



UNIVERSITÉ DE
SHERBROOKE

Faculté de génie
Génie électrique et génie informatique

Architecture 3D sans contact
et localisation par temps de vol
pour tomographie optique diffuse par fluorescence

Mémoire de maîtrise ès sciences appliquées
Spécialité: génie électrique

Vincent ROBICHAUD

Sherbrooke (Québec) Canada

Décembre 2007

IV - 1854



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-43013-2
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-43013-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

À ma famille, Claude, Hélène et Stéphanie

RÉSUMÉ

La tomographie optique diffuse (TOD) désigne une technique d'imagerie biomédicale non-invasive. L'objectif ultime consiste à réaliser à l'aide de la lumière et de techniques optiques ce que l'on fait avec les techniques d'imagerie médicale mieux connues comme la tomodensitométrie (TDM; « X-ray computed tomography » (CT)), la tomographie d'émission par positrons (TEP), ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Utilisée de façon traditionnelle, la TOD permet de retrouver la distribution spatiale des coefficients d'absorption et de diffusion optique dans les tissus biologiques. Avec l'utilisation des agents fluorescents, l'imagerie moléculaire est devenue un domaine très actif de la TOD. Exploiter ces agents par une technique de TOD par fluorescence (TODF) permet de visualiser non-invasivement et en 3D les processus *in vivo* jusqu'à une profondeur d'environ 3 cm, ce que la microscopie optique ne peut pas faire. Plusieurs prototypes de systèmes TODF existent présentement. Le désavantage majeur que l'on y retrouve souvent est qu'il s'agit de systèmes exigeant des mesures avec contacts (utilisation de fibres optiques ou de fluides adaptateurs). Le problème rencontré avec une telle architecture en imagerie sur petit animal réside dans la difficulté d'amener des fibres optiques en contact avec l'animal. L'utilisation de fluides adaptateurs est également problématique puisqu'il est très difficile de mettre l'animal dans le fluide sans le noyer ; et cela sans compter que les fluides apportent une atténuation et de la diffusion supplémentaire, le signal optique menant à des mesures plus bruitées. Des systèmes sans contact ont donc vu le jour, mais la majorité ont le même problème : ils n'exploitent qu'une partie de l'information pouvant être recueillie. Seules des mesures en rétrodiffusion ou transillumination sont faites, mais aucun système ne combine les deux. Des mesures en rétrodiffusion/transillumination fournissent davantage d'information ce qui permet de sonder plus profondément les tissus tout en gagnant au niveau de la résolution du scanner. Dans le cadre des présents travaux, une architecture 3D sans contact, intégrant une configuration annulaire permettant des mesures en rétrodiffusion/transillumination est présentée. Un autre aspect très présent au niveau des systèmes sans contact est l'utilisation de mesures à régime continu (« continuous wave » (CW)).

Avec de telles mesures, toute dépendance au temps est alors impossible, ce qui signifie une perte d'information. Les mesures résolues en temps (« time-resolved » (TR)) permettent d'exploiter cette dépendance temporelle. Davantage d'information peut donc être utilisée, comme la possibilité de distinguer les différents types de photons. Une technique novatrice permettant la localisation 3D d'une inclusion fluorescente exploitant des mesures TR sera présentée. Des résultats illustrant la localisation d'une inclusion démontrent le potentiel de cette nouvelle approche fondée sur le temps de vol des premiers photons.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier en premier Yves Bérubé-Lauzière pour l'accueil qu'il m'a fait. Je me rappellerai toujours de ce matin de janvier où je suis entré dans son bureau légèrement confus sachant très bien que la date d'inscription pour le trimestre était passée depuis longtemps. Mais pour Yves rien n'est impossible et après quelques coups de fils et discussions avec la direction, je me voyais membre du groupe *TomOptUS*. Je le remercie pour tous ses efforts et surtout pour la grande confiance qu'il a su m'accorder tout au long de ces 2 années. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude et ma sincère amitié. Ce fut un plaisir de l'avoir comme directeur de maîtrise et j'en garderai toujours un très bon souvenir.

