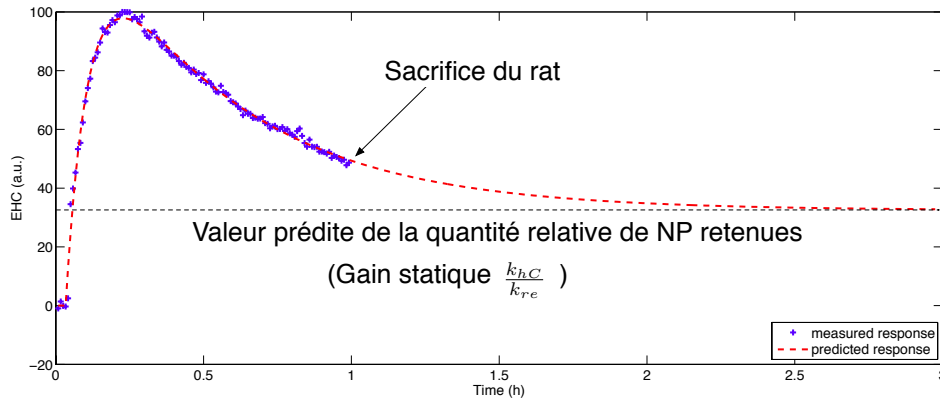


FIGURE 1.4 – Exemple d'une prédiction de rétention de nanoparticules

1.4.2 Identifiabilité

L'identifiabilité structurelle [121] traite de la possibilité de donner une valeur unique à chaque paramètre d'un modèle mathématique. L'unicité de cette solution est évaluée dans un cadre idéal ou théorique où le processus et le modèle ont des structures identiques, les données sont non bruitées et où le signal d'entrée et les instants de mesure peuvent être définis à souhait. Dans notre cas, il apparaît clairement que les cinq paramètres inconnus k_u , k_h , k_e , k_r et C ne peuvent pas être estimés à partir des quatre coefficients k_{uC} , k_{hC} , k_{ure} et k_{re} de la fonction de transfert. Néanmoins, dans cette application, ce manque d'identifiabilité structurelle n'est pas un handicap majeur.

Puisqu'il est réaliste de supposer que la valeur du coefficient C ne change pas entre deux expériences consécutives, réalisées avec le même matériel et dans le même contexte, la comparaison de deux valeurs de k_{uC} , pour deux nanoparticules différentes, permet de détecter une augmentation ou une réduction de la cinétique d'incorporation en utilisant une des deux NP comme référence.

Le rapport $\frac{k_{hC}}{k_{re}}$ nous informe à propos de la quantité de nanoparticules restant dans la tumeur à l'état stationnaire. En revanche, $k_{re} = k_r \times k_e$ caractérise la cinétique d'élimination globale des

NP par l'hôte biologique. Ainsi, k_{uC} , k_{hC} and k_{re} peuvent être utilisés comme critères numériques pour comparer différentes nanoparticules par rapport à leurs pharmacocinétiques d'incorporation et d'élimination.

1.4.3 Etude comparative de deux approches d'identification

Partant de la fonction de transfert (1.9), deux approches de modélisation basées sur des données, dites méthodes directe et indirecte, peuvent être utilisées pour estimer les paramètres inconnus. L'approche directe repose sur l'indentification du modèle à temps continu (TC) à partir de données échantillonnées [91]. La seconde technique est composée de deux étapes : l'identification d'une fonction de transfert à temps discret (TD) suivie par sa conversion en un modèle à temps continu.

Approche directe

Différentes méthodes statistiques ont été proposées pour résoudre les problèmes à TC d'estimation de paramètres formulés dans les domaines temporel ou fréquentiel. Cependant, seulement la méthode de la variable instrumentale raffinée et simplifiée pour les systèmes à temps continu (*Simplified Refined Instrumental Variable method for Continuous-time systems*, SRIVC) sera considéré ici. La méthode par SRIVC est très efficace dans de nombreux cas pratiques et est une des rares méthodes à pouvoir être interprétée en terme d'optimalité statistique, et donc à pouvoir fournir une estimée de la matrice de covariance de l'erreur et ainsi estimer les intervalles de confiance sur les paramètres identifiés [136].

Cet algorithme itératif est basé sur la méthode de la variable instrumentale, [122], initialisée par les moindres carrés. Par ailleurs, les dérivées des signaux d'entrée/sortie nécessaires au calcul du vecteur de regression des moindres carrés sont approchées par un filtre à variable d'état. Enfin, la fréquence de coupure de ce filtre est fixée à une valeur suffisamment grande pour prendre en compte toutes les constantes de temps du système étudié, [137].

La méthode SRIVC présente également l'avantage d'être simple à utiliser puisque les paramètres du modèle à TC sont directement estimés à partir des données échantillonnées, même si elles le sont à pas variable. L'étape de conversion qui peut être délicate n'est plus nécessaire. La fonction `srivc` de la boîte à outil CONTSID a été utilisée pour estimer les paramètres du modèle (1.9). Cette boîte à outil embarque toutes les commandes et algorithmes nécessaires pour identifier ce genre de modèle.

Approche indirecte

La structure de modèle à erreur de sortie (*Output Error*, OE) équivalente à (1.9) *via* un bloqueur d'ordre zéro est de la forme :

$$\begin{cases} y(t_k) &= \frac{b_1 q^{-1} + b_2 q^{-2}}{1 + f_1 q^{-1} + f_2 q^{-2}} u(t_k) \\ y_m(t_k) &= y(t_k) + e(t_k) \end{cases} \quad (1.10)$$

où q^{-n} est l'opérateur de retard de n échantillons (*i.e.* : $q^{-1}x(t_k) = x(t_{k-1})$). $[b_1, b_2]$ et $[f_1, f_2]$ sont respectivement les coefficients exogènes et autoregressifs. Notons que les coefficients d'un modèle à TD sont dépendants de la période d'échantillonnage et n'ont pas de sens biologique.

L'équation de récurrence associée à la fonction de transfert (1.10) est donc :

$$\begin{aligned} y(t_k) &+ f_1 y(t_{k-1}) + f_2 y(t_{k-2}) \\ &= b_1 u(t_{k-1}) + b_2 u(t_{k-2}) + e(t_k) \end{aligned} \quad (1.11)$$

Afin d'estimer les coefficients du modèle, un algorithme d'optimisation non-linéaire (de la boîte à outil *System Identification*, SID, pour Matlab) basé sur une minimisation de l'erreur de sortie a été utilisé (fonction `oe`), [122].

Cet algorithme itératif minimise le critère suivant :

$$\hat{\theta} = \arg \min_{\theta} (V_N(\theta, Z^{N_t})) \quad (1.12)$$

où $V_N(\theta, Z^{N_t})$ est une fonction générale de l'erreur de prédiction du modèle définie par :

$$V_N(\theta, Z^{N_t}) = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^{N_t} L(\epsilon(t_k, \theta)) \quad (1.13)$$

avec $L(\cdot)$ une fonction de norme (par exemple la norme quadratique $L(\epsilon) = \frac{1}{2}\epsilon^2$) et $Z^{N_t} = [y_m(1), u(1), \dots, y_m(N_t), u(N_t)]$ une matrice contenant les données collectées. L'erreur de prédiction étant définie par :

$$\epsilon(t_k, \theta) = H^{-1}(q, \theta) [y(t_k) - G(q, \theta)u(t_k)] \quad (1.14)$$

Dans le cas d'une structure de modèle OE, nous avons $H(q, \theta) = 1$ et $G(q, \theta) = \frac{B(q, \theta)}{F(q, \theta)}$, l'erreur de prédiction devient donc une erreur de sortie.

La dernière étape de la méthode indirecte est de convertir le modèle à temps discret obtenu dans le domaine à temps continu. Une telle transformation peut être réalisée par la fonction `d2c` de Matlab, paramétrée avec un bloqueur d'ordre zéro. Les estimés sont présentées dans la Section suivante.

1.4.4 Résultats d'identification et tests de validation du modèle

Les sorties mesurées et simulées sont comparées à la Figure 1.5.

Analyse du *fitting*

La Figure 1.5 montre que la sortie du modèle est en adéquation avec les données de mesure. Les valeurs du critère de *fitting* sont présentées dans le tableau 1.1.

TABLE 1.1 – Critères d'adéquation aux données

Rats	FIT_{TC}	FIT_{TD}
1 (NP-PEP)	77.2 %	77.2 %
2 (NP-PEP)	88.5 %	88.5 %
3 (NP-CONT)	91.3 %	-28.2 %
4 (NP-CONT)	83.7 %	83.7 %

Les valeurs du critère d'adéquation pour les modèles à temps continu et discret sont équivalentes. Il faut cependant noter que l'identification du modèle à TD n'est pas concluante dans le cas du Rat 3. Cet échec semble être dû au problème de convergence vers un minimum local des méthodes non-linéaires classiques d'optimisation, [138]. En effet, si l'on initialise l'algorithme d'identification à temps discret `oe` avec la version discrète du modèle à temps continu, identifié

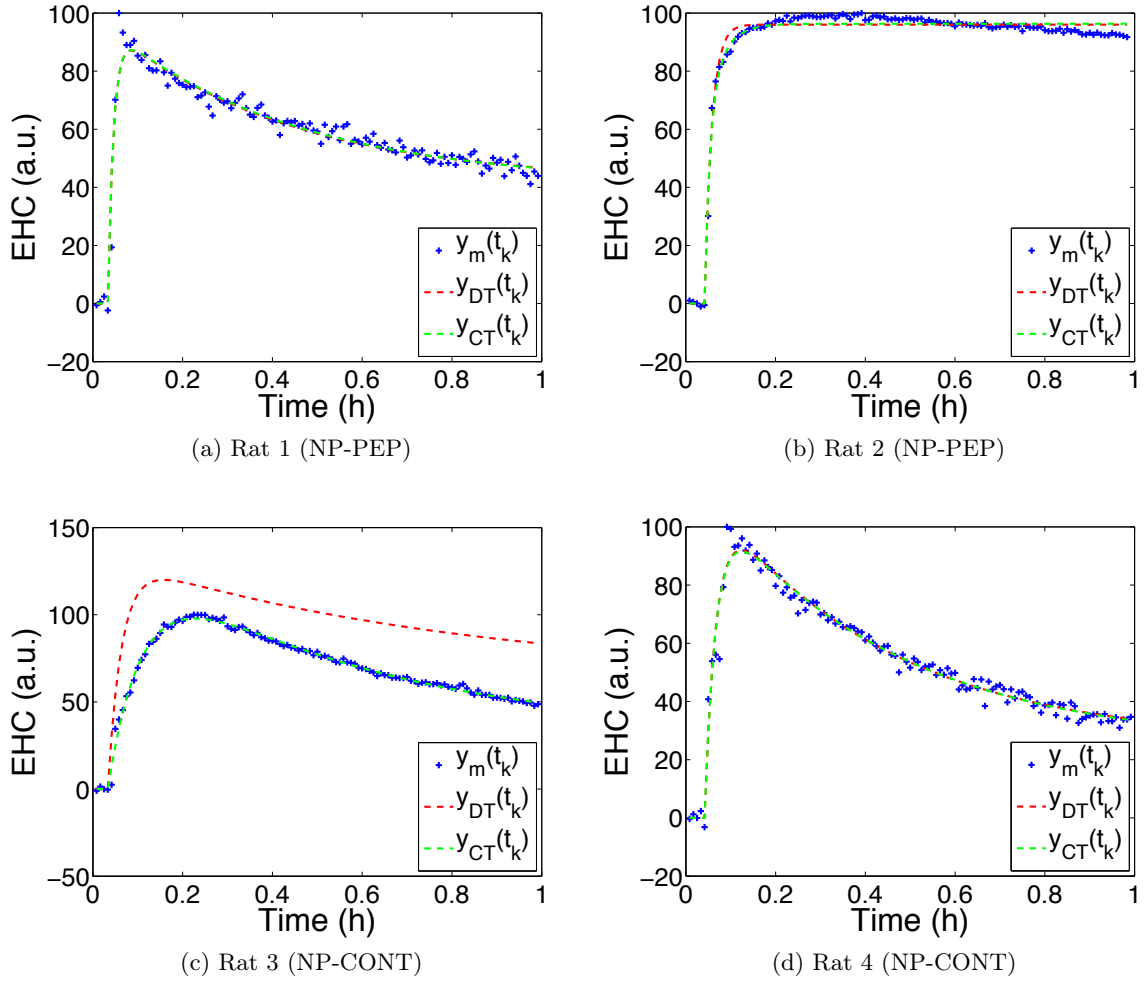


FIGURE 1.5 – Signaux de mesure (croix bleues) et les sorties estimées (méthode directe en vert et indirecte en rouge)

par SRIVC, le résultat en est grandement amélioré (en terme de reproduction du comportement et d'incertitude sur les paramètres).

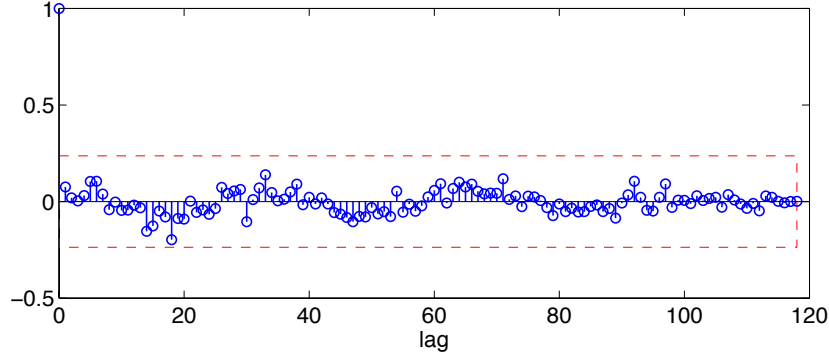
Afin de compléter cette comparaison, nous devons tester les hypothèses sur la blancheur de l'erreur de sortie $e(t_k)$.

Analyse des résidus

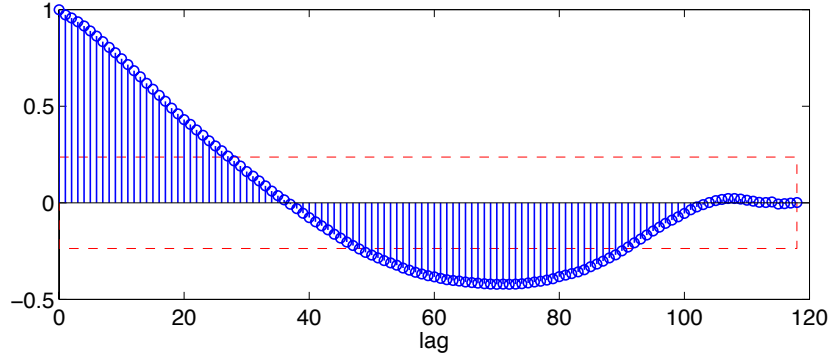
Le test de blancheur consiste à vérifier les hypothèses statistiques faites sur $e(t_k)$. Ce test compare la fonction d'autocorrelation des résidus avec le signal de Kronecker à l'intérieur d'un intervalle de confiance à 99 %. La fonction `resid` de la boîte à outil SID pour Matlab a été utilisée pour implémenter le test de blancheur. Les résultats pour le Rat 3 sont présentés dans le tableau 1.2 ainsi qu'à la Figure 1.6.

TABLE 1.2 – Résultats des tests de blancheur

Rat	Identification directe	Identification indirecte
1 (NP-PEP)	Validé	Validé
2 (NP-PEP)	Invalidé	Invalidé
3 (NP-CONT)	Validé	Invalidé
4 (NP-CONT)	Validé	Validé



(a) Approche directe



(b) Approche indirecte

FIGURE 1.6 – Exemple de résultat du test de blancheur pour le rat 3 avec en (a) la fonction d'autocorrelation à l'intérieur d'un intervalle de confiance à 99 % pour le modèle à temps continu et en (b) une fonction qui sort des bornes pour le modèle à temps discret

Analyse des estimés

Les paramètres estimés et leur coefficient de variation ($c_v = \left| \frac{\sigma_\theta}{\mu_\theta} \right| \times 100$, où σ_θ est l'écart type des estimés) sont présentés dans le tableau 1.3. Les σ_θ peuvent être obtenus soit par le biais de les matrices de covariance fournies par les algorithmes (sous condition que les hypothèses sur la blancheur du bruit soient respectées), soit par simulations de Monte-Carlo. Dans notre cas, les deux méthodes fournissent des résultats équivalents pour les jeux de données ayant passés le test de blancheur des résidus, mais pas pour les autres. C'est pourquoi, par soucis de justesse, nous ne présentons que les résultats issus des simulations de Monte Carlo ($N_{sim} = 1000$).

Les valeurs des coefficients de variation c_v mettent en avant un manque de précision ($> 10\%$) sur le paramètres k_{hC} quelque soit la méthode utilisée et l'animal testé. Cette incertitude est due

à la relativement courte durée d'observation de la cinétique lente de relargage. Par conséquent, ce manque de précision nous empêche d'évaluer la potentielle toxicité à long terme des NP. Afin de contourner ce problème, nous présentons dans la prochaine Section la conception de plans d'expériences *a posteriori* qui prennent en compte les contraintes de coût associées à l'IRM.

Notons que les résultats pour le Rat 2 sont nettement en dessous des autres. Il semble que l'on arrive, sur ce type de données, aux limites de la méthode SRIVC. Les constantes de temps sont trop éloignées pour pouvoir être identifiées avec suffisamment de certitude.