Les heures passées au laboratoire n'auraient pas été aussi agréables sans mes collègues. Que dire de mon trio Zola, Vivian et Johanne, avec qui chaque discussion était toute aussi intense, saupoudrée d'histoires toutes aussi intrigantes les unes que les autres. Merci les filles de m'avoir enduré pendant tout ce temps! Ces années n'auraient pas été aussi productives sans Redouane, l'ultime partenaire de babyfoot. Une chance qu'on avait cette activité pour s'oxygéner! En passant partenaire, tu sais que ta passion pour l'architecture saura toujours séduire les femmes! Et finalement que dire de Maxime Comtois notre vétéran. Quelques bières et le voilà fin prêt pour une soirée qui ne sera pas des plus timides! Vraiment merci pour ces petites folies et n'oublie pas : le Quiznos c'est bien meilleur que le Subway. En passant, à quand la prochaine partie de mini-putt ... on va le battre Carl Carmoni!!

Merci également aux membres de ma famille pour leur soutien des plus précieux. Quelle source d'énergie que les voyages de ski, les weekends à la pêche ou encore le très prestigieux Coq d'automne. Et que dire des innombrables heures passées sur le terrain de tennis avec le paternel, des merveilleux plats préparés par ma mère, ou encore des fameux soupers sushis arrosés de vin, gracieuseté de la soeur et du beau-frère. Quoi de mieux pour terminer la semaine! Franchement merci pour tout!

TABLE DES MATIÈRES

1	Introduction	1
I	Définition du projet de recherche	6
2	État de l'art	7
2.1	Fluorescence	7
2.2	Géométrie du scanner	9
2.3	Excitation	12
2.4	Détection	13
2.5	Types de mesures	14
2.5.1	Système à régime continu	14
2.5.2	Mesures résolues en temps	16
2.5.2.1	Mesures dans le domaine temporel	17
2.5.2.2	Mesures dans le domaine fréquentiel	19
2.6	Mesures sans contact	22
2.7	Systèmes de TOD existants	23
2.7.1	Systèmes de Ntziachristos	23
2.7.1.1	Système 1 : Mesures CW	23
2.7.1.2	Système 2 : Mesures CW dans le visible	25
2.7.1.3	Système 3 : Mesure résolue en temps	25
2.7.2	Système de Sevic-Muraca <i>et al.</i>	27
2.7.3	Système de Schulz <i>et al.</i>	28
2.7.4	Advanced Research Technologies Inc. (ART)	29
2.7.5	Xenogen	31

2.7.6	Système tomographique de VisEn Medical	33
2.7.7	Système d'imagerie de Kodak	34
2.7.8	Système d'imagerie du CRI	35
2.7.9	En résumé	36
3	Définition et objectifs du projet	38
4	Méthodologie	40
4.1	Réalisation du prototype de scanner	40
4.2	Algorithme de localisation de la fluorescence	41
4.3	Intégration d'une APD comme détecteur	42
II	Développement du prototype	44
5	Développement du prototype	45
5.1	Description	45
5.2	Temps d'exécution	46
5.3	Contrôle par ordinateur	47
III	Articles	49
6	Optics East 2006 : NCFD	50
6.1	Mise en contexte	50
6.2	Titre de l'article	50
6.3	Auteurs	50
6.4	Résumé de l'article	51
7	Photonics North 2007 : TOF Algorithm	60
7.1	Mise en contexte	60

<i>TABLE DES MATIÈRES</i>	vii
7.2 Titre de l'article	60
7.3 Auteurs	60
7.4 Résumé de l'article	61
8 Optics East 2007 : Détermination de la tranche	73
8.1 Mise en contexte	73
8.2 Titre de l'article	73
8.3 Auteurs	73
8.4 Résumé de l'article	74
9 Photonics North 2007 : APD vs PMT	83
9.1 Mise en contexte	83
9.2 Titre de l'article	83
9.3 Auteurs	83
9.4 Résumé de l'article	84
IV Conclusion	95
V Annexes	99
BIBLIOGRAPHIE	102