TABLE 1.3 – Estimés et leurs incertitudes pour les deux types de nanoparticules à partir des méthodes directe et indirecte

Rat	Paramètre	Approche directe		Approche indirecte	
		Estimé	σ_θ	Estimé	c_v (%)
1 (NP-PEP)	$\hat{k}_{uC}$	2.1	0.2	2.1	0.2
	$\hat{k}_{hC}$	610.9×10^{-6}	97.2×10^{-6}	634.6×10^{-6}	401.0×10^{-6}
	$\hat{k}_{ure}$	22.9×10^{-3}	1.8×10^{-3}	22.7×10^{-3}	2.0×10^{-3}
	$\hat{k}_{re}$	14.8×10^{-6}	1.7×10^{-6}	15.2×10^{-6}	6.5×10^{-6}
2 (NP-PEP)	$\hat{k}_{uC}$	1.8	0.2	1.8	0.3
	$\hat{k}_{hC}$	20.0×10^{-3}	13.4×10^{-3}	22.5×10^{-3}	25.7×10^{-3}
	$\hat{k}_{ure}$	33.6×10^{-3}	11.0×10^{-3}	34.7×10^{-3}	20.7×10^{-3}
	$\hat{k}_{re}$	207.5×10^{-6}	139.7×10^{-6}	234.0×10^{-6}	268.1×10^{-6}
3 (NP-CONT)	$\hat{k}_{uC}$	0.5	7.3×10^{-3}	0.6	0.5
	$\hat{k}_{hC}$	63.8×10^{-6}	10.9×10^{-6}	153.3×10^{-6}	1.3×10^{-3}
	$\hat{k}_{ure}$	4.2×10^{-3}	0.08×10^{-3}	9.4×10^{-3}	19.8×10^{-3}
	$\hat{k}_{re}$	2.0×10^{-6}	0.1×10^{-6}	3.1×10^{-6}	17.5×10^{-6}
4 (NP-CONT)	$\hat{k}_{uC}$	1.2	52.7×10^{-3}	1.2	0.1
	$\hat{k}_{hC}$	181.4×10^{-6}	28.1×10^{-6}	195.4×10^{-6}	30.1×10^{-6}
	$\hat{k}_{ure}$	11.7×10^{-3}	0.6×10^{-3}	11.7×10^{-3}	0.7×10^{-3}
	$\hat{k}_{re}$	7.4×10^{-6}	0.5×10^{-6}	7.6×10^{-6}	0.5×10^{-6}

1.5 Planification d'expériences *a posteriori*

La toxicité des composés des NP soulève des questions au sujet de leur totale évacuation de l'organisme. Les connaissances actuelles à propos des nano-agents utilisés précédemment ne permettent pas de conclure de manière certaine sur leur clairance. Pour répondre à cette question cruciale, il faut examiner les valeurs du rapport $\frac{k_{hC}}{k_{re}}$. Les résultats précédents ont montré que le manque de précision sur le paramètre k_{hC} peut parfois mener à des conclusions douteuses. Dans cette application, les incertitudes sont liées à la présence d'une cinétique rapide d'incorporation suivie d'une autre très lente pour la phase de relargage. L'existence d'un tel écart entre les deux constantes de temps de la fonction de transfert peut induire des problèmes numériques pendant la phase d'estimation.

Une solution pourrait être de réaliser une expérience plus longue afin d'observer directement l'état stationnaire de la réponse, mais ce genre de protocole impliquerait une session d'imagerie beaucoup plus longue, ce qui n'est pas économiquement viable en pratique. Sans compter que les rats doivent être sacrifiés avant que les tumeurs n'atteignent la taille maximale autorisée, et ce, pour des raisons éthiques évidentes.

Afin d'améliorer la précision sur k_{hC} , nous proposons de planifier une seconde série d'expériences basée sur les informations fournies par le modèle précédemment identifié tout en minimisant le coût additionnel. Comme illustré à la Figure 1.7, le principe est de réaliser une seconde session d'imagerie sur les mêmes rats quelques temps après la fin de la première session. Une nouvelle estimation de paramètres sera ensuite appliquée aux jeux de données augmentés composés du :

- premier jeu de données issu de la première session d'expériences ;
- jeu de données d'interpolation pour combler entre les deux sessions ;
- second jeu de données issu de la deuxième session d'expériences.

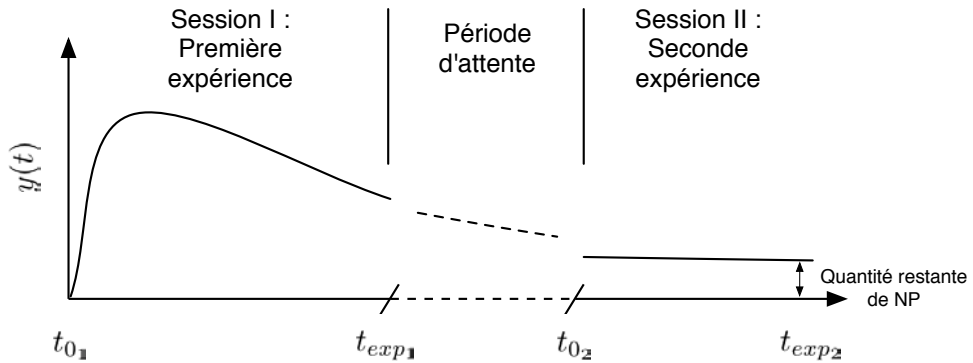


FIGURE 1.7 – Déroulement des expériences

Afin de minimiser le coût expérimental, nous proposons de limiter la durée de chaque session additionnelle à 30 minutes.

La question à laquelle il reste à répondre est : quand devons-nous commencer la deuxième session ? Dans le prochain paragraphe nous proposons une solution rapide et efficace pour estimer t_{0_2} , l'instant de début de la seconde expérience.

1.5.1 Algorithme d'estimation de t_{0_2}

Dans cette partie nous proposons une méthode pour sélectionner la meilleure valeur de t_{0_2} , pour laquelle le coefficient de variation c_v des paramètres soit acceptable (sous le seuil classique

de 5 %). Comme nous ne disposons pas d'information sur les dynamiques du système pendant la période d'attente, nous proposons d'interpoler les sessions I et II par des données simulées provenant d'un modèle "boîte noire" du troisième ordre présenté en (1.15). En effet, l'algorithme SRIVC n'est pas assez robuste pour supporter un tel écart entre deux points de mesure.

Contrairement à la fonction de transfert (1.9), ce modèle ne possède pas de sens biologique. En pratique, il sera uniquement utilisé pour interpoler les données provenant des deux sessions IRM. Puisque pour l'instant aucune session II n'a été réalisée, ce modèle est également utilisé pour simuler les données bruitées provenant de cette expérience.

$$\begin{cases} z(t) &= \frac{b_2 p^2 + b_1 p + b_0}{p^3 + a_2 p^2 + a_1 p + a_0} u(t) \\ y_{sim}(t_k) &= z(t_k) + v(t_k) \end{cases} \quad (1.15)$$

Cet algorithme d'estimation de t_{0_2} (basé sur une méthode de *screening*) peut être décomposé de la façon suivante :

1. définir un vecteur contenant toutes les valeurs de t_{0_2} à tester ;
2. identifier le modèle (1.15) à partir des données *in vivo* $y_m(t_k)$ pour $t_k \in [t_{0_1}, t_{exp_1}]$ grâce à la méthode SRIVC ;
3. simuler la sortie $z(t_k)$ du modèle précédemment identifié ;
4. calculer les résidus $\epsilon(t_k) = y_m(t_k) - z(t_k)$ et estimer leur écart type $\hat{\sigma}$;
5. fixer t_{0_2} à la première valeur du vecteur de variation discrétisé défini par l'utilisateur ;
6. créer un signal de mesure fictif en concaténant $y_m(t_k)$ pour $t_k \in [t_{0_1}, t_{exp_1}]$ et $y_{sim}(t_k) = z(t_k) + v(t_k)$ pour $t_k \in [t_{exp_1}, t_{exp_2}]$ où $v(t_k) \stackrel{i.i.d.}{\sim} \mathcal{N}(0, \hat{\sigma}^2)$;
7. lancer l'algorithme d'estimation sur le jeu de données augmenté ;
8. stocker les valeurs des paramètres obtenus ainsi que leur écart-type (fournis par la fonction `srivc`) ;
9. passer à la prochaine valeur de t_{0_2} et retourner à l'étape 6.

Puisque cet algorithme n'est pas basé sur une approche de Monte-Carlo pour le calcul des écarts-types, son exécution reste rapide ($t_{sim} \approx 25$ secondes pour 10 valeurs de t_{0_2} testées).

1.5.2 Résultats

Un exemple des coefficients de variation des paramètres estimés du modèle sont présentés à la Figure 1.8.

Les courbes montrent que pour une valeur de t_{0_2} supérieure à deux heures, les incertitudes sur les paramètres $\hat{k}_{hC}$ et $\hat{k}_{ure}$ sont significativement réduits, passant sous le seuil de 5 %. Les courbes correspondant aux autres rats sont similaire. Cela signifie qu'une deuxième session d'IRM après au moins deux heures pourrait permettre d'estimer la quantité de NP restant à l'intérieur de la tumeur avec une précision acceptable.

Notons cependant que plus la taille des données fictives (issues de l'interpolation) est grande par rapport aux données expérimentales, plus les résultats d'identification risquent d'être faussés. Une amélioration future pourrait être d'introduire une matrice de pondération dans le processus d'identification afin de donner plus d'importance aux données issues des expériences.

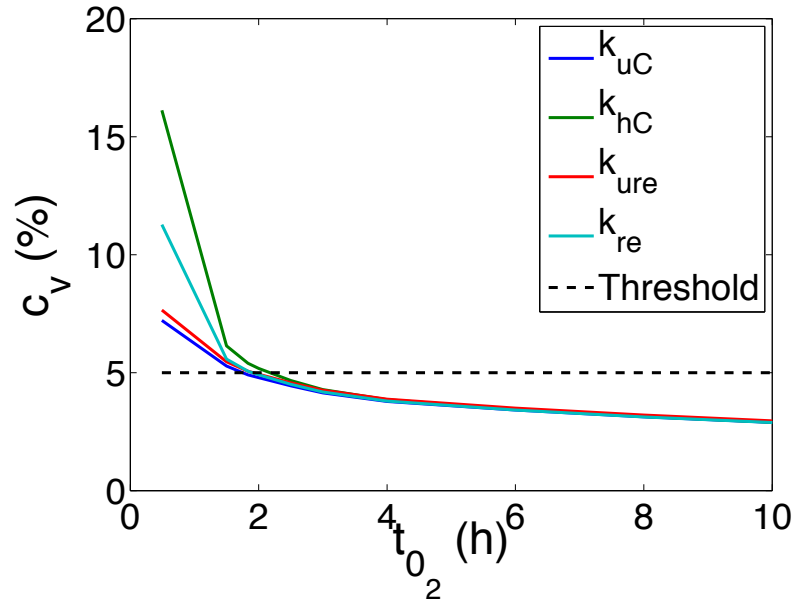


FIGURE 1.8 – Coefficients de variation des paramètres estimés pour différentes valeurs de t_{02} pour le Rat 1

1.6 Discussion

Les résultats d'estimation de la Section 1.4 montrent que les méthodes d'identification sont adaptées pour l'estimation de paramètres pharmacocinétiques à partir de données *in vivo*. Nous avons également observé que les méthodes à TC fournissent des résultats plus précis que celles à TD.

Puisque les paramètres estimés s'expriment en fonction des coefficients pharmacocinétiques, ils peuvent être utilisés pour comparer l'incorporation et le relargage des nanoparticules par rapport à la tumeur. Par exemple, et comme montré à la Figure 1.9, le paramètre $\hat{k}_{uC}$ est plus grand pour NP-PEP que pour NP-CONT, indiquant que les peptides ont un effet accélérateur sur l'incorporation des nanoparticules. De la même façon, lorsqu'on analyse les valeurs du gain statique ($\hat{k}_{hC}/\hat{k}_{re}$), on remarque qu'une quantité significative de NP n'est pas éliminée de la tumeur. Néanmoins il apparaît que cette quantité est réduite quand NP-CONT est utilisé (presque 50 % de moins comparé à NP-PEP). Ces observations confirment les conclusions de l'étude sur l'affinité moléculaire dans [116] ainsi que les hypothèses sur le pouvoir de fixation des peptides utilisés.

Si l'on considère $\hat{k}_{re}$, qui se rapporte à la cinétique d'élimination des NP, on remarque que sa valeur pour NP-CONT est plus petite, signe d'une clairance plus lente pour les nanoparticules sans peptides. L'hyperperméabilité du tissu tumoral est due à la fenestration anormale des capillaires tumoraux qui entraîne l'extravasation des NP vers les tissus. La faible clairance des nanoparticules dans l'espace interstitiel du tissu tumoral peut être expliqué par un drainage lymphatique inefficace. En comparaison avec les résultats obtenus après injection de NP-PEP, il s'avère qu'elles fournissent une augmentation de contraste plus sélective pour les cellules endothéliales angiogéniques qui tapissent les néovaisseaux principalement situés à la périphérie de la tumeur et qui surexpriment NRP-1.

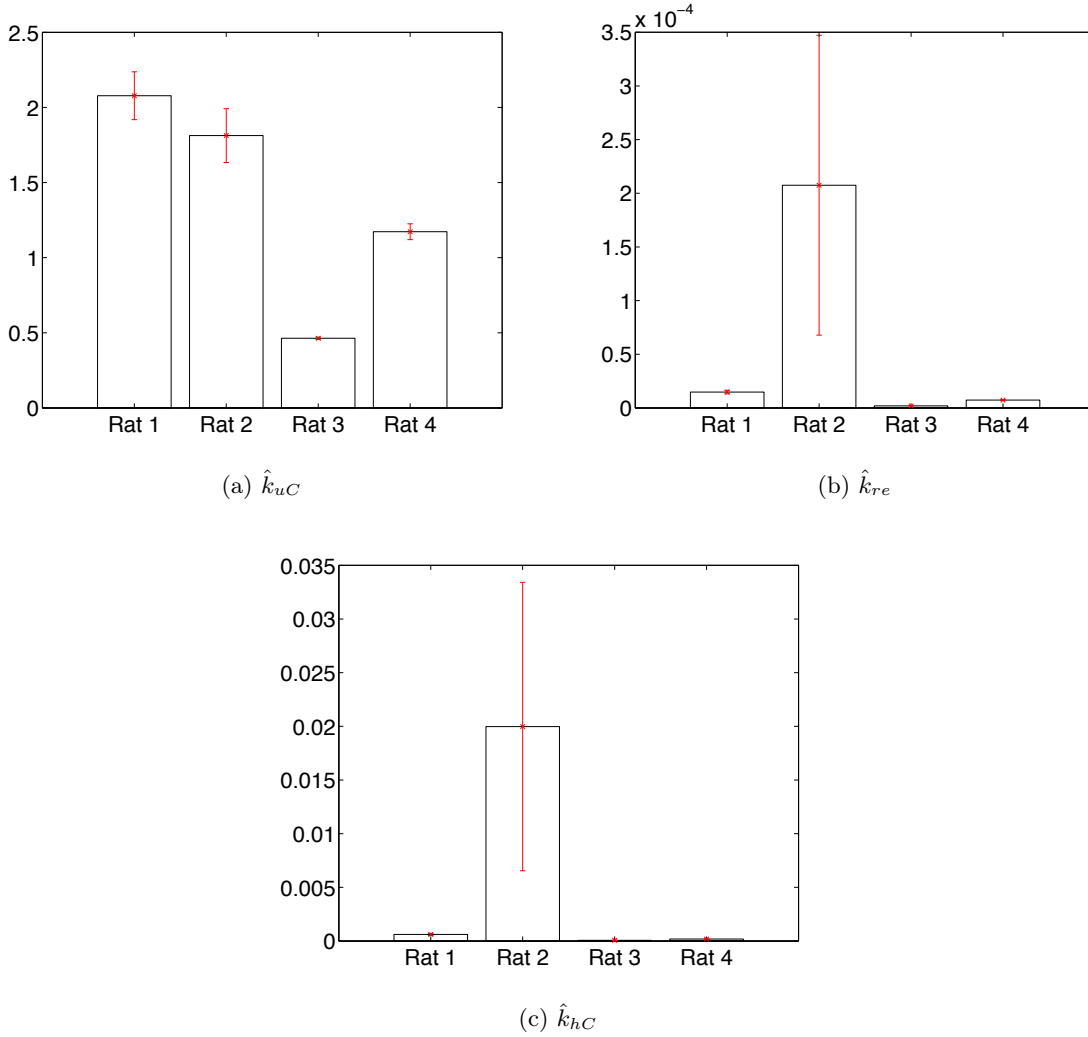


FIGURE 1.9 – Comparaison des moyennes des paramètres pharmacocinétiques ainsi que des écarts-types associés

1.7 Conclusions et perspectives

Cette étude présente une application prometteuse des méthodes d'identification directe à temps continu pour la caractérisation des pharmacocinétiques de nanoparticules. Le biologiste choisi un modèle à compartiment ainsi que les paramètres pharmacocinétiques qu'il désire comparer chez différentes nanoparticules.

L'approche proposée inclue le traitement d'image, de la planification d'expériences et de l'estimation de paramètres. Elle identifie directement le modèle à partir de données issues de séquences d'images IRM. La plupart des étapes composant cette méthode sont non-supervisées, une assistance a été ajoutée afin d'aider les biologistes à définir, *a posteriori*, le protocole d'expériences complémentaires dans le but d'améliorer la précision sur certains estimés.

Les résultats obtenus à partir de données *in vivo* ont confirmé l'intérêt de la méthode en pratique. Une telle solution pourrait être particulièrement adaptée aux études pharmacocinétiques de *screening in vivo*.

Finalement, d'autres expériences devraient être réalisées afin de valider la faisabilité de l'étude et de mieux comprendre la biodistribution des nanoparticules à l'intérieur de la tumeur.

Analyse de jonctions communicantes à partir d'images FRAP

Sommaire

2.1	Introduction	95
2.2	Expérimentation <i>in vitro</i>	97
2.2.1	Lignées cellulaires, culture monocouche et sphéroïde	97
2.2.2	<i>Gap-Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (Gap-FRAP)	97
2.3	Caractérisation du Gap-FRAP fondée sur l'analyse d'un modèle boîte noire	98
2.3.1	Traitement des données	98
2.3.2	Sélection de la structure de modèle	99
2.3.3	Estimation paramétrique	101
2.3.4	Résultats d'estimation	101
2.3.5	Tests d'hypothèses statistiques	101
2.4	Discussion	101
2.5	Conclusions et perspectives	104

2.1 Introduction

Développé dans les années 70, la technique du recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*, FRAP) est basée sur l'augmentation progressive de l'intensité de fluorescence dans une zone photoblanchie après illumination par une source LASER. Cette augmentation correspond à l'arrivée graduelle de molécules fluorescentes dans la zone ciblée [139]. Cette méthode, largement utilisée, est principalement dédiée à l'étude de la mobilité de constituants fluorescents (comme les protéines fluorescentes chimériques) dans la membrane cellulaire et le cytoplasme à une échelle microscopique [140]. Des méthodes exhaustives d'analyse du FRAP ont été présentées par Carrero *et al.* [141]. Des modèles à diffusion pour l'utilisation de microscope à fluorescence par balayage ou non ont déjà été proposés dans la littérature [142, 143] et des modèles à deux ou trois dimensions ont été développés pour des applications de microscopie confocale à balayage [144, 145].

Le Gap-FRAP élargit la technique du FRAP pour étudier la fonctionnalité des canaux de communication intercellulaire par jonction Gap (*Gap Junctional Intercellular Communication*,

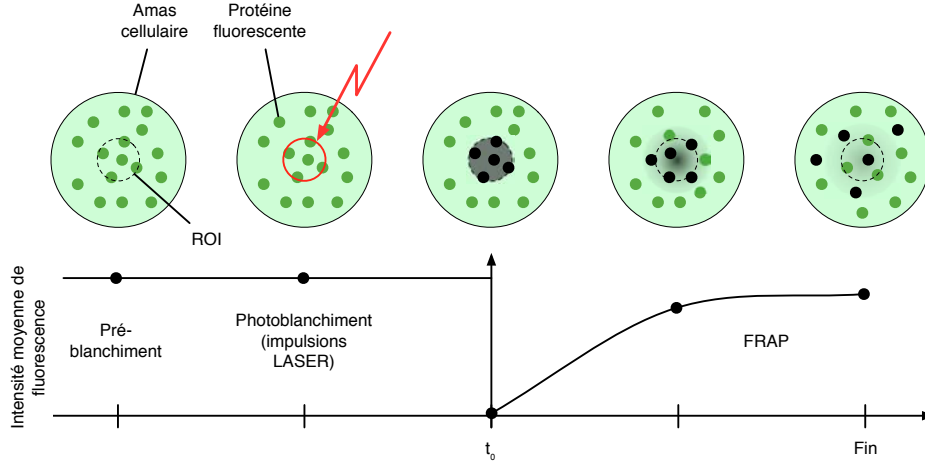


FIGURE 2.1 – Illustration du transfert de molécules fluorescentes par GJIC. (ROI : *Region of Interest*)

GJIC) dans un contexte *in vitro*, [146], d'après un protocole expérimental illustré à la Figure 2.1. Dans le cas du Gap-FRAP, la taille, les propriétés chimiques et biophysiques des molécules fluorescentes définissent la capacité de communication qui permettent de quantifier cette fonctionnalité. La plupart des cellules des organismes multicellulaires possèdent des GJIC. Il s'agit en fait de la forme la plus courante de contact entre le cytoplasme de cellules adjacentes. Chaque jonction Gap est constituée de douze sous-unités protéiniques appelées connexines (Cx). La famille des connexines est composée de 21 types de protéines classées suivant leur poids moléculaire [147]. On suppose que les GJIC ont une grande importance dans les phénomènes de régulation du développement, de différenciation et de croissance des cellules.

Jusqu'à maintenant, différents modèles mathématiques de FRAP ont été utilisés dans un large spectre d'études biologiques [141]. Ils sont quasiment tous basés sur différents type d'équations de réaction-diffusion [148–152]. La première question posée dans cette étude est de savoir si un système d'équations à dérivées partielles est la représentation la mieux adaptée pour une application dont l'objectif est de discriminer deux types de cellules grâce à leurs fonctionnalité GJIC.

Nous proposons d'évaluer l'efficacité d'une approche de modélisation concurrente basée sur les techniques d'identification directement appliquée à des données de Gap-FRAP. Cette approche expérimentale nous évite d'avoir à fixer des hypothèses dans le processus de modélisation physique du phénomène de FRAP. Puisque les techniques de modélisation basées sur les données n'ont jamais été appliquées à ce phénomène biologique, nous ne possédons pas d'information quant à leur capacité à décrire les réponses de Gap-FRAP. Nous ne savons également pas si les modèles comportementaux peuvent statistiquement discriminer les types de cellules pour une application potentielle de diagnostique. De plus, si nous imaginons concevoir un système de détection automatique, il est important de spécifier le protocole expérimental et de définir le mode de culture le plus approprié : modèle monocouche (2D) ou sphéroïde (3D). Dans cette optique, nous avons mené un ensemble d'expériences *in vitro* et appliqué les algorithmes de la boîte à outils CONTSID (pour Matlab) aux données expérimentales.

Deux lignées cellulaires de carcinomes humains (tête et cou) ont été utilisés. La première (KB) exprime les connexines (lignée positive) alors que la deuxième (FaDu) ne les exprime pas (lignée négative). De plus, chaque lignée a été testée en culture *in vitro* monocouche et sphéroïde. Chaque

combinaison a été répétée six fois. Dans la partie modélisation expérimentale, une fonction de transfert à temps continu est définie, par la suite les paramètres estimés sont analysés pour répondre à nos questions.

2.2 Expérimentation *in vitro*

2.2.1 Lignées cellulaires, culture monocouche et sphéroïde

Le matériel nécessaire aux cultures cellulaires a été acheté chez Costar (Dutscher, Brumath, France). Les milieux de culture ainsi que les additifs ont été obtenus chez Life Technologies (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France), sauf pour le sérum foetal de veau (FCS) prit chez Costar. La calcéine-AM a été obtenue chez Sigma (St. Quentin Fallavier, France). L'anti-Cx43 ainsi que l'anticorps polyclonal de lapin (71-0500) ont été fournis par les laboratoires Zymed (Clinisciences, Montrouge, France). Le sérum d'immunoglobuline chèvre anti lapin conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) a été acheté chez BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Tous les autres produits chimiques ont été achetés chez Sigma et sont de grade biologie moléculaire.

Les cellules de FaDu et KB, des carcinomes de la tête et du cou humains, ont été obtenus par le Professeur A. Hanauske par le biais du programme d'échange EORTC *Preclinical Therapeutic Models Group*. Les cellules cancéreuses se sont développées dans des flacons de culture tissulaires de 75 cm² avec un complément de RPMI 1640 avec 9 % de FCS, 1 % de Glutamine et 1 % de pénicilline/streptomycine dans une atmosphère maintenue à 37°C et 5 % de CO₂.

Les sphéroïdes (voir Figure 2.2) ont étéensemencées avec 5×10^4 cellules cancéreuses dans des flacons tissulaires de 75 cm² préalablement enduits avec de l'agarose à 1 %. Après trois jours, les agrégats ont été transférés dans des flacons spinner de 250 mL (Integra Biosciences, Cergy-Pontoise, France) contenant 100 mL de médium de culture. Les flacons ont ensuite été placés sur un plateau magnétique (Integra Biosciences, Cergy-Pontoise, France) réglé à 75 tours par minutes dans une atmosphère humidifiée à 37°C et 5 % de CO₂. Le médium de culture des sphéroïdes a été changé tout les deux jours. Lorsque les sphéroïdes ont atteints 500 µm de diamètre elles ont été utilisées pour les expériences.

2.2.2 Gap-Fluorescence Recovery After Photobleaching (Gap-FRAP)

Pour les cultures en monocouche, les lignées cellulaires ont été placées dans des plaques 8 puits à une concentration de 3×10^4 cellules/mL 72 heures avant de réaliser les expériences. Les cellules ont été maintenues 30 minutes à 37°C avec 0.5 µM de calcéine AM. Comme décrit par Wartenberg *et al.*, l'incorporation de la calcéine AM dans les sphéroïdes a été améliorée par une incubation froide [153]. Pour les sphéroïdes, les cultures ont été placées à 4°C pendant deux heures avec 0.5 µM de calcéine AM puis rincées et incubées à 37°C pendant 30 minutes. Les sphéroïdes ont été observées dans des plaques 4 puits. Le FRAP a été réalisé sur des régions d'intérêt de 50 µm de diamètre dans des zones confluentes pour les cultures 2D et sur des bords proliférants pour les sphéroïdes. Pour ce faire, un microscope confocal à balayage LASER constitué d'un microscope inversé équipé d'une source LASER argon émettant à 488 nm a été utilisé.

Le signal d'intensité de fluorescence a été mesuré entre 500 et 560 nm (par le biais d'un filtre passe-bande d'émission) avec un objectif 10X (0.3 NA à sec). La puissance de sortie du LASER a été ajustée pour une période de pré-blanchiment de 30 secondes puis répétée 15 fois afin d'obtenir un photoblanchiment suffisant pour pouvoir observer un recouvrement de la fluorescence sans pour autant causer de dommage visible. Les mesures de FRAP ont été réalisées pendant 900 secondes avec une prise d'images toutes les 15 secondes.

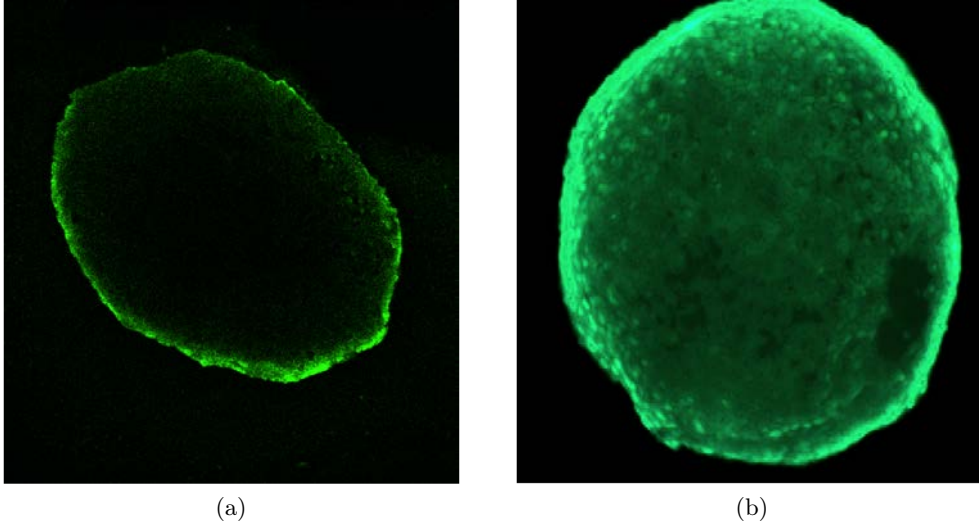


FIGURE 2.2 – (a) Image de fluorescence par microscopie confocale d'une section de sphéroïde (5 μm d'épaisseur) de cellules KB chargée avec 0.5 μM de calcéine AM et (b) observation macroscopique d'une sphéroïde entière de FaDu

2.3 Caractérisation du Gap-FRAP fondée sur l'analyse d'un modèle boîte noire

Dans ce paragraphe, une approche de modélisation basée sur les données du phénomène de Gap-FRAP est proposée. Elle comprend la planification d'expériences *in vitro*, le traitement d'images et de données, de la sélection de structure de modèle, de l'estimation de paramètres et pour finir une analyse statistique des résultats, comme décrit à la Figure 2.3.

2.3.1 Traitement des données

Comme montré à la Figure 2.4, la variable d'entrée $u(t)$ a été choisie comme étant un signal échelon déclenché par la fin de la phase de photoblanchiment (il s'agit d'un signal binaire complémentaire du signal LASER utilisé pour le photoblanchiment de la zone ROI). Elle décrit la période pendant laquelle le FRAP se produit, il s'agit d'une variable tout-ou-rien.

Pour chaque expérience, une zone de référence a été choisie en bordure du champs du microscope afin de prendre en compte la photodégradation induite par les acquisitions d'images successives ainsi que l'élimination naturelle du fluorophore. L'intensité de fluorescence moyenne est mesurée dans cette zone et est considérée comme le signal de référence $y_{REF}(t)$. Puisque cette zone référence n'est pas affectée par le blanchiment LASER, le rapport décrit par (2.1) nous permet de corriger le signal afin d'éliminer les changements parasites dans l'intensité de fluorescence, dus principalement au photoblanchiment induit par l'exposition du champs entier à la source lumineuse d'excitation, [154].

$$y(t) = \frac{y_{ROI}(t) - y_{ROI}(0^+)}{y_{REF}(t)} \quad (2.1)$$

où $y(t)$ correspond à la valeur moyenne et normalisée de l'intensité de fluorescence dans la région d'intérêt et $y_{ROI}(t)$ est l'intensité de fluorescence moyenne à l'intérieur du ROI. L'arguments 0^+ définit l'instant juste après la phase de photoblanchiment.

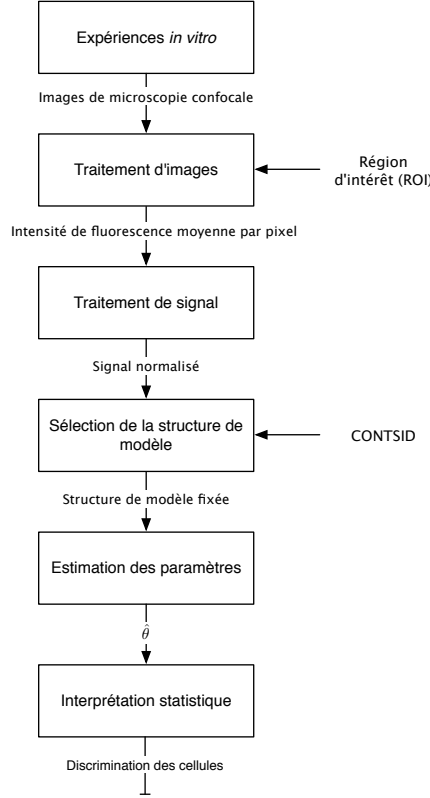


FIGURE 2.3 – Processus de discrimination, de l'expérimentation *in vitro* aux résultats finaux

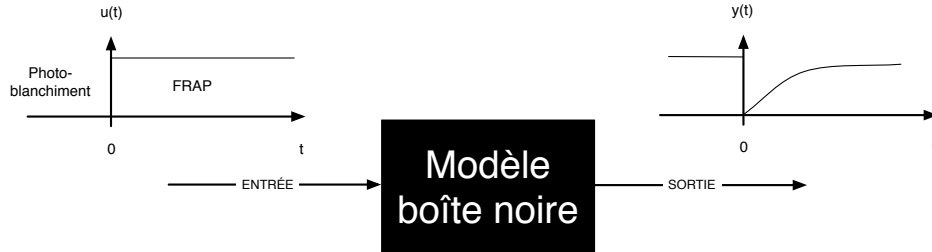


FIGURE 2.4 – Description entrée/sortie du phénomène de Gap-FRAP

2.3.2 Sélection de la structure de modèle

L'approche à temps continu (TC) a été choisie pour des raisons pratiques. En effet, avec un modèle à TC, les paramètres estimés sont indépendants de la période d'échantillonnage, la méthode est donc reproductible sur différents jeux de données et les estimés seront donc comparables. Comme dans l'application précédente, nous avons utilisé la méthode SRIVC pour identifier notre modèle comportemental.

L'algorithme SRIVC fournit des modèles à erreur de sortie (OE) qui sont en fait des fonctions de transfert. Les paramètres n_b et n_f définissent respectivement les ordres du numérateur et du dénominateur tels que :

$$y(t) = \frac{B(p)}{F(p)}u(t) \quad (2.2)$$

avec

$$B(p) = b_0 p^{n_b} + b_1 p^{n_b-1} + \dots + b_{n_b},$$

$$F(p) = p^{n_f} + f_1 p^{n_f-1} + \dots + f_{n_f}.$$

Nous supposons que le signal d'entrée $\{u(t), t_1 < t < t_N\}$ est appliqué au système et la sortie $y(t)$ est échantillonnée aux instants discrets $t_1, \dots, t_N$, ces instants ne sont pas nécessairement uniformes. Les signaux échantillonnés sont notés $\{u(t_k); y(t_k)\}$.

Afin d'obtenir des résultats d'estimation de qualité, il est vital d'également considérer l'inévitable erreur affectant le signal de sortie mesuré. Ainsi, $y(t_k)$ est supposé corrompu par un bruit de mesure discret et additif $e(t_k)$:

$$y_m(t_k) = y(t_k) + e(t_k). \quad (2.3)$$

La boîte à outil CONTSID propose une fonction (`srivcstruc`) qui aide à identifier une structure de modèle la plus parcimonieuse (optimiser l'adéquation aux données en minimisant le nombre de paramètres). Nous avons exécuté cet algorithme sur chaque jeux de données, laissant ainsi la fonction nous retourner la valeur des ordres du dénominateur adaptée à nos exigences (ordres compris en 1 et 5). Le critère à minimiser et utilisé pour trouver la meilleure structure de modèle était le critère d'information de Young (*Young's Information Criterion*, YIC) [155], qui se trouve être, grâce à la façon dont il est calculé, le meilleur critère pour une identification par SRIVC (*i.e.* : il prend en compte la capacité du modèle à reproduire les données ainsi que la pertinence de ses paramètres). Une partie des résultats est présentée dans le tableau 2.1.

TABLE 2.1 – Un exemple de sélection de structure suivant le critère d'information de Young (YIC)

Culture	KB			FaDu		
	n_b	n_f	YIC	n_b	n_f	YIC
Mono.	0	1	-8.9	0	1	-4.5
	0	2	-4.1	0	2	-5.3
	0	3	-8.5	0	3	-7.2
	0	4	-0.4	0	4	-11.2
	0	5	-3.1	0	5	-11.1
Sphéro.	0	1	-8.8	0	1	-2.8
	0	2	-3.8	0	2	-1.4
	0	3	-2.2	0	3	-0.5
	0	4	-1.5	0	5	3.0
	0	5	-0.9	0	4	12.2

Dans cet exemple, la structure choisie est celle pour laquelle le critère de Young est minimal (cellules du tableau colorées). Le même processus a été appliqué sur chaque jeu de données et dans la majorité des cas, un premier ordre a été déterminé comme optimal (*i.e.* $n_b = 0$ et $n_f = 1$). Notons qu'il arrive parfois que la structure de modèle préconisée, pour les données issues de FaDu, ne soit pas un premier ordre. En effet, le rapport signal-sur-bruit étant parfois trop faible sur ces jeux de données (FaDu étant la lignée contrôle qui n'exprime pas de connexines, *i.e.* signal de FRAP très faible), l'algorithme de sélection devient alors moins efficace. Dans ces

cas particuliers et puisqu'ils sont minoritaires, une structure de modèle du premier ordre a tout de même été choisie, favorisant ainsi la contrainte de parcimonie.

2.3.3 Estimation paramétrique

À partir de la structure de modèle sélectionnée précédemment, la fonction de transfert à TC est un modèle OE de la forme :

$$\begin{cases} y(t) = \frac{b_0}{p+f_1}u(t) = \frac{k}{T^{p+1}}u(t) \\ y_m(t_k) = y(t_k) + e(t_k) \end{cases} \quad (2.4)$$

où $y_m(t_k)$ est l'intensité de fluorescence moyenne mesurée qui est supposée corrompue par une séquence discrète et blanche $e(t_k)$, de moyenne nulle et de variance σ^2 . $y(t_k)$ correspond aux valeurs de $y(t)$ aux instants t_k . $k = \frac{b_0}{f_1}$ est le gain statique de la fonction de transfert, $T = \frac{1}{f_1}$ en est sa constante de temps et p est l'opérateur différentiel tel que $p^n \cdot x(t) = \frac{d^n x(t)}{dt^n}$.

2.3.4 Résultats d'estimation

Le modèle paramétrique, décrit par (2.4), a été implémenté dans Matlab. Les signaux normalisés présentés par (2.1) ont été utilisés pour identifier ce modèle. La méthode d'identification choisie était basée sur la méthode de la variable instrumentale raffinée et simplifiée à temps continu (SRIVC) [156] disponible dans la boîte à outil CONTSID pour Matlab.

L'algorithme retourne deux paramètres pour chaque jeu de données dont les résultats sont présentés dans le tableau 2.3 ainsi qu'à la Figure 2.6. Il estime également la matrice de covariance des paramètres. Cette matrice peut permettre de définir les écarts-types de chaque paramètre si les hypothèses de blancheur sur les résidus sont vérifiées, [91]. C'est le cas dans cette étude (le même test qu'au chapitre précédent a été réalisé, et un exemple des résultats est présenté à la Figure 2.5). Ainsi les écarts-types σ_θ , présentés au tableau 2.3, proviennent directement de cette matrice de covariance.