LISTE DES FIGURES

2.1.1	Principe de fluorescence	8
2.1.2	Décroissance de la fluorescence et temps de vie de fluorescence	8
2.2.1	Géométries de scanners (TOD par absorption et diffusion)	10
2.2.2	Géométries de scanners (TOD par fluorescence)	11
2.3.1	Configuration typique concernant l'excitation lumineuse	13
2.5.1	Mesure en régime continu (CW)	15
2.5.2	Différents trajets parcourus par les photons	16
2.5.3	Mesure dans le domaine temporel (TD)	17
2.5.4	Mesure dans le domaine fréquentiel (FD)	20
2.7.1	Ntziachristos <i>et al</i> : Système CW	24
2.7.2	Ntziachristos <i>et al</i> : Système CW dans le domaine visible	25
2.7.3	Ntziachristos <i>et al</i> : Système résolu en temps	26
2.7.4	Système de Sevick-Muraca <i>et al</i>	27
2.7.5	Système de Schulz <i>et al</i>	28
2.7.6	Système d'imagerie optique développé chez ART	29
2.7.7	Résultats obtenus par le système d'ART	30
2.7.8	Fluctuation du signal au niveau du maximum d'une courbe de TVF	31
2.7.9	Système de tomographie optique développé chez Xenogen	32
2.7.10	Images obtenues avec le système de Xenogen	33
2.7.11	Système tomographique de VisEn Medical (FMT)	33
2.7.12	Système tomographique de VisEn Medical (FMT 2500)	34
2.7.13	Système d'imagerie moléculaire de Kodak	35
2.7.14	Système d'imagerie moléculaire du CRI	35
4.1.1	Prototype préliminaire	41

4.3.1	Configuration typique d'un canal de détection	42
5.1.1	Prototype développé	46
5.3.1	Interface logicielle	48

LISTE DES TABLEAUX

2.7.1 Comparaison des différents systèmes tomographiques pour petits animaux.	37
4.3.1 Diagramme de Gantt du projet	43

LISTE DES SYMBOLES

Symbole	Définition	Unité généralement employée
λ	Longueur d'onde	nm
τ	Temps de vie de fluorescence	ns
μ_a	Coefficient d'absorption	cm^{-1}
μ_s	Coefficient de diffusion	cm^{-1}
μ'_s	Coefficient de diffusion réduit	cm^{-1}

LISTE DES ACRONYMES

Acronyme	Définition
APD\G-APD	Avalanche Photodiode\Geiger mode APD
ART	Advanced Research Technologies
CCD\ICCD	Charge-Coupled Device\Intensified Charge-Coupled Device
CRI	Cambridge Research & Instrumentation
CT	Computed Tomography
CW	Continuous Wave
FWHM	Full Width at Half Maximum
ICG	Indocyanine Green
IMO	Imagerie moléculaire optique
IRM	Imagerie par résonance magnétique
MCP-PMT	Microchannel Plate PMT
MPD	Micro Photon Devices
NCFD	Numerical Constant Fraction Discriminator
PIR	Proche infrarouge
PMT	Photomultiplier Tube
SNR	Signal-to-Noise Ratio
TAC	Time-to-Amplitude Converter
TCSPC	Time-Correlated Single-Photon Counting
TD\FD	Time-domain\Frequency Domain
TDM	Tomodensitométrie
TEP	Tomographie d'émission par positrons
TOD	Tomographie optique diffuse
TODF	Tomographie optique diffuse par fluorescence
TOF	Time of Flight
TPSF\FTPSF	Time Point Spread Function\Fluorescence TPSF
TR	Time-Resolved
TVF	Temps de vie de fluorescence

CHAPITRE 1

Introduction

Placez une lampe de poche sous la paume de votre main dans le noir et vous verrez une faible lueur rouge diffuse à travers celle-ci. Contrairement à ce que l'on pourrait penser à prime abord, les tissus humains ne sont pas opaques à la lumière. En fait, les tissus biologiques laissent relativement bien passer la lumière pour une certaine plage de longueurs d'onde dans le proche infrarouge (PIR) que l'on nomme « fenêtre thérapeutique ». Il s'agit de la région spectrale située entre 600 *nm* et 1100 *nm* [Milstein et coll., 2006; Schmidt et coll., 2000; Benaron et coll., 2000; Hintz et coll., 1998]. La lumière PIR perd environ une décade de son intensité pour chaque centimètre parcouru [Benaron et coll., 2000; Hintz et coll., 1998]. Ainsi, il suffit d'envoyer de la lumière PIR à travers les tissus et d'en récolter la lumière émergente de l'autre côté qui, due à son atténuation, contient des informations sur les tissus traversés. Ce principe a ouvert la voie à une nouvelle technique d'imagerie médicale baptisée la tomographie optique diffuse (TOD).