Un exemple de sorties simulées est présenté à la Figure 2.7.

2.3.5 Tests d'hypothèses statistiques

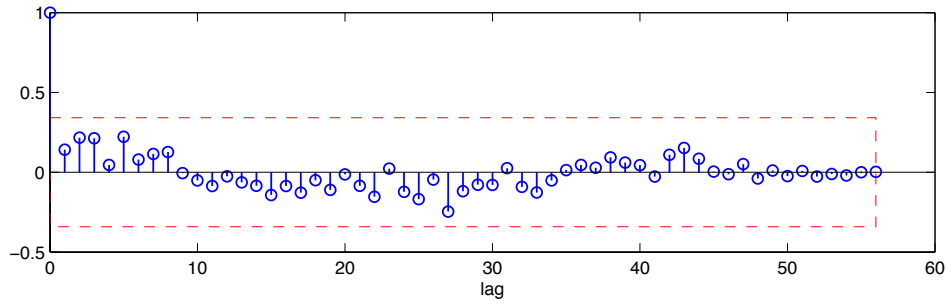
Afin d'évaluer les différences statistiques entre KB et FaDu en culture monocouche ou sphéroïde, un test de Student²¹ a été réalisé sur les moyennes des paramètres estimés. Les résultats correspondants aux hypothèses suivantes sont présentés dans le tableau 2.2 :

- H_{0_1} : il n'y a pas de différence statistique entre les estimés provenant d'expériences en monocouche et en sphéroïde ;
- H_{0_2} : il n'y a pas de différence statistique entre les estimés provenant d'expériences sur FaDu et KB en monocouche ;
- H_{0_3} : il n'y a pas de différence statistique entre les estimés provenant d'expériences sur FaDu et KB en sphéroïde.

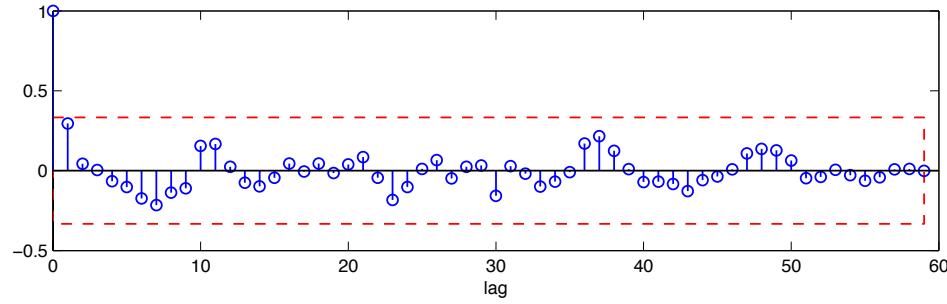
2.4 Discussion

Les tableaux 2.2 et 2.3 confirment l'expression de connexines (responsables du phénomène de GJIC) dans les cellules KB. En effet, le gain static k est plus grand pour KB que pour les cellules

21. Le test de Student est un test paramétrique qui permet, entre autres choses, de comparer les moyennes de deux échantillons statistiques (on parle alors de test de conformité).



(a) KB



(b) FaDu

FIGURE 2.5 – Exemple de résultat du test de blancheur : (a) la fonction d'autocorrelation à l'intérieur d'un intervalle de confiance à 99 % pour KB et en (b) celle pour FaDu

TABLE 2.2 – Test de student sur les paramètres estimés

Hypothèses nulles	Résultats du test	p-valeurs
H_{0_1}	Ne peut être rejetée	0.42
H_{0_2}	Rejetée	0.006
H_{0_3}	Rejetée	0.005

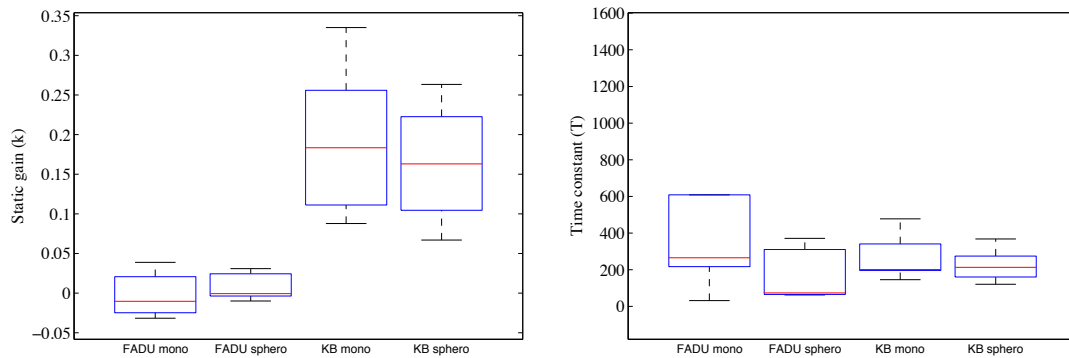


FIGURE 2.6 – Distribution statistique des estimés

TABLE 2.3 – Estimés et leurs incertitudes

Culture	Exp.	KB					
		$\hat{b}_0$	σ_{b_0}	$CV_{b_0}(\%)$	$\hat{f}_1$	σ_{f_1}	$CV_{f_1}(\%)$
Mono.	1	5.7×10^{-4}	2.3×10^{-5}	3.9	2.1×10^{-3}	1.6×10^{-4}	7.7
	2	6.0×10^{-4}	3.8×10^{-5}	6.3	6.9×10^{-3}	5.1×10^{-4}	7.4
	3	1.3×10^{-3}	9.2×10^{-5}	6.8	4.0×10^{-3}	3.8×10^{-4}	9.4
	4	9.1×10^{-4}	4.1×10^{-5}	4.6	5.0×10^{-3}	2.9×10^{-4}	5.8
	5	5.1×10^{-4}	2.8×10^{-5}	5.4	5.1×10^{-3}	3.5×10^{-4}	6.8
	6	5.4×10^{-4}	2.5×10^{-5}	4.5	2.7×10^{-3}	2.0×10^{-4}	7.6
	7	7.3×10^{-4}	4.1×10^{-5}	5.6	5.1×10^{-3}	3.6×10^{-4}	7.2
Sphéro.	1	1.1×10^{-3}	4.7×10^{-5}	4.4	4.8×10^{-3}	2.7×10^{-4}	5.7
	2	6.2×10^{-4}	3.0×10^{-5}	4.8	4.6×10^{-3}	2.9×10^{-4}	6.3
	3	5.2×10^{-4}	1.6×10^{-5}	3.0	2.7×10^{-3}	1.4×10^{-4}	5.0
	4	9.6×10^{-4}	4.5×10^{-5}	4.7	3.6×10^{-3}	2.5×10^{-4}	6.8
	5	6.5×10^{-4}	4.1×10^{-5}	6.4	6.2×10^{-3}	4.7×10^{-4}	7.6
	6	5.5×10^{-4}	5.2×10^{-5}	9.3	8.3×10^{-3}	8.7×10^{-4}	10.5

Culture	Exp.	FaDu					
		$\hat{b}_0$	σ_{b_0}	$CV_{b_0}(\%)$	$\hat{f}_1$	σ_{f_1}	$CV_{f_1}(\%)$
Mono.	1	-1.3×10^{-3}	4.3×10^{-4}	42.7	3.2×10^{-2}	1.4×10^{-2}	43.7
	2	-5.2×10^{-3}	2.3×10^{-5}	44.7	3.5×10^{-3}	2.3×10^{-3}	64.9
	3	-1.1×10^{-4}	3.0×10^{-5}	25.9	4.6×10^{-3}	1.6×10^{-3}	33.7
	4	2.5×10^{-5}	1.2×10^{-5}	47.0	6.6×10^{-4}	1.5×10^{-3}	230.5
	5	-2.4×10^{-5}	2.9×10^{-5}	120.2	4.0×10^{-3}	6.7×10^{-3}	164.7
	6	3.4×10^{-5}	4.3×10^{-5}	125.7	1.6×10^{-3}	4.8×10^{-3}	290.7
Sphéro.	1	3.5×10^{-4}	1.2×10^{-4}	34.5	1.6×10^{-2}	5.8×10^{-3}	36.4
	2	8.3×10^{-5}	2.3×10^{-5}	27.5	2.7×10^{-3}	1.2×10^{-3}	45.9
	3	-3.4×10^{-5}	1.1×10^{-4}	317.6	3.4×10^{-3}	1.6×10^{-2}	467.0
	4	-8.5×10^{-6}	4.3×10^{-4}	5.0×10^3	1.4×10^{-2}	5.2×10^{-1}	3.8×10^3
	5	-2.5×10^{-5}	1.3×10^{-4}	499.7	1.5×10^{-2}	7.9×10^{-2}	522.6

FaDu, indiquant un meilleur taux de recouvrement de fluorescence. Ces résultats montrent que KB possède une meilleure fonctionnalité liée aux jonctions Gap que FaDu. Cela étant, aucune différence significative ne semble être notable entre les cultures monocouches et sphéroïdes. En d'autres termes, cela tend à indiquer que les couches inférieures de cellules ajoutent une contribution négligeable au processus de recouvrement de fluorescence dans un modèle multicellulaire 3D comme la sphéroïde.

Le tracé de la distribution des estimés de la constante de temps montre un étalement plus prononcé pour FaDu (Figure 2.6), la valeur moyenne étant approximativement équivalente pour les deux lignées cellulaires. Cette incertitude peut être expliquée par le faible niveau du signal correspondant à la lignée FaDu et donc par un rapport signal à bruit faible.

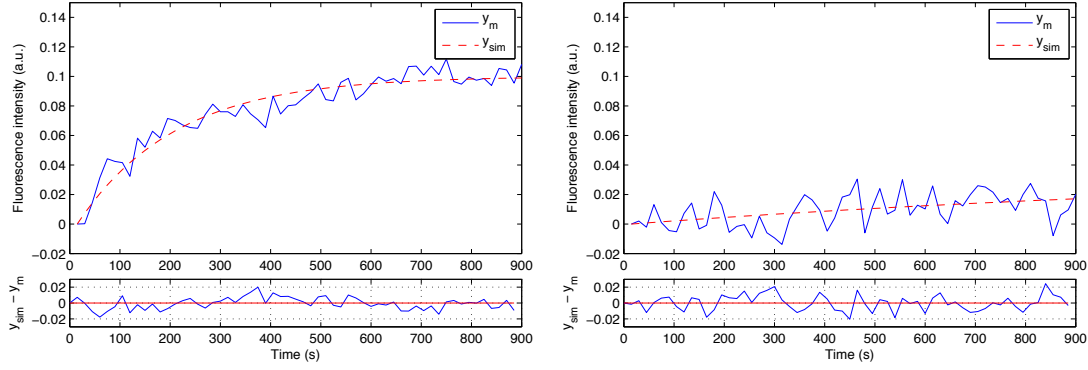


FIGURE 2.7 – Exemples de sorties simulées pour KB (à gauche) et FaDu (à droite), chacune accompagnée du tracé de leurs résidus

2.5 Conclusions et perspectives

L'objectif de cette étude était d'évaluer la capacité d'une nouvelle approche de modélisation pour détecter les différences de fonctionnalité des canaux de communication intercellulaire par jonction Gap de deux lignées de cellules cancéreuses. L'approche de modélisation boîte noire à temps continu proposée a prouvé son efficacité à fournir une structure de modèle simple de la dynamique de Gap-FRAP, avec seulement deux paramètres à estimer à partir de données *in vitro*.

Les résultats d'estimation montrent des différences significatives entre les gains statiques des fonctions de transfert pour les deux lignées testées. Le gain statique de la lignée KB est plus grand que pour la lignée FaDu, ce qui confirme le recouvrement de fluorescence plus important pour KB. Nous observons également que l'estimation de la constante de temps est beaucoup plus incertaine pour FaDu, et ce quelque soit le type de culture utilisé (2D *vs* 3D) pendant les expérimentations *in vitro*. Par conséquent, la culture en monocouche (2D) devrait être l'option la plus intéressante puisqu'elle simplifie considérablement le protocole expérimental.

En conclusion, cette étude illustre une nouvelle application des techniques d'identification dans le but de caractériser rapidement les performances de biomarqueurs de diagnostique. Il est également mis en avant, dans cette application au Gap-FRAP, la capacité des modèles comportementaux à fournir des résultats équivalents aux techniques courantes basées sur des modèles physiques plus complexes.

Par conséquent, en accord avec le principe de parcimonie, une approche d'identification de systèmes devrait être préférée pour ce genre d'application puisqu'elle requiert moins d'hypothèses. De futures expériences devraient montrer si oui ou non cette approche basée sur un modèle est toujours valide pour discriminer les cellules saines et cancéreuses dans un contexte *in vivo*.

Premiers travaux sur la modélisation du phénomène d'angiogénèse tumorale

Sommaire

3.1	Introduction	105
3.2	Méthode d'étude <i>in vivo</i> de l'angiogénèse	106
3.2.1	Expérimentation	107
3.3	Traitement des images	108
3.3.1	Segmentation	108
3.3.2	Grandeurs observées	111
3.4	Modélisation du phénomène d'angiogénèse	111
3.5	Perspectives d'identification	113

3.1 Introduction

L'angiogénèse est un phénomène normal et nécessaire qui intervient à de nombreux niveaux au cours du cycle de la vie. Il est notamment impliqué dans le développement des tissus ou encore lors de la cicatrisation. Ce phénomène consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'autres préexistants. Cependant, il est également impliqué dans le développement cancéreux des tumeurs. En effet, lorsqu'une tumeur se déclare, si sa taille ne dépasse pas 2 à 3 mm², elle peut se nourrir en nutriments et en oxygène par simple diffusion. Au-delà de 3 mm² environ, pour poursuivre leur croissance, les cellules tumorales expriment des facteurs pro-angiogéniques destinés à stimuler l'angiogénèse au bénéfice de la tumeur comme le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins sains adjacents en état quiescent (pas de division ni de migration) sortent de cet état lorsqu'elles sont stimulées par VEGF. Ceci conduit à une cascade de réactions ayant pour conséquence la formation d'un nouveau vaisseau sanguin en direction de l'origine du signal angiogénique. Les vaisseaux sanguins tumoraux formés sont d'architecture aberrante, non stabilisés, perméables et tortueux. De plus, l'irrigation de la tumeur n'est pas optimale, ce qui crée, entre autres, des zones d'hypoxie induisant une stimulation continue de l'angiogénèse. Le fait que le réseau vasculaire tumoral soit aberrant peut conférer à la tumeur une capacité de résistance aux traitements de chimiothérapie et de radiothérapie. En effet, l'absence d'une vascularisation optimale pourrait empêcher la délivrance des médicaments à la tumeur, [157].

Par ailleurs il a été démontré que la croissance tumorale était directement liée au développement néovasculaire, [158], et il a donc été conclu que l'inhibition de l'angiogenèse serait une stratégie efficace pour aider au traitement des cancers, [159].

Notons qu'outre les thérapies anti-angiogéniques, les thérapies anti-cancéreuses, en règle générale, ont également une action sur ce réseau vasculaire et sur son remodelage. L'objectif à long terme de ces thérapies serait d'induire une régression et une destruction du réseau et par conséquent d'affamer la tumeur jusqu'à sa destruction complète. C'est d'ailleurs dans cette direction que des progrès importants ont été fait ces dernières années, [160].

Cependant la mise au point d'une thérapeutique anti-cancéreuse efficace basée sur les thérapies anti-angiogéniques nécessite toujours de répondre à de nombreuses questions. La première question indispensable qui fait l'objet de ce projet est de définir l'efficacité réelle des agents anti-angiogéniques et des conséquences sur la croissance tumorale. D'autres questions fondamentales dans le développement préclinique d'une molécule anti-cancéreuse peuvent alors être soulevées :

- comment peut-on obtenir les combinaisons thérapeutiques les plus efficaces en associant des agents anti-angiogéniques, cytotoxiques (chimiothérapie), des thérapies par rayonnement (radiothérapie ou thérapie photodynamique), et/ou d'autres agents thérapeutiques (thérapies ciblées) ?
- comment sélectionner les tumeurs susceptibles de répondre le plus efficacement aux protocoles thérapeutiques ?

Partant de ces interrogations, la caractérisation des effets morphologiques, mais surtout fonctionnels, induits sur le réseau vasculaire par des traitements anti-angiogéniques s'affiche comme incontournable pour l'optimisation, l'identification et la prédiction de la réponse vasculaire et de ses conséquences sur la croissance tumorale.

Dans cette optique, un protocole expérimental a été mis en place permettant d'observer le développement du réseau sanguin tumoral jour après jour chez la souris, grâce à l'implantation d'une fenêtre dorsale. Un traitement par agent anti-angiogénique est ensuite administré aux souris. Des séquences d'images macroscopiques sont réalisées et traitées numériquement afin d'extraire des grandeurs représentatives de l'évolution de la vascularisation tumorale. Les signaux extraits, devraient par la suite permettre d'identifier un modèle du phénomène angiogénique tumoral ainsi que les effets du bevacizumab (molécule anti-angiogénique de référence pour cette étude) sur celui-ci.

3.2 Méthode d'étude *in vivo* de l'angiogenèse

L'évaluation *in vivo* est une étape incontournable pour la compréhension du processus angiogénique et des réponses à différentes thérapies. L'imagerie de l'angiogenèse tumorale *in vivo* dans un modèle de chambre dorsale de visualisation chez la souris *nude* adulte permet de visualiser la formation et le remodelage de vaisseaux sanguins dans une tumeur. Il permet également de déterminer si les vaisseaux sanguins nouvellement formés dans cette tumeur sont fonctionnels et s'ils peuvent contribuer à l'oxygénation des tissus [161].

Ce modèle de chambre dorsale se compose d'un système de deux plaques de titane se positionnant de part et d'autre d'un pli cutané formé par la peau du dos de la souris. Ce pli, ainsi pris en sandwich entre les deux plaques, y est maintenu immobile. Ces plaques possèdent chacune une ouverture centrale circulaire, d'un diamètre de 10 mm laissant apparaître chaque pan du pli cutané. En face de l'une des deux ouvertures, la peau d'un seul pan du pli est disséquée et ôtée, puis l'ouverture de la plaque est recouverte hermétiquement d'une lamelle de verre laissant la possibilité de visualiser en dessous les vaisseaux sanguins de l'autre pan du pli

cutané. Dans la chambre de visualisation ainsi créée, il est possible après avoir retiré la lamelle de verre, d'implanter des cellules tumorales ou des greffes de tumeur.

Le principal avantage de ce modèle est que ces chambres permettent des observations répétées (quotidiennes) du réseau vasculaire et de la tumeur par microscopie intravitale *in vivo* sur une période de 4-5 semaines, [162]. Cette méthode est illustrée à la Figure 3.1.



FIGURE 3.1 – Chambre dorsale posée sur une souris *nude*

3.2.1 Expérimentation

Les protocoles expérimentaux mis en œuvre ont été choisis et adaptés de telle sorte que les souffrances et l'inconfort de l'animal soient minimisés. Les tumeurs utilisées étant des tumeurs humaines (modèle de glioblastome U87), nous travaillons avec des souris immunodéprimées afin de limiter le rejet de greffe. Les expérimentations sont effectuées sur des souris *nude* (nu/nu) femelles âgées de 6 à 12 semaines pesant de 25 à 30 g et provenant de l'Élevage Janvier, Le Genest St Isle, France.

Après anesthésie réalisée avec un mélange composé de Xylazine (Rompun 2 %, Bayer Health Care, Puteaux, France) et de Kétamine (Imalgène 500, Merial, Lyon, France), le fragment tumoral est déposé directement sur le réseau vasculaire visualisé dans l'ouverture de la chambre dorsale un à deux jours après sa pose, ce, pour chaque souris.

Les prises de vue sont faites 3 à 6 fois par semaine. La souris est anesthésiée puis déposée sur la plate-forme d'observation du microscope Nikon AZ100 (Nikon, Champigny sur Marne, France). A chaque visualisation du réseau vasculaire des images sont acquises. L'évolution du réseau vasculaire est suivie pendant 35 jours maximum, J_0 étant le jour de la pose des fragments tumoraux. Le réseau vasculaire est observé en lumière transmise avec le filtre FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) qui permet d'augmenter le contraste entre les vaisseaux et la peau. La profondeur de champ observée avec le microscope étant faible du fait de l'épaisseur de la tumeur, seuls les vaisseaux superficiels de la tumeur sont visualisés. Lorsque le réseau vasculaire tumoral est complet, c'est-à-dire que toute la partie visible de la tumeur est vascularisée, les souris sont divisées en deux lots : un lot traité et un lot contrôle. Le lot traité est injecté quotidiennement avec du bevacizumab (Avastin, 10 mg/kg) par voie intra-péritonéale. Les prises de vue se poursuivent sur les deux lots jusqu'à J_{35} . Le déroulement de l'expérience est schématisé à la Figure 3.2.

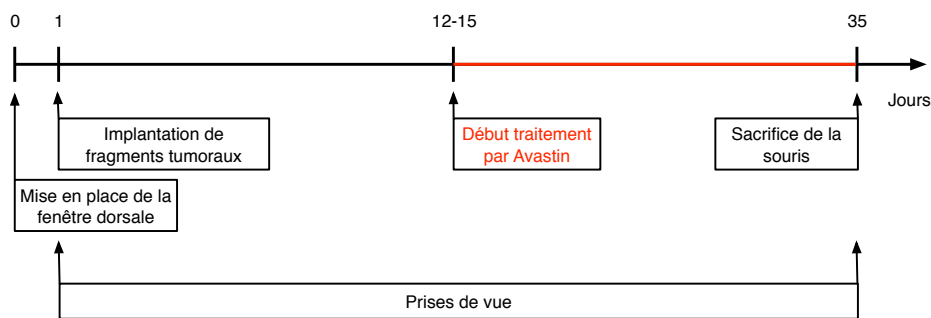


FIGURE 3.2 – Déroulement des expérimentations *in vivo*

3.3 Traitement des images

D'un point de vue biologique, il est admis qu'un réseau vasculaire peut être caractérisé par des attributs comme la longueur entre ses ramifications, la qualité de l'irrigation, la densité cellulaire. Il y a cependant un manque de connaissance en ce qui concerne les caractéristiques permettant une bonne compréhension de l'évolution réseau vasculaire tumoral, [163]. Cette connaissance est importante pour juger de l'efficacité d'agents anti-angiogéniques. Idéalement, l'analyse de l'angiogénèse doit être robuste, reproductible et le plus possible automatisée. Les paramètres de caractérisation et d'évaluation doivent être multiples et directement reliés aux résultats observables en situation préclinique et clinique [164]. Afin de garantir ces contraintes une segmentation automatique des images devient nécessaire si l'on souhaite rechercher des grandeurs globales et locales exploitables du réseau vasculaire et de la tumeur à partir des séquences d'images.

L'implémentation d'une méthode de segmentation automatique présente donc plusieurs avantages :

- des mesures plus fiables (les résultats sont quantitatifs avec des incertitudes acceptables) ;
- une reproductibilité améliorée comparée à des mesures à l'œil nu ;
- le traitement de grands lots d'images en un temps réduit ;
- l'accès à des grandeurs physiques rarement exploitées car compliquées à extraire manuellement.

3.3.1 Segmentation

Régions d'intérêt

Techniquement, il est difficile de détecter informatiquement une structure peu discernable à l'œil nu. Comme montré à la Figure 3.3, les contours de la tumeur sont très diffus (manque de contraste). Par conséquent, pour notre étude exploratoire actuelle, seule une segmentation manuelle des tumeurs a été réalisée par les experts biologistes afin de définir les régions d'intérêt (ROI). Dans une prochaine optique d'automatisation complète du procédé, une étape de classification (par exemple) pourrait être intégrée afin de discerner la tumeur du tissu sain adjacent.

Réseau vasculaire

À l'intérieur des ROI définis précédemment il a fallu définir, pour chaque pixel, son appartenance soit à un vaisseau, soit au tissu tumoral. Compte tenu du type de structures recherchées

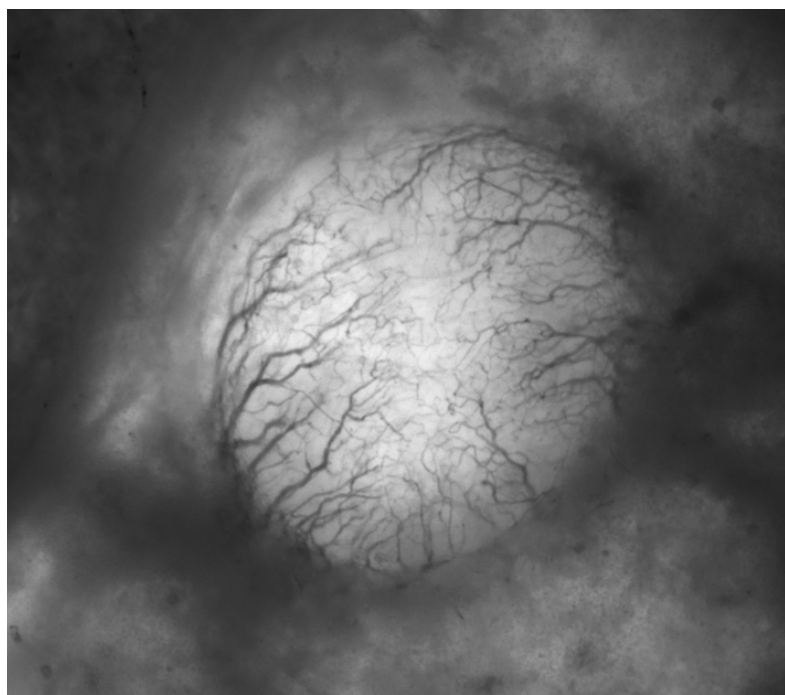


FIGURE 3.3 – Exemple d’observation macroscopique à travers la fenêtre dorsale. On y distingue la tumeur plus claire au centre ainsi que le réseau vasculaire qui la parcourt

(filaires et très contrastées par rapport au fond de l’image, *i.e.* de fréquence plus élevée), la première étape choisie a été de détecter le *background* (tissu tumoral) et de le soustraire ensuite à l’image. Deux filtres de Savitzky-Golay d’ordre 1 (un horizontal, l’autre vertical) ont été utilisés dans ce but. Le but de ce filtre est de trouver, à travers une fenêtre glissante paramétrable, un polynôme d’ordre 1 qui interpole au mieux les données (ce, au sens des moindres carrés), ici les lignes et les colonnes des images. L’image représentant le *background* est définie comme étant le maximum des deux sorties du filtre (horizontale et verticale). Une partie d’une ligne d’une image est présentée à la Figure 3.4 afin d’illustrer le résultat obtenu.

Le *background* est ensuite soustrait à la région d’intérêt d’origine afin de n’obtenir que les vaisseaux sanguins. Un calibrage des structures restantes est ensuite pratiqué afin de ne garder que les formes ressemblant à des lignes, c’est-à-dire qui possèdent :

- un nombre minimum de pixels consécutifs par ligne et par colonne ;
- une intensité minimum ;
- une taille, toutes directions confondues, minimale.

Ces paramètres ont été choisis de manière empirique et dépendent de la taille des éléments recherchés. Ils ont été testés sur une première séquence d’images avant d’être validés sur une seconde. Un exemple de segmentation finale est présenté à la Figure 3.5.

Squelettisation

L’étape de squelettisation permet de simplifier l’image afin de faciliter l’application d’algorithmes de détection et de quantification. Il s’agit d’affiner toutes les structures (vaisseaux sanguins) jusqu’à l’obtention de lignes de largeur unitaire. La fonction `bwmorph`, issue de la boîte à outil pour Matlab *Image Processing*, a été utilisée et un exemple de résultat obtenu est présenté à la Figure 3.6. L’image ainsi squelettisée peut ensuite être utilisée pour avoir accès à différentes

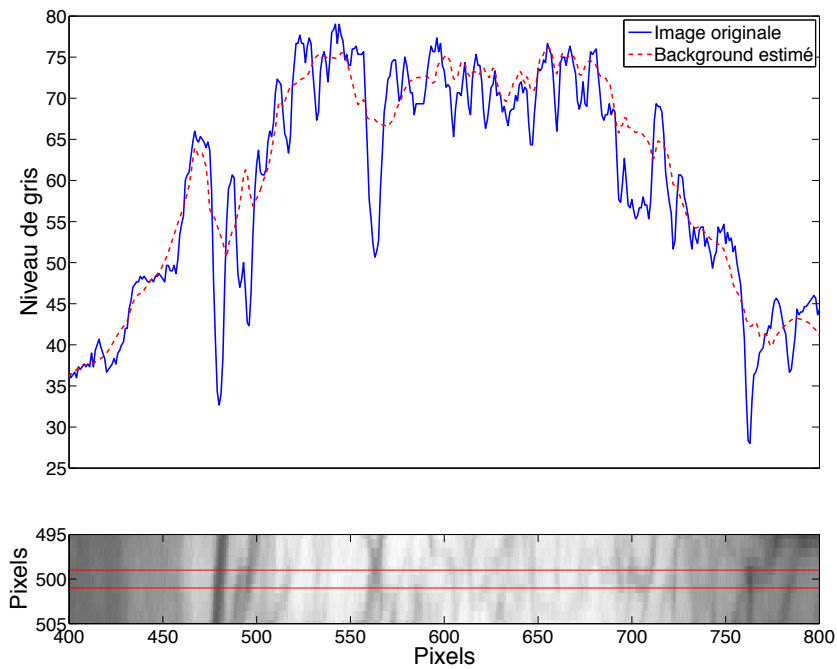


FIGURE 3.4 – Exemple d'application du filtre de Savitzky-Golay sur la 500^{ème} ligne d'une image



FIGURE 3.5 – Résultat de la segmentation avec en blanc les vaisseaux sanguins détectés dans la tumeur (région d'intérêt)

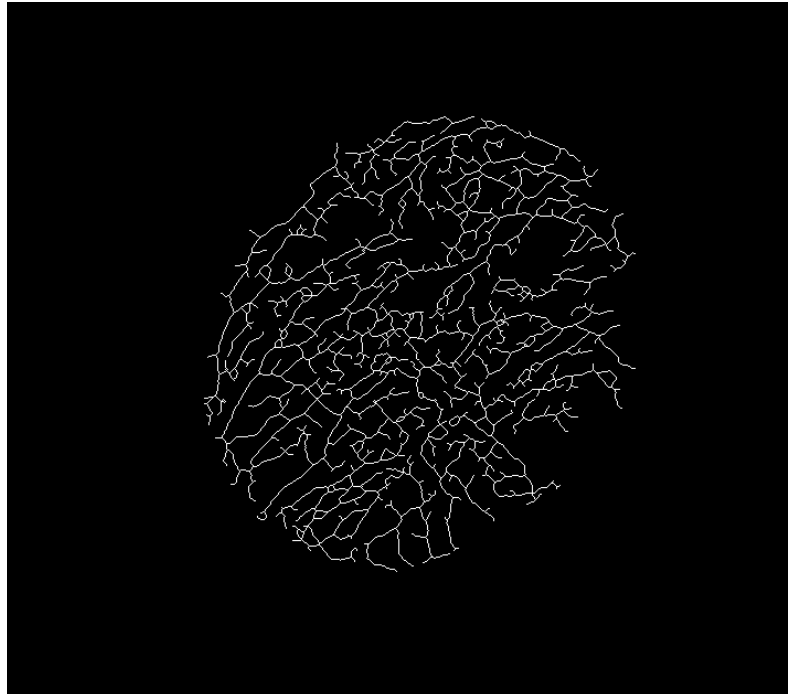


FIGURE 3.6 – Résultat de la squelettisation

grandeurs supposées représentatives de l'activité angiogénique au sein d'une tumeur.

3.3.2 Grandeurs observées

L'accès à des grandeurs caractéristiques de l'évolution du réseau vasculaire tumoral est la clé qui permettra d'identifier un modèle du phénomène d'angiogenèse. Ces grandeurs, ou signaux, doivent être mesurables à partir de séquences d'images 2D issues d'expérimentations *in vivo*, définissant ainsi leur caractère dynamique et biologiquement pertinents. La segmentation automatique de ces séquences d'images nous permet d'observer plusieurs choses au cours du temps :

- la surface occupée par la tumeur ;
- la surface des cellules endothéliales (vaisseaux sanguins) ;
- la densité vasculaire (rapport entre les surfaces de tumeur et des vaisseaux) ;
- le nombre d'embranchements formés par les vaisseaux ;
- leur nombre de bourgeons (vaisseaux de petite longueur nouvellement créés) ;
- la longueur totale du réseau ;
- *etc.*

La Figure 3.7 présente plusieurs grandeurs observables à partir des séquences d'images segmentées. Ces signaux dynamiques devront par la suite permettre de définir un modèle de l'angiogenèse et de la réponse vasculaire aux traitements anti-cancéreux.

3.4 Modélisation du phénomène d'angiogenèse

Une analyse bibliographique poussée a été réalisée au laboratoire sur 24 articles scientifiques de 1988 à 2012, [165]. Cette analyse, dont les résultats sont résumés à la table 3.1, montre clairement qu'il n'y a jamais eu de modélisation comportementale du phénomène d'angiogenèse.

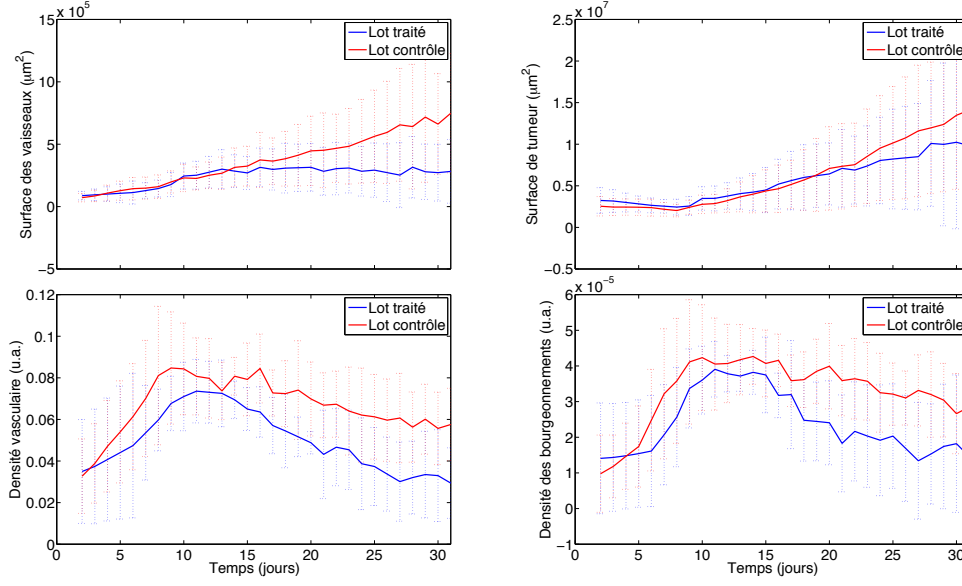


FIGURE 3.7 – Exemples de signaux moyens (ainsi que leurs écarts types) pouvant être extraits des séquences d'images (7 souris traitées, 9 souris contrôles)

Cette étude met également en exergue le manque de validation *in vivo* des modèles.

TABLE 3.1 – Classification des modèles d'angiogénèse de la littérature

Structure	Pourcentage	Validation	Pourcentage
Équations aux dérivées partielles	46 %	Aucune	71 %
Équations aux dérivées ordinaires	42 %	Qualitative	21 %
Autre	12 %	Quantitative	8 %

Les modèles d'angiogénèse existants sont pour la plupart basés sur des modèles théoriques et requièrent donc des données biologiques (*e.g.* le volume tumoral, le volume endothélial, *etc.*) qui sont souvent inaccessibles à partir des données d'imagerie, comme par exemple le modèle (3.1) issu de [166] :

$$\begin{cases} \dot{V}(t) &= -\lambda_1 V \ln\left(\frac{V}{K}\right) \\ \dot{K}(t) &= bV - dV^{2/3}K - eKg \\ g(t) &= \int_0^t c(t')e^{-\lambda_3(t-t')} dt' \end{cases} \quad (3.1)$$

où $V(t)$ est le volume de la tumeur, $K(t)$ le volume endothélial et $g(t)$ la concentration de la molécule thérapeutique.

Par conséquent, les modèles exacts issus de la littérature ne peuvent être utilisés puisque les données nécessaires à leur identification ne sont pas directement disponibles. Néanmoins, ils peuvent inspirer le choix d'une structure de modèle dans une démarche de type boîte grise. Ce genre de modèle aurait les mêmes capacités de prédiction mais serait construit à partir de données *in vivo* disponibles.

3.5 Perspectives d'identification

Dans le contexte décrit précédemment, le problème posé est celui de l'identification du comportement de cohortes d'individus (groupes de systèmes) à partir de plusieurs courtes séries (moins de 30 points) de données.

On peut imaginer sans originalité appliquer les techniques d'identification de systèmes aux données de chaque individus mais cette approche possède un ratio du nombre de paramètres à estimer sur le nombre de données mesurées qui n'est pas favorable à une précision acceptable sur les estimés.

Une approche alternative vise non pas à estimer les modèles individuels mais les ensembles de valeurs de paramètres pour lesquels les réponses des modèles appartiennent à des intervalles définis par l'utilisateur.

Dans [72], un modèle ensembliste obtenu grâce à des techniques d'analyse par intervalles fut appliqué à un problème de pharmacocinétique de médicament avec très peu de données (5 instants de mesure) et la présence d'incertitudes temporelles. Cette méthode a donné de bons résultats mais suppose la présence d'erreurs bornées sur les observations. Cette hypothèse est quasi-impossible à vérifier en pratique.

Plus récemment dans [167], nous avons utilisé une autre méthode d'estimation issue de la communauté statisticienne et appliquée aux systèmes dynamiques. Il s'agit de l'identification de modèles à effets mixtes.

Dans ce cas d'étude, notre projet est de tester une approche d'identification en deux étapes :

1. sélectionner une structure en utilisant des critères d'information comme AIC (*Akaike Information Criterion*), BIC (*Bayesian Information Criterion*) ou YIC (*Young's Information Criterion*) fournis par exemple par la boîte à outils CONTSID ;
2. estimer des paramètres du modèle à effets aléatoires suivant :

$$y_j(t_i) = \mathcal{M}(t_i, \theta_j, u) + e_j(t_i) \quad (3.2)$$

où $\mathcal{M}$ est la structure identifiée à l'étape 1, i est l'indice de l'instant d'observation, j est l'indice de l'individu (souris ici) dans la cohorte, $e_j(t_i) \sim \mathcal{N}(0, \sigma^2)$ est l'erreur aléatoire de sortie. Pour décrire la variabilité inter-individus, les paramètres individuels θ_j sont représentés par des effets aléatoires :

$$\theta_j = \lambda + \eta_i \quad (3.3)$$

où λ est un vecteur inconnu composé des valeurs moyennes de θ_j et $\eta_i \sim \mathcal{N}(0, \omega)$ représente la variation aléatoire entre les individus de la même cohorte. Le vecteur λ et la matrice de variance-covariance ω correspondent aux hyper-paramètres du modèle et ce sont eux que l'on cherche à estimer à partir des données de cohorte.

Dans un futur proche, nous souhaitons évaluer l'outil Monolix (une boîte à outil de Matlab, [168]) sur ce type de données pour prédire les réponses et si possible déterminer les doses de médicament permettant d'optimiser les réponses thérapeutiques.

Conclusion de la seconde partie

Cette partie est consacrée à la présentation de différents travaux de modélisation et d'identification de systèmes biologiques à partir de séquences d'images. Ils ont tous la particularité d'appliquer une démarche classique d'identification à temps continu dans le but de répondre, *in fine*, à une question d'ordre biologique. L'application de notre champs disciplinaire à ces interrogations a permis de fournir des réponses fiables par le biais de solutions reproductibles et justifiables.

Dans le premier cas d'étude nous avons fourni une solution d'analyse comparative fondée sur un modèle comportemental des caractéristiques pharmacocinétiques de nanoparticules dédiées au traitement des cancers. Les paramètres du modèle à temps continu sélectionné permettent d'analyser trois phénomènes : l'incorporation, l'élimination et le stockage résiduel. Une procédure fut également proposée pour économiser judicieusement le temps opératoire de l'imagerie IRM.

Pour le second cas, le modèle proposé montre un intérêt pratique pour répondre à une question finale liée au diagnostic de lignées cellulaires, comparativement à des modèles EDP traditionnellement utilisés mais plus difficiles à mettre en oeuvre.

Enfin, la troisième et dernière contribution résume les premiers travaux exploratoires sur ce que peuvent apporter les techniques d'identification à l'étude de la croissance tumorale, du développement angiogénique à leur interaction dynamique et de l'effet d'un traitement anti-cancers sur ceux-ci. Il est admis que certaines thérapies contre le cancer, et plus particulièrement celles dites anti-angiogéniques, ont un effet sur le réseau vasculaire tumoral et sur son remodelage, l'objectif final étant de réduire l'apport en nutriments dans la tumeur et donc de l'affamer. Cependant, l'efficacité réelle de ces thérapies anti-angiogéniques sur la croissance tumorale n'est pas vraiment définie. Les premiers travaux présentés dans cette thèse ouvrent donc la voie d'une étude qui devrait permettre de statuer sur leur pouvoir thérapeutique. Une étude bibliographique nous a permis de nous orienter vers la conception d'une structure de modèle à effets aléatoires à identifier à partir de l'ensemble des jeux de données.

Dans tous ces problèmes, le traitement d'images requis était exclusivement une application de segmentation. Selon les applications considérées, il peut être préférable de sous- ou surestimer l'efficacité de cette segmentation (présence de faux pixels positifs ou négatifs). La conséquence directe sur l'identification est la présence dans la partie stochastique du modèle d'une erreur aléatoire à moyenne non nulle, paramètre supplémentaire à intégrer dans la phase d'estimation. Cette amélioration pourra être appliquée dans les prochaines études.

Conclusions générales et perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent tous dans le cadre de la Biologie Intégrative où les techniques et méthodes d'identification de systèmes sont appliquées au domaine biologique pour caractériser, prédire et contrôler des phénomènes biologiques tous liés au cancer. Le travail de recherche réalisé est d'une part technologique (partie 1) et appliqué (partie 2).

Tout d'abord, la seconde partie de cette thèse s'intéresse au thème de l'identification de systèmes biologiques à partir de séquences d'images. Cette partie avait un double objectif :

- le développement de nouvelles applications en biologie des techniques d'identification de systèmes dynamiques ;
- l'investigation sur des problèmes spécifiques concernant le traitement d'images pour l'identification de systèmes.

Dans ce but, notre approche fut d'examiner ces deux questions au travers de trois applications concrètes à trois échelles différentes en biologie : l'analyse pharmacocinétique *in vivo* de nanoparticules, la caractérisation de la fonctionnalité de jonctions intercellulaires et la prédiction des effets anti-angiogéniques de traitements anti-cancéreux.

Dans les deux premiers cas, l'identification de systèmes par des méthodes d'estimation de paramètres dédiées aux modèles à temps continu ont donné des résultats encourageants, soulignant les avantages à intégrer ces approches dans les méthodes d'analyse pour les biologistes. Il reste cependant des progrès à faire en particulier en matière d'introduction de connaissances *a priori* sur les paramètres. En effet, une structure de modèle comportemental (boîte noire) permet d'appliquer un ensemble d'outils et de méthodes qui ont fait leurs preuves, et qui permettent un traitement standardisé. Cependant dans le cadre d'études biologiques, il est souvent nécessaire de partir d'un modèle de connaissance (modèle physique). De fait, l'identification de ces structures nécessite parfois de réaliser une représentation d'état, à partir de laquelle il convient généralement de repasser ensuite au modèle de connaissance après identification, afin de pouvoir interpréter les paramètres. Or, pour un même comportement il existe une infinité de réalisations possibles de la représentation d'état. Il est donc important de pouvoir retrouver un changement de base capable de nous ramener systématiquement à une réalisation physique connue. Une solution consiste à utiliser des formes d'état canoniques comme proposé dans [169]. En perspective, il serait intéressant d'évaluer la pertinence de ces solutions sur des problèmes biologiques réels.

Ces deux études ont fait l'objet de plusieurs communications scientifiques internationales [170–173], dont une revue en cours de révision, [174], ainsi que plusieurs participations aux manifestations des communautés d'automatique, d'identification et de biologie, [175–178].

Enfin, le dernier cas pose un problème qui reste à résoudre car il s'agit d'une question générique en biologie : celle de l'identification avec une précision acceptable de la prédiction des réponses thérapeutiques à partir de petits échantillons de données de cohortes (< 30 points de mesure). Une perspective envisagée serait l'utilisation de modèles à effets aléatoires pour réduire très sensiblement le ratio du nombre d'inconnues sur le nombre de données disponibles et ainsi

améliorer potentiellement la précision sur les résultats.

Pour finir, la principale contribution de cette thèse concerne le développement d'un dispositif innovant destiné à mieux contrôler l'efficacité et la reproductibilité des réponses de la thérapie photodynamique présenté dans la première partie. Cette recherche technologique a nécessité de vaincre plusieurs verrous, dont principalement la non-linéarité du phénomène de photoblanchiment, la disponibilité partielle des mesures et la présence d'un photoblanchiment parasite causé par le spectrofluorimètre. Les solutions mises en oeuvre couvrent l'ensemble de l'automatique : en commençant par la modélisation, l'identifiabilité, l'identification, le développement d'un observateur d'état et celui d'un système de contrôle agissant par modulation de largeur des impulsions de lumière. À cela s'ajoute, la conception et l'intégration d'une plateforme technologique opérationnelle. Les résultats *in vitro* ont validé la faisabilité de la solution développée. Une demande de brevet est actuellement en phase d'analyse.

Les perspectives de cette thèse sont entièrement consacrées au développement de ce dispositif. Plusieurs axes ont été retenus :

- la réalisation des essais *in vivo* pour tester l'efficacité et la reproductibilité du dispositif par rapport à des protocoles classiques (illuminations continues et fractionnées) ;
- le développement d'un démonstrateur de taille réduite et portable ;
- l'intégration d'autres informations dans la boucle de retour pendant le traitement ;
- l'intégration de la partie logiciel dans un environnement Temps-Réel (au sens informatique du terme cette fois).

Le contexte fortement interdisciplinaire de ces travaux, associé à mon immersion totale dans le domaine de la biologie, m'auront évidemment permis d'acquérir de nouvelles compétences relatives aux thérapies anti-cancers, mais également de sensibiliser les biologistes à la valeur ajoutée que l'identification de systèmes pouvait offrir. De plus, ces différents problèmes d'identification sont autant de motivations pour le développement de collaboration aussi bien à l'intérieur du CRAN, notamment avec le département CID (Contrôle, Identification et Diagnostic), qu'à l'extérieur du laboratoire avec d'autres équipes nationales et internationales intéressées par les problématiques en biologie.

A

Représentation LPV-SS

Rappelons que le modèle de cinétique du photoblanchiment retenu peut s'écrire sous la forme d'une représentation d'états (définie en Section 2.3.5) :

$$\begin{cases} X(t_{k+1}) &= AX(t_k) + BU(t_k) \\ y_m(t_k) &= CX(t_k) + DU(t_k) + v(t_k) \end{cases} \quad (\text{A.1})$$

Avec :

$$X(t_k) = \begin{bmatrix} x_t(t_k) \\ x_p(t_k) \end{bmatrix} \quad U(t_k) = \begin{bmatrix} x_t(t_k)b(t_k) \\ u_t(t_k) \\ u_t(t_k)b(t_k) \\ u_p(t_k) \end{bmatrix} \quad (\text{A.2})$$

Et où les matrices A , B , C et D sont construites de la façon suivante :

$$A = \begin{bmatrix} -a_{t_1} & 0 \\ 0 & -a_p \end{bmatrix} \quad B = \begin{bmatrix} a_{t_1} - a_{t_2} & b_{t_1} & b_{t_2} - b_{t_1} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & b_p \end{bmatrix} \quad (\text{A.3})$$

$$C = \begin{bmatrix} 1 & 1 \end{bmatrix} \quad D = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{A.4})$$

avec $[a_{t_1}, a_{t_2}, a_p, b_{t_1}, b_{t_2}, b_p]$ les paramètres des modèles ARX (2.13) et (2.14). $b(t_k)$ correspond à la variable binaire de séquençement définie par (2.5). Enfin, $v(t_k)$ est un bruit blanc stationnaire.

A.1 Mise en forme LPV-SS

La représentation d'état précédente peut également être mise sous la forme du système LPV-SS (*Linear Parametrically Varying State Space model*) suivant :

$$\begin{cases} X(t_{k+1}) &= A(p_k)X(t_k) + B(p_k)U_{LPV}(t_k) \\ y_m(t_k) &= C(p_k)X(t_k) + D(p_k)U_{LPV}(t_k) + v(t_k) \end{cases} \quad (\text{A.5})$$

Les matrices $A(p_k)$, $B(p_k)$, $C(p_k)$ et $D(p_k)$ étant paramétrées de la façon suivante :

$$A(p_k) = A_0 + \sum_{q=1}^s A_q p_k \quad B(p_k) = B_0 + \sum_{q=1}^s B_q p_k \quad (\text{A.6})$$

$$C(p_k) = C_0 + \sum_{q=1}^s C_q p_k \quad D(p_k) = D_0 + \sum_{q=1}^s D_q p_k \quad (\text{A.7})$$

Avec $s = 1$, $p_k = b(t_k)$ et :

$$A_0 = \begin{bmatrix} -a_{t_1} & 0 \\ 0 & -a_p \end{bmatrix} \quad A_1 = \begin{bmatrix} a_{t_1} - a_{t_2} & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{A.8})$$

$$B_0 = \begin{bmatrix} b_{t_1} & 0 \\ 0 & b_p \end{bmatrix} \quad B_1 = \begin{bmatrix} b_{t_2} - b_{t_1} & 0 \\ 0 & b_p \end{bmatrix} \quad (\text{A.9})$$

$$C_0 = \begin{bmatrix} 1 & 1 \end{bmatrix} \quad C_1 = \begin{bmatrix} 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{A.10})$$

et où $U_{LPV}(t_k) = [u_t(t_k) \quad u_p(t_k)]^T$.

A.2 Identification des systèmes LPV

Différentes approches ont été développées ces dernières années concernant l'identification de systèmes LPV. Bien que ce domaine soit prisé, il n'existe, à ce jour, que très peu de méthodes facilement utilisables en pratique. Ces techniques sont, pour la plupart, exclusivement dédiées aux cas discrets et sont caractérisées par le type de structure de modèle LPV utilisées (*i.e. Input-Output, State-Space, Orthogonal Basis Functions, etc.*). Une synthèse des méthodes existantes est très bien présentée dans [179].

Cependant, compte tenu de la structure de notre modèle et de l'allure de la variable de séquençement $p_k = b(t_k) \in \{0, 1\}$, une approche d'identification locale, comme décrite dans [180], pourrait s'avérer efficace. Les paramètres du modèle pourraient être estimés pour différents points de fonctionnement locaux dépendants de p_k . Cette méthode fournit autant de modèles LTI (*Linear Time Invariant*) que de points de fonctionnement qu'il restera enfin à interpoler de manière adéquate.

Bibliographie

- [1] D. Dolmans and R. D. Fukumura, "Photodynamic therapy for cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 380–387, 2003.
- [2] O. Raab, "On the effect of fluorescent substances on infusoria," *Z. Biol.*, vol. 39, p. 524, 1900.
- [3] N. Finsen, "Phototherapy," *JH Sequira (transl.)*, p. 79, 1901.
- [4] H. V. Tappeiner and A. Jesionek, "Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen," *Munch Med Wochenschr*, vol. 47, no. 2042-2044, 1903.
- [5] H. V. Tappeiner and A. Jodlbauer, "The sensitising action of fluorescent substance, an overall account of investigations on photodynamic phenomena," *Leipzig*, 1907.
- [6] W. Hausmann, "The sensitizing action of hematoporphyrin," *Biochem. Z.*, vol. 30, p. 176, 1911.
- [7] F. Meyer-Betz, "Investigations on the biological (photodynamic) action of haematoporphyrin and other derivatives of blood and bile pigments," *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, vol. 112, pp. 476–503, 1913.
- [8] S. Schwartz, K. Absolon, and H. Vermund, "Some relationships of porphyrins, x-rays and tumors," *Univ. Minn. Med. Bull.*, vol. 27, pp. 7–8, 1955.
- [9] R. Lipson and E. Baldes, "The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative," *Archives of Dermatology*, vol. 82, no. 4, p. 508, 1960.
- [10] I. Diamond, S. Granelli, S. McDonagh, C. Wilson, and R. Jaenicke, "Photodynamic therapy of malignant tumours," *Lancet*, vol. 2, no. 7788, pp. 1175–1177, 1972.
- [11] T. Dougherty, G. Grindey, R. Fiel, K. Weishaupt, and D. Boyle, "Photoradiation therapy. ii. cure of animal tumors with hematoporphyrin and light," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 55, no. 1, p. 115, 1975.
- [12] J. Kelly, M. Snell, and M. Berenbaum, "Photodynamic destruction of human bladder carcinoma," *British Journal of Cancer*, vol. 31, no. 2, p. 237, 1975.
- [13] T. Dougherty, J. Kaufman, A. Goldfarb, K. Weishaupt, D. Boyle, and A. Mittleman, "Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors," *Cancer Research*, vol. 38, no. 8, p. 2628, 1978.
- [14] M. Niemz, *Laser-tissue interactions : fundamentals and applications*. Springer, 2003.
- [15] S. Mordon, *Lasers thérapeutiques : bases fondamentales dans Cosmétologie et Dermatologie esthétique*. Elsevier Masson, Paris, 2006.
- [16] N. Thomas, "Thérapie photodynamique ciblant la vascularisation tumorale par l'adressage du co-récepteur neuropiline-1 : Vers l'élaboration de peptides biologiquement plus stables," Ph.D. dissertation, UHP Nancy 1, 2009.

- [17] L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M.-L. Viriot, F. Guillemin, and M. Barberi-Heyob, "A peptide competing with VEGF₁₆₅ binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells," *Journal of Controlled Release*, vol. 111, pp. 153–164, 2006.
- [18] M. J. Niedre, C. S. Yu, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, "Singlet oxygen luminescence as in vivo photodynamic therapy dose metric : validation in normal mouse skin with topical amino-levulinic acid," *British Journal of Cancer*, vol. 92, pp. 298 – 304, 2005.
- [19] S. Lee, D. H. Vu, M. F. Hinds, S. J. Davis, J. A. O'Hara, and B. W. Pogue, "A singlet molecular oxygen imaging sensor for photodynamic therapy," in *OSA BIOMED 2008 Biomedical Optics Topical Meeting*, 2008.
- [20] J. S. Dysart, G. Singh, and M. S. Patterson, "Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mthpc photodynamic therapy of mll cells," *Photochemistry and photobiology*, vol. 81, pp. 196 – 205, 2005.
- [21] L. Tirand, N. Thomas, M. Dodeller, D. Dumas, C. Frochot, F. Guillemin, and M. Barberi-Heyob, "Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 : an *in vivo* and *in vitro* study," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 35, pp. 806–813, 2007.
- [22] H. V. Tappeiner and A. Joldlbauer, "On the effect of photodynamic (fluorescent) substances on protozoa and enzymes," *Arch. Klin. Med.*, vol. 80, pp. 427–487, 1904.
- [23] A. Policard, "Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de wood," *CR Soc. Biol.*, vol. 91, pp. 1423–1424, 1924.
- [24] F. Figge, G. Weiland, and L. Manganiello, "Cancer detection and therapy. affinity of neoplastic, embryonic and traumatized regenerating tissues for porphyrins and metalloporphyrins," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 68, pp. 640–641, 1948.
- [25] S. Brown, E. Brown, and I. Walker, "The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment," *Lancet Oncology*, vol. 5, no. 8, pp. 497–508, 2004.
- [26] T. Dougherty and T. Mang, "Characterization of intra-tumoral porphyrin following injection of hematoporphyrin derivative or its purified component," *Photochem Photobiol.*, vol. 46, pp. 67–70, 1987.
- [27] R. Boyle and D. Dolphin, "Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers," *Photochem Photobiol.*, vol. 64, no. 3, pp. 469–485, 1996.
- [28] H. Maeda, "The enhanced permeability and retention (epr) effect in tumor vasculature : the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting," *Advances in enzyme regulation*, vol. 41, no. 1, pp. 189–207, 2001.
- [29] G. Jori and E. Reddi, "The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers," *Int. J. Biochem.*, vol. 25, pp. 1369–1375, 1993.
- [30] S. Bonneau, C. Vever-Bizet, H. Mojzisova, and D. Brault, "Tetrapyrrolephotosensitizers vectorization and plasma ldl : A physico-chemical approach," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 344, no. 1-2, pp. 78–87, 2007.
- [31] S. Bonneau, P. Morlière, and D. Brault, "Dynamics of interactions of photosensitizers with lipoproteins and membrane-models : correlation with cellular incorporation and subcellular distribution," *Biochemical pharmacology*, vol. 68, no. 7, pp. 1443–1452, 2004.
- [32] D. Kessel, *Photodynamic therapy of neoplastic disease*. CRC, 1990.

-
- [33] E. Hecht, *The propagation of light, dans Optics*. Addison-Wesley, 2002.
 - [34] B. C. Wilson, M. S. Patterson, and L. Lilge, "Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy : a new paradigm," *Lasers Med. Sci*, vol. 12, pp. 182–199, 1997.
 - [35] M. T. Jarvi, M. J. Niedre, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, "Singlet oxygen luminescence dosimetry (SOLD) for photodynamic therapy : current status, challenges and future prospects," *Photochem. Photobiol.*, vol. 82, pp. 1198–1210, 2006.
 - [36] K. T. Moesta, W. R. Greco, S. O. Nurse-Finlay, J. C. Parsons, and T. S. Mang, "Lack of reciprocity in drug and light dose dependence of photodynamic therapy of pancreatic adenocarcinoma *in vitro*," *Cancer Res.*, vol. 55, no. 14, pp. 3078–3084, 1995.
 - [37] J. Yuan, P. A. Mahama-Relue, R. L. Fournier, and J. A. Hampton, "Predictions of mathematical models of tissue oxygenation and generation of singlet oxygen during photodynamic therapy," *Radiat. Res.*, vol. 148, pp. 386–394, 1997.
 - [38] B. J. Tromberg, A. Orenstein, S. Kimel, S. J. Barker, J. Hyatt, J. S. Nelson, and M. W. Berns, "*In vivo* oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy," *Photochem. Photobiol.*, vol. 52, pp. 375–385, 1990.
 - [39] M. G. Nichols and T. H. Foster, "Oxygen diffusion and reaction kinetics in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids," *Phys. Med. Biol.*, vol. 39, no. 2161–2181, 1994.
 - [40] F. W. Hetzel, S. M. Brahmavar, Q. Chen, S. L. Jacques, M. S. Patterson, B. C. Wilson, and T. C. Zhu, "Photodynamic therapy dosimetry. AAPM report No.88," American Association of Physicists in Medicine by Medical Physics Publishing, july 2005.
 - [41] J. S. Dysart and M. S. Patterson, "Characterization of photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of mll cells *in vitro*," *Phys. Med. Biol.*, vol. 50, pp. 2597 – 2616, 2005.
 - [42] B. W. Henderson and T. J. Dougherty, "How does photodynamic therapy work?" *Photochem. Photobiol.*, vol. 55, pp. 145–157, 1992.
 - [43] B. Epe, M. Pflaum, and S. Boiteux, "DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems," *Mutat. Res.*, vol. 299, pp. 135–145, 1993.
 - [44] W. R. Potter, "The theory of photodynamic therapy dosimetry : consequences of photodestruction of sensitizer," *Lasers Med.*, vol. 712, pp. 124–129, 1986.
 - [45] I. Georgakoudi, M. G. Nichols, and T. H. Foster, "The mechanism of photofrin[®] photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry," *Photochem. Photobiol.*, vol. 65, no. 1, pp. 135–144, 1997.
 - [46] I. Georgakoudi and T. H. Foster, "Singlet oxygen- versus nonsinglet oxygen-mediated mechanisms of sensitizer photobleaching and their effects on photodynamic dosimetry," *Photochem. photobiol.*, vol. 67, no. 6, pp. 612–625, 1998.
 - [47] A. Molckovsky and B. C. Wilson, "Monitoring of cell and tissue responses to photodynamic therapy by electrical impedance spectroscopy," *Phys. Med. Biol.*, vol. 46, pp. 983–1002, 2001.
 - [48] B. Chen, B. W. Pogue, I. A. Goodwin, J. A. O'Hara, C. M. Wilmot, J. E. Hutchins, P. J. Hoopes, and T. Hasan, "Blood flow dynamics after photodynamic therapy with verteporfin in the RIF-1 tumor," *Radiat. Res.*, vol. 160, pp. 452–459, 2003.
 - [49] G. Yu, T. Durduran, C. Zhou, H. W. Wang, M. E. Putt, H. M. Saunders, C. M. Sehgal, E. Glatstein, A. G. Yodh, and T. M. Busch, "Noninvasive monitoring of murine tumor blood flow during and after photodynamic therapy provides early assessment of therapeutic efficacy," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, pp. 3543–3552, 2005.

- [50] M. Gordon, V. Yang, E. Yue, S. Lo, B. Wilson, and I. Vitkin, "Doppler optical coherence tomography for monitoring the vascular effects of photodynamic therapy," in *SPIE*, vol. 5316. Bellingham, WA., USA : SPIE, 2004, pp. 147–154.
- [51] D. Lapointe, N. Brasseur, J. Cadorette, C. La Madelaine, S. Rodrigue, J. E. van Lier, and R. Lecomte, "High resolution PET imaging for *in vivo* monitoring of tumor response after photodynamic therapy in mice," *J. Nucl. Med.*, vol. 40, pp. 876–882, 1999.
- [52] M. J. Niedre, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, "Direct nir luminescence detection of singlet oxygen generated by pdt in cells in vitro and tissues in vivo," *Photochemistry and photobiology*, vol. 75, no. 4, pp. 382–391, 2002.
- [53] M. J. Niedre, A. J. Secord, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, "In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as dose metric in photodynamique therapy," *Cancer Research*, vol. 63, pp. 7986–7994, November 2003.
- [54] J. Piette, C. Volanti, A. Vantieghem, J. Martoule, Y. Habraken, and P. Agostinis, "Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers," *Biochemical pharmacology*, vol. 66, no. 8, pp. 1651–1659, 2003.
- [55] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, and B. W. Henderson, "Photodynamic therapy," *J Natl Cancer Inst.*, vol. 90, pp. 889 – 905, 1998.
- [56] A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy : part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 2, pp. 1 – 23, 2005.
- [57] P. Agostinis, E. Buytaert, H. Breysens, and N. Hendrickx, "Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis," *Photochem Photobiol*, vol. 3, no. 8, pp. 721–729, 2004.
- [58] D. Kessel, M. G. H. Vicente, and J. J. Reiners, "Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy," *Lasers in surgery and medicine*, vol. 38, no. 5, p. 482, 2006.
- [59] M. Agarwal, H. Larkin, S. Zaidi, H. Mukhtar, and N. Oleinick, "Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma cells," *Cancer Research*, vol. 53, no. 24, p. 5897, 1993.
- [60] N. Yamamoto, S. Homma, T. Sery, L. Donoso, and J. Hooper, "Photodynamic immunopotential : in vitro activation of macrophages by treatment of mouse peritoneal cells with haematoporphyrin derivative and light," *European Journal of Cancer*, vol. 27, no. 4, p. 467, 1991.
- [61] C. Abels, "Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (pdt)," *Photochem Photobiol*, vol. 3, no. 8, pp. 765–771, 2004.
- [62] V. Fingar, T. Wieman, S. Wiehle, and P. Cerrito, "The role of microvascular damage in photodynamic therapy : the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion," *Cancer Research*, vol. 52, no. 18, p. 4914, 1992.
- [63] V. Fingar, S. Taber, P. Haydon, L. Harrison, S. Kempf, and T. Wieman, "ascular damage after photodynamic therapy of solid tumors : a view and comparison of effect in preclinical and clinical models at the university of louisville," *In vivo*, vol. 14, no. 1, p. 93, 2000.
- [64] T. Wieman, T. Mang, V. Fingar, T. Hill, M. Reed, T. Corey, V. Nguyen, and E. R. Jr, "Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels," *Surgery*, vol. 104, no. 3, p. 512, 1988.

-
- [65] M. Gilissen, L. van de Merbel-de Wit, A. Elly, W. Star, J. Koster, and W. Sluiter, "Effect of photodynamic therapy on the endothelium-dependent relaxation of isolated rat aortas," *Cancer Research*, vol. 53, no. 11, p. 2548, 1993.
 - [66] B. Krammer, "Vascular effects of photodynamic therapy," *Anticancer Research*, vol. 21, no. 6, pp. 4271–4278, 2001.
 - [67] U. Schmidt-Erfurth and C. Pruenster, "Management of neovascular age-related macular degeneration," *Progress in retinal and eye research*, vol. 26, no. 4, pp. 437–451, 2007.
 - [68] S. Mordon, "Vascular-targeted photodynamic therapy : a new technique for port wine stain treatment, dans annales de dermatologie et de vénéréologie," *tome 134*, p. 281, 2007.
 - [69] S. Eggener and J. Coleman, "Focal treatment of prostate cancer with vascular-targeted photodynamic therapy," *The Scientific World Journal*, vol. 8, p. 963, 2008.
 - [70] S. Pinel, M. Barberi-Heyob, E. Cohen-Jonathan, J.-L. Merlin, C. Delmas, F. Plenat, and P. Chastagner., "Erythropoietin-induced reduction of hypoxia before and during fractionated irradiation contributes to improvement of radioresponse in human glioma xenografts," *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, vol. 59, no. 1, pp. 250–9, 2004.
 - [71] M. Patterson, B. Wilson, and R. Graff, "In vivo tests of the concept of photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulphonated phthalocyanine," *Photochem. Photobiol.*, vol. 51, pp. 343–349, 1990.
 - [72] T. Bastogne, "Modélisation expérimentale des systèmes dynamiques interconnectés," Nancy Université, CRAN - Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Habilitation à Diriger des Recherches, 2008.
 - [73] B. Valeur, *Initiation à la fluorescence moléculaire.* de Boeck, 2004.
 - [74] T. Bastogne, M. Thomassin, and J. Masse, "Selection and identification of physical parameters from passive observation. application to a winding process," *Control Engineering Practice*, vol. 15, pp. 1051–1061, 2007.
 - [75] V. Mazet, "Development of methods for spectroscopic signal processing : baseline and spectral peaks estimation," Ph.D. dissertation, Université Henri Poincaré, Nancy 1, Décembre 2005.
 - [76] G. A. Wagnières, W. M. Star, and B. C. Wilson, "In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications," *Photochemistry and photobiology*, vol. 68, no. 5, pp. 603 – 632, 1998.
 - [77] R. Bonnett, *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy.* Gordon and Breach Science Publishers, 2000.
 - [78] I. J. Macdonald and T. Dougherty, "Basic principles of photodynamic therapy," *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, vol. 5, pp. 105–129, 2001.
 - [79] B. Wilson and J. van Lier, "Radiolabelled photosensitizers for tumour imaging and photodynamic therapy," *Journal of Photochemist and Photobiology B : Biology*, vol. 3, no. 3, p. 459, 1989.
 - [80] C. Foote, F. Shook, and R. Abakerli, "Characterization of singlet oxygen," *Methods in enzymology*, vol. 105, p. 36, 1984.
 - [81] F. Wilkinson, W. Helman, and A. Ross, "Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution," *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 22, no. 113-113, 1993.

- [82] T. Foster, R. S. Murant, R. G. Bryant, R. S. Knox, S. L. Gibson, and R. Hilf, "Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy," *Radiation Research*, vol. 126, pp. 296–303, 1991.
- [83] J. W. H. J. C. M. Sterenborg, de Wolf, M. Koning, B. Kruijt, A. van den Heuvel, and D. J. Robinson, "Phosphorescence-fluorescence ratio imaging for monitoring the oxygen status during photodynamic therapy," *Optic Express*, vol. 12, no. 9, pp. 1873–1878, May 2004.
- [84] S. Dobre, "Analyses de sensibilité et d'identifiabilité globales. application à l'estimation de paramètres photophysiques en thérapie photodynamique," Ph.D. dissertation, UHP Nancy 1, 2010.
- [85] S. Dobre, M. Barberi-Heyob, D. Bechet, J. Didelon, and A. Richard, "System identification of intracellular photoreaction process induced by photodynamic therapy," in *16th Mediterranean Conference on Control and Automation, MED'08*, 2008.
- [86] J. C. Finlay, S. Mitra, M. S. Patterson, and T. H. Foster, "Photobleaching kinetics of photofrin in vivo and in multicell tumour spheroids indicate two simultaneous bleaching mechanisms," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 49, pp. 4837–4860, 2004.
- [87] X.-H. Hu, Y. Feng, J. Q. Lu, R. Allison, R. E. Cuenca, G. H. Downie, and C. H. Sibata, "Modelling of type ii photofrin-mediated photodynamic therapy process in a heterogeneous tissue phantom," *Photochem Photobiol*, vol. 81, pp. 1460–1468, 2005.
- [88] B. M. Aveline and R. W. Redmond, "Can cellular phototoxicity be accurately predicted on the basis of sensitizer photophysics?" *Photochem Photobiol*, vol. 69, pp. 306–316, 1999.
- [89] K. K.-H. Wang, J. C. Finlay, T. M. Busch, S. M. Hahn, and T. C. Zhu, "Explicit dosimetry for photodynamic therapy : macroscopic singlet oxygen modeling," *Journal of biophotonics*, vol. 3, no. 5, pp. 304–318, 2010.
- [90] S. Mitra and T. H. Foster, "Photochemical oxygen consumption sensitized by a porphyrin phosphorescent probe in two model systems," *Biophysical Journal*, vol. 78, pp. 2597–2605, 2000.
- [91] H. Garnier and L. Wang, Eds., *Identification of continuous-time models from sampled data*. London : Springer-Verlag, 2008.
- [92] S. Dobre, J.-B. Tylcz, T. Bastogne, and M. Barberi-Heyob, "Global sensitivity analysis and estimation of photophysical parameters from in vivo data in photodynamic therapy," *16th IFAC Symposium on System Identification*, 2012.
- [93] T. Bastogne, "Identification des systèmes multivariables par les méthodes des sous-espaces. application à un système d'entraînement de bande," Ph.D. dissertation, Université Henri Poincaré, 1997.
- [94] M.-C. Kung and B. F. Womack, "Discrete time adaptative control of linear dynamic systems with a two-segment piecewise-linear asymmetric nonlinearity," *IEEE Transactions on Automatic Control*, vol. AC-29, no. 2, pp. 170–172, February 1984.
- [95] J. Voros, "Parameter identification of discontinuous hammerstein systems," *Automatica*, vol. 33, no. 6, pp. 1141–1154, 1997.
- [96] L. Ljung, *System Identification : Theory For The User*. Englewood Cliffs, NJ : Prentice Hall, 1987.
- [97] E. Walter and L. Pronzato, *Identification de modèles paramétriques à partir de données expérimentales*. Paris : Masson, 1994.

-
- [98] D. G. Luenberger, "An introduction to observers," *IEEE Trans. On Automatic Control*, vol. 16, no. 6, pp. 596–602, 1971.
 - [99] D. Simon, *Optimal State Estimation : Kalman, H Infinity, And Nonlinear Approaches*. Wiley and Sons, 2006.
 - [100] A. Curnow, J. Hallerb, and S. Bown, "Oxygen monitoring during 5-aminolaevulinic acid induced photodynamic therapy in normal rat colon. Comparison of continuous and fractionated light regimes," *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, vol. 58, pp. 149–155, 2000.
 - [101] M. Ascencio, J. P. Estevez, M. Delemer, M. O. Farine, P. Collinet, and S. Mordon, "Comparison of continuous and fractionated illumination during hexaminolaevulinate-photodynamic therapy," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 5, no. 3, pp. 210–216, 2008.
 - [102] J. P. Estevez, M. Ascencioa, P. Colina, M. O. Farineb, P. Collineta, and S. Mordon, "Continuous or fractionated photodynamic therapy ? comparison of three pdt schemes for ovarian peritoneal micrometastasis treatment in a rat model," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 7, pp. 251–257, 2010.
 - [103] S. Lee, L. Zhu, A. Minhaj, M. F. Hinds, A. A. Ferrante, D. H. Vu, D. Rosen, and S. J. Davis, "Diode laser monitor for singlet molecular oxygen," in *SPIE Photonics West*, 2005.
 - [104] A. Amelink, A. van der Ploeg van den Heuvel, W. J. de Wolf, D. J. Robinson, and H. J. C. M. Sterenberg, "Monitoring pdt by means of superficial reflectance spectroscopy," *Photochemistry and photobiology*, vol. 79, pp. 243 – 251, 2005.
 - [105] T. Arai, S. Ohmori, and T. Yanagihara, "Photodynamic therapy apparatus, method for controlling photodynamic therapy apparatus, and photodynamic therapy method," Demande de brevet EP 1 637 182 A1, 03 22, 2006.
 - [106] T. Nagypal and G. Hofmann, "System zur photodynamischen behandlung von lebewesen, deren organen und/oder gewebe," Demande de brevet DE 197 21 489 A1, 11 26, 1998.
 - [107] S. Svanberg, S. Andersson-Engles, A. Johansson, J. Axelsson, and J. Swartling, "System for controlling and adlusting interstitial photodynamic light therapy parameters," Demande de brevet EP 2 431 072 A1, 08 15, 2007.
 - [108] W. J. Cottrell, T. Lee, T. H. Foster, and A. R. Oseroff, "Method for controlling photodynamic therapy irradiation and related instrumentation," Demande de brevet WO 2009/052 503 A2, 04 23, 2009.
 - [109] W. J. Cottrell, T. H. Foster, and A. R. Oseroff, "Feedback-controlled method for delivering photodynamic therapy and related instrumentation," Demande de brevet WO 2008/137 737 A2, 11 13, 2008.
 - [110] T. H. Foster, W. J. Cottrell, C. Bigelow, and A. R. Oseroff, "Photodynamic therapy with spatially resolved dual spectroscopic monitoring," Brevet WO 2006/025 940, 03 09, 2006.
 - [111] R. R. Allisona, H. C. Motaa, V. S. Bagnatob, and C. H. Sibata, "Bio-nanotechnology and photodynamic therapy – state of the art review," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 5, pp. 19–28, 2008.
 - [112] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grassset, and E. Duguet, "Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy," *J. Mater. Chem.*, vol. 14, pp. 2161–2175, 2004.
 - [113] H. Hong, Y. Zhang, and W. C. J. Sun, "Molecular imaging and therapy of cancer with radialbeled nanoparticles," *Nano Today*, vol. 4, no. 5, pp. 399–413, 2009.

- [114] D. Bechet, L. Tirand, B. Faivre, F. Plenat, C. Bonnet, T. Bastogne, C. Frochot, F. Guillemin, and M. Barberi-Heyob, "Neuropilin-1 targeting photosensitization-induced early stages of thrombosis via tissue factor release." *Pharmaceutical Research*, vol. 27, no. 3, pp. 468–479, 2010.
- [115] V. Morosini, T. Bastogne, C. Frochot, R. Schneider, A. François, F. Guillemin, and M. Barberi-Heyob, "Quantum dot-folic acid conjugates as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 10, pp. 842–851, 2011.
- [116] H. Benachour, A. Sève, T. Bastogne, C. Frochot, R. Vanderesse, J. Jasniewski, I. Miladi, C. Billotey, O. Tillement, F. Lux, and M. Barberi-Heyob, "Multifunctional peptide-conjugated hybrid silica nanoparticles for photodynamic therapy and mri," *Theranostics*, vol. 2, no. 9, pp. 889–904, 2012.
- [117] J. G. Moser, *Photodynamic Tumor Therapy : 2nd and 3rd Generation*. Gordon & Breach Science Publishers, 1998.
- [118] G. Oenbrink, P. Jurgenlimke, and D. Gabel, "Accumulation of porphyrins in cells : influence of hydrophobicity aggregation and protein binding," *Photochem. Photobiol.*, vol. 48, pp. 451–456, 1988.
- [119] P. Margaron, H. A. M.-J. Grégoire, V. Scasnar, and J. E. van Lier, "Structure-photodynamic activity relationships of a series of substituted zinc phthalocyanines," *Photochem. Photobiol.*, vol. 63, pp. 217–223, 1996.
- [120] B. W. Henderson, D. A. B. DA, W. R. Greco, R. K. Sharma, R. K. Pandey, K. R. W. L. A. Vaughan, and T. J. Dougherty., "An *in vivo* quantitative structure-activity relationship for a congeneric series of pyropheophorbide derivatives as photosensitizers for photodynamic therapy," *Cancer Research*, vol. 57, pp. 4000–4007, 1997.
- [121] E. Walter and L. Pronzato, *Identification of Parametric Models from experimental data*. Springer-Verlag, Masson, 1997.
- [122] L. Ljung, *System Identification : Theory For The User*, 2nd ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1999.
- [123] D. Feng, S. C. Huang, Z. Wang, and D. Ho, "An unbiased parametric imaging algorithm for non-uniformly sampled biomedical system parameter estimation," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 15, no. 4, pp. 512–518, 1996.
- [124] R. Gomeni, H. Piet-Lahanier, and E. Walter, "Study of the pharmacokinetics of betaxolol using membership set estimation," *Biomed. Meas. Infor. Contr.*, vol. 2, no. 4, pp. 207–211, 1988.
- [125] C. Cobelli, G. Toffolo, and D. Foster, *Tracer Kinetics in Biomedical Research : From Data to Model*. Kluwer Academic Publishers, 2000.
- [126] J. Delforge, A. Sirota, and M. B. Mazoyer, "Identifiability analysis and parameter identification of an *in vivo* ligand-receptor model from PET data," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 37, no. 7, pp. 653–661, 2000.
- [127] G. Sparacino, C. Tombolato, and C. Cobelli, "Maximum-likelihood versus maximum a posteriori parameter estimation of physiological system models : the C-peptide impulse response case study," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 47, no. 6, pp. 801–811, 2000.
- [128] S. Audoly, G. Bellu, L. D'Angio, M. Saccomani, and C. Cobelli, "Global identifiability of nonlinear models of biological systems," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 48, pp. 55–65, 2001.

-
- [129] N. D. Evans, R. J. Errington, M. Shelley, G. P. Feeney, M. J. Chapman, K. R. Godfrey, P. J. Smith, and M. J. Chappell, "A mathematical model for the *in vitro* kinetics of the anti-cancer agent topotecan," *Mathematical Biosciences*, vol. 189, pp. 185–217, 2004.
 - [130] N. D. Evans, R. J. Errington, M. J. Chapman, P. J. Smith, M. J. Chappell, and K. R. Godfrey, "Compartmental modelling of the uptake kinetics of the anti-cancer agent topotecan in human breast cancer cells," *International Journal of Adaptive Control and Signal Processing*, vol. 19, pp. 395–417, 2005.
 - [131] T. Bastogne, L. Tirand, D. Bechet, M. Barberi-Heyob, and A. Richard, "System identification of photosensitiser uptake kinetics in photodynamic therapy," *Biomedical Signal Processing and Control*, vol. 2, pp. 217–225, 2007.
 - [132] T. Bastogne, S. Mézières-Wantz, N. Ramdani, P. Vallois, L. Tirand, D. Bechet, and M. Barberi-Heyob, "Parameter estimation of pharmacokinetics models in the presence of random timing errors," *European Journal of Control*, vol. 14, no. 2, 2008.
 - [133] J. S. Ananta, B. Godin, R. Sethi, L. Moriggi, X. Liu, R. E. Serda, R. Krishnamurthy, R. Muthupillai, R. D. Bolskar, L. Helm, M. Ferrari, L. J. Wilson, and P. Decuzzi, "Geometrical confinement of gadolinium-based contrast agents in nanoporous particles enhances t1 contrast," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 11, pp. 815–821, 2010.
 - [134] D. Shahbazi-Gahruei, M. Williams, and B. J. Allen, "In vitro study of relationship between signal intensity and gadolinium-dtpa concentration at high magnetic field strength," *Australasian Radiology*, vol. 45, pp. 298–304, 2001.
 - [135] B. Ni, H. Garnier, and M. Gilson, "A refined instrumental variable method for hammerstein-wiener continuous-time model identificatio," *16th IFAC Symposium on System Identification*, pp. 1061–1066, 2012.
 - [136] K. Wentlandt, M. Samoilova, P. Carlen, and H. El Beheiry, "General anesthetics inhibit gap junction communication in cultured organotypic hippocampal slices," *Anesth. Analg.*, vol. 102, pp. 1692–8, 2006.
 - [137] P. C. Young, H. Garnier, and M. Gilson, *Identification of Continuous-time Models from Sampled Data (Advances in Industrial Control)*. Springer, 2008, ch. Refined instrumental variable identification of continuous-time hybrid Box-Jenkins models.
 - [138] L. Ljung, "Initialisation aspects for subspace and output-error identification methods," in *European Control Conference, ECC'03*, 2003.
 - [139] E. Reits and J. Neefjes, "From fixed to frap : measuring protein mobility and activity in living cells," *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. 6, pp. E145–7, 2001.
 - [140] J. Lippincott-Schwartz and G. Patterson, "Development and use of fluorescent protein markers in living cells," *Science*, vol. 300, no. 5616, pp. 87–91, 2003.
 - [141] G. Carrero, D. McDonald, E. Crawford, G. de Vries, and M. Hendzel, "Using frap and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins," *Methods*, vol. 29, no. 1, pp. 14–28, Jan. 2003.
 - [142] D. Axelrod, D. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W. Webb, "Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics," *Biophys. J.*, vol. 16, no. 9, pp. 1055–69, Sept. 1976.
 - [143] U. Kubitscheck, P. Wedekind, and R. Peters, "Lateral diffusion measurement at high spatial resolution by scanning microphotolysis in a confocal microscope," *Biophys. J.*, vol. 67, no. 3, pp. 948–56, Sept. 1994.

- [144] P. Wedekind, U. Kubitscheck, and R. Peters, "Scanning microphotolysis : a new photobleaching technique based on fast intensity modulation of a scanned laser beam and confocal imaging," *J Microsc*, vol. 176, no. Pt1, pp. 23–33, Oct. 1994.
- [145] R. Peters and U. Kubitscheck, "Scanning microphotolysis : Three-dimensional diffusion measurement and optical single-transporter recording," *Methods*, vol. 18, no. 4, pp. 508–17, Aug. 1999.
- [146] M. Wade, J. Trosko, and M. Schindler, "A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells," *Science*, vol. 232, pp. 525–8, 1986.
- [147] G. Söhl and K. Willecke, "Gap junctions and the connexin protein family," *Cardiovasc. Res.*, vol. 62, pp. 228–232, 2004.
- [148] A. Halavatyi, P. Nazarov, Z. Al Tanoury, V. Apanasovich, M. Yatskou, and E. Friederich, "A mathematical model of actin filament turnover for fitting frap data," *European Biophysics Journal*, vol. 39, pp. 669–677, 2010. [Online]. Available : <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-009-0558-2>
- [149] F. Mueller, D. Mazza, T. J. Stasevich, and J. G. McNally, "Frap and kinetic modeling in the analysis of nuclear protein dynamics : what do we really know?" *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 22, no. 3, pp. 403 – 411, 2010, <ce :title>Nucleus and gene expression</ce :title>. [Online]. Available : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067410000268>
- [150] J. Mai, S. Trump, R. Ali, R. L. Schiltz, G. Hager, T. Hanke, I. Lehmann, and S. Attinger, "Are assumptions about the model type necessary in reaction-diffusion modeling? a frap application," *Biophysical Journal*, vol. 100, no. 5, pp. 1178 – 1188, 2011. [Online]. Available : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000634951100124X>
- [151] V. Gonzalez-Perez, B. Schmierer, C. S. Hill, and R. P. Sear, "Studying smad2 intranuclear diffusion dynamics by mathematical modelling of frap experiments," *Integr. Biol.*, vol. 3, pp. 197–207, 2011. [Online]. Available : <http://dx.doi.org/10.1039/C0IB00098A>
- [152] J. Floury, M.-N. Madec, F. Waharte, S. Jeanson, and S. Lortal, "First assessment of diffusion coefficients in model cheese by fluorescence recovery after photobleaching (frap)," *Food Chemistry*, vol. 133, no. 2, pp. 551 – 556, 2012. [Online]. Available : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612000635>
- [153] M. Wartenberg and H. Acker, "Quantitative recording of vitality patterns in living multicellular spheroids by confocal microscopy," *Micron*, vol. 26, no. 395-404, 1995.
- [154] L. Soroceanu, J. T. J. Manning, and H. Sontheimer, "Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas," *Glia*, vol. 33, pp. 107–117, 2001.
- [155] P. C. Young, "Recursive estimation, forecasting and adaptive control in c.t." *Control and Dynamics Systems : Advances in Theory and Applications*, vol. 31, pp. 119–166, 1989.
- [156] P. C. Young and A. J. Jakeman, "Refined instrumental variable methods of recursive time-series analysis, part 3 : extensions," *Int. J. of Control*, vol. 31, pp. 741–764, 1980.
- [157] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis," *Nature*, vol. 473, pp. 298–307, 2011.
- [158] G. H. Algire, H. W. Chalkley, W. E. Earle, F. Y. Legallais, H. D. Park, E. Shelton, and E. L. Schilling, "Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. iii. vascular reactions' of mice to fibroblasts treated in vitro with methylcholanthrene," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 11, pp. 555–580, 1950.

-
- [159] N. Ferrara, “Vegf and the quest for tumour angiogenesis factors,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, pp. 795–803, 2002.
 - [160] N. Ferrara and R. S. Kerbel, “Angiogenesis as a therapeutic target,” *Nature*, vol. 438, pp. 967–974, 2005.
 - [161] P. Vajkoczy, M. D. Menger, B. Vollmar, E. L. Schilling, P. Schmiedek, K. P. Hirth, A. Ullrich, and T. A. Fong, “Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel flk-1 inhibitor su5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy,” *Neoplasia*, vol. 1, pp. 31–41, 1999.
 - [162] M. D. Menger, M. W. Laschke, and B. Vollmar, “Scope and perspectives of intravital microscopy—bridge over from in vitro to in vivo,” *Immunology today*, vol. 14, pp. 519–522, 1993.
 - [163] E. Forkas, J. H. Im, S. Hill, S. Yameen, M. Stratford, J. Beech, W. Hackl, S. M. Maira, E. J. Bernhard, and W. G. McKenna, “Dual inhibition of the pi3k/mtor pathway increases tumor radiosensitivity by normalizing tumor vasculature,” *Cancer Research*, vol. 72, pp. 239–248, 2012.
 - [164] C. A. Staton, M. W. R. Reed, and N. J. Brown, “A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays,” *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 90, pp. 195–221, 2009.
 - [165] J. Mriouah, C. Boura, M. Thomassin, T. Bastogne, B. Faivre, and M. Barberi-Heyob, “Tumor vascular responses to anti-vascular and -angiogenic strategies : looking for suitable models,” *Trends in Biotechnology*, vol. 30, no. 12, pp. 649–658, September 2012.
 - [166] D. A. Drexler, L. Kovács, and Z. B. J. Sápi, I. Harmati, “Model-based analysis and synthesis of tumor growth under angiogenic inhibition : a case study,” in *Proc of the 18th IFAC World Congress*, Milano, Italy, August 2011.
 - [167] T. Bastogne, A. Samson, , P. Vallois, S. Wantz-Mézières, S. Pinel, D. Bechet, and M. Barberi-Heyob, “Phenomenological modeling of tumor diameter growth based on a mixed effects model,” *Journal of Theoretical Biology*, vol. 262, pp. 544–552, 2010.
 - [168] *Monolix users guide*, Lixoft, Mars 2013.
 - [169] G. Mercère and L. Bako, “Parameterization and identification of multivariable state-space systems : a canonical approach,” *Automatica*, vol. 47, pp. 1547–1555, 2011.
 - [170] J.-B. Tylcz, D. Bechet, T. Bastogne, H. Garnier, and M. Barberi-Heyob, “System identification of the intrabrain tumoral uptake of multifunctional nanoparticles,” in *8th IFAC Symposium on Biological and Medical Systems*, 2012.
 - [171] —, “Pharmacokinetic modeling of nanoparticles-based ps vectors into glioblastoma from mri imaging in pdt,” in *9th International Symposium on Photodynamic Therapy and Photodiagnosis in Clinical Practice*, Octobre 2012.
 - [172] J.-B. Tylcz, M. Abbaci, T. Bastogne, W. Blondel, D. Dumas, and M. Barberi-Heyob, “System identification of the fluorescence recovery after photobleaching in gap junctional intracellular communications,” in *52nd IEEE Conference on Decision and Control*, Décembre 2013.
 - [173] —, “A system engineering model to analyze gap-frap in multicellular models,” in *Interdisciplinary Symposium on Signals and Systems for Medical Applications*, Juin 2013.
 - [174] J.-B. Tylcz, H. Benachour, T. Bastogne, D. Bechet, H. Garnier, E. Bullinger, and M. Barberi-Heyob, “System identification of the intrabrain tumoral pharmacokinetics of multifunctional nanoparticles,” *Trans. Biomed. Eng.*, En révision 2013.

- [175] J.-B. Tylcz, D. Bechet, H. Benachour, H. Garnier, M. Barberi-Heyob, and T. Bastogne, “Pharmacokinetic modeling of nanoparticles-based agents into glioblastoma from mri imaging,” GT I-DERBI, Juin 2012.
- [176] J.-B. Tylcz and T. Bastogne, “Identification de systèmes biologiques à partir de séquences d’images : trois cas d’étude,” GT Identification, Avril 2013.
- [177] J.-B. Tylcz, H. Benachour, T. Bastogne, D. Bechet, H. Garnier, and M. Barberi-Heyob, “Pharmacokinetic modeling of nanoparticles-based agents into glioblastoma from mri imaging,” ONCOTRANS’13, Juin 2013.
- [178] J.-B. Tylcz, “Identification et contrôle de systèmes biologiques à partir de séquences d’images. application au gap-frap,” JN JD MACS, Juillet 2013.
- [179] R. Toth, *Modeling and Identification of Linear Parameter-Varying Systems*. Springer, 2010.
- [180] M. Lovera and G. Mercère, “Identification for gain-scheduling : a balanced subspace approach,” *American Control Conference*, 2007.

Résumé

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont divisés en deux grandes parties, et abordent des applications biologiques relatives au cancer et plus particulièrement à leur traitement. La première partie est consacrée à une recherche technologique, dont l'objectif est le développement d'un dispositif innovant permettant de contrôler plus efficacement la phase cytotoxique de la thérapie photodynamique. Cette thérapie contre le cancer met en jeu trois éléments principaux : un agent photosensibilisant, de l'oxygène et de la lumière. La solution proposée repose sur une stratégie d'asservissement d'un indicateur thérapeutique observable durant le traitement : le photoblanchiment. Le système d'asservissement développé utilise un observateur d'état qui a nécessité de résoudre en pratique des problèmes d'identifiabilité et d'identification d'un processus non-linéaire. Il est implanté dans une plateforme pilote opérationnelle validée par des tests *in vitro*. Une demande de brevet pour le dispositif développé est en cours. La seconde partie de cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une recherche appliquée, sur le thème de l'identification à temps continu de systèmes biologiques, à partir de séquences d'images au travers de trois cas d'études aux échelles cellulaire, tissulaire et animale. Une première étude est dédiée à la proposition d'un modèle à compartiments de la pharmacocinétique intratumorale de nanoparticules multifonctionnelles dans des cerveaux de rats, ainsi qu'à son identification à partir de séquences d'images IRM *in vivo*. La seconde traite de la modélisation, à partir de données d'imagerie expérimentale de fluorescence, de la fonctionnalité des jonctions communicantes intercellulaires. L'objectif est de discriminer deux types de cellules cancéreuses, grâce à leur dynamique de recouvrement de fluorescence. Enfin, un troisième cas d'étude aborde le problème de l'identification d'une cohorte de systèmes à partir de petits échantillons de données. Le contexte applicatif est l'étude de l'angiogenèse tumorale et de l'effet des traitements anti-cancer sur le développement du réseau vasculaire.

Mots-clés: modélisation, identification, contrôle, thérapie photodynamique, système biologique

Abstract

The presented works are divided into two main parts and deal with biological applications to cancer, and more specifically to their treatments. The first part is dedicated to a technological research, in which a new device is designed and built to efficiently control the cytotoxic phase of photodynamic therapy. This anti-cancer therapy involves three main compounds : a photosensitizer agent, oxygen and light. The proposed solution relies on the control of an observable therapeutic indicator during the treatment : the photobleaching phenomenon. The developed control system uses a state observer which required to solve practical identifiability issues and the identification of a non-linear process. It has been implemented in a technical platform and validated during *in vitro* tests. A patent application for this device is currently under review. The second section of this thesis deals with the applicability of continuous-time identification approaches to three biological systems from image sequences recorded at cellular, tissue and animal scales. A first study examines how continuous-time system identification may be used to determine a pharmacokinetic compartmental model of multifunctional nanoparticles within rat brain from *in vivo* MRI images. The second study deals with the empirical modeling of the junctional intercellular communication functionalities. The purpose is to discriminate two cancer cells types from their fluorescence recovery dynamics. Finally, a third study case addresses the issue of identifying a systems cohort from small amount of data. The applied context is the study of tumoral angiogenesis and the anti-cancer treatment effects on vascular network development.

Keywords: modeling, system identification, automatic control, photodynamic therapy, biological system