Bien que les tissus biologiques soient relativement transparents dans le PIR, ces derniers sont constitués d'un grand nombre de structures de formes, de tailles et d'indices de réfraction variés (vaisseaux, cellules, membranes, *etc.*). La lumière se propageant à l'intérieur d'une telle structure est redirigée dans plusieurs directions de façon aléatoire et ne se propage pas en ligne droite. On dit alors qu'elle est diffusée. Ce phénomène de diffusion de la lumière rend les algorithmes de la tomodensitométrie (TDM ou tomographie par rayons X) inappropriés pour reconstruire la distribution spatiale de l'atténuation des tissus et ainsi en obtenir des images¹ [Hillman et coll., 2001; Eda et coll., 1999; Hielscher et coll., 1999]. Il est essentiel de tenir compte de la diffusion et, pour ce faire, de nombreux développements ont été réalisés au niveau des méthodes de détection et des algorithmes de

¹L'utilisation de l'algorithme standard (« Backprojection ») de la TDM en TOD a été étudiée, mais avec un succès limité en terme de résolution [Benaron et Stevenson, 1994; Walker et coll., 1997; Colak et coll., 1997; Turner et coll., 2005]. Cette approche est pratiquement abandonnée maintenant.

reconstruction. Notamment, les méthodes résolues en temps permettent une séparation entre les coefficients d'absorption et de diffusion des tissus [Franceschini et coll., 1997]. Le développement de nouveaux algorithmes de reconstruction tomographique pour tenir compte de la trajectoire non rectiligne de la lumière est actuellement un domaine actif de recherche [Lasser et Ntziachristos, 2007; Herve et coll., 2007; Yalavarthy et coll., 2006]. Les recherches en ce sens feront de la tomographie optique diffuse une technique capable de retracer l'absorption et la diffusion optique.

Dans la communauté médicale, pouvoir imager les propriétés des tissus permet de révéler de l'information significative pour diagnostiquer la présence de structures pathogènes [Ripoll et coll., 2003]. C'est ce qui a motivé le développement de différentes techniques d'imagerie non-invasives telle la TDM, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie d'émission par positrons (TEP). Au niveau optique, la quantification de l'absorption permet une caractérisation chimique des tissus (oxygénation, contenu en mélatanine, quantité d'eau) alors que la quantification de la diffusion permet une caractérisation structurelle des tissus (organisation cellulaire, nombre et grosseur des mitochondries et autres attributs des tissus) [Hintz et coll., 1998]. Par exemple, l'hémoglobine (molécule ayant pour fonction de transporter l'oxygène des poumons aux cellules et le dioxyde de carbone des cellules aux poumons) est un fort absorbant pour la lumière PIR. Responsable de plus de la moitié de l'absorption dans le cerveau humain, elle a pour caractéristique un spectre d'absorption différent selon qu'elle est oxygénée ou désoxygénée. Des contrastes observables peuvent ainsi être obtenus selon son taux d'oxygénation, et permettent du coup d'imager et de quantifier les changements fonctionnels au niveau du volume sanguin [Hillman et coll., 2001; Milstein et coll., 2006; Schmidt et coll., 2000; Benaron et coll., 2000]. Ces contrastes sont notamment observables pour les tumeurs. La concentration sanguine est généralement plus élevée autour d'une tumeur, due à la prolifération des vaisseaux sanguins (angiogénèse pour soutenir le métabolisme plus grand des tissus tumoraux). Ces contrastes reposent sur des agents endogènes (c-à-d des agents naturellement présents dans les tissus). Cela fait de la mammographie optique et de l'imagerie du cerveau des domaines applicatifs importants de la tomographie optique. Cependant, les petites lésions, d'intérêt pour un dépistage précoce, montrent peu de contraste endo-

gène. Pour pallier à cela et étendre les applications de la TOD, l'injection d'agents de contraste exogènes dans le sujet est devenue inévitable [Hawrysz et Sevick-Muraca, 2000; Sevick-Muraca et coll., 2002]. En ce sens, l'utilisation de sondes fluorescentes (fluorophores couplés à des ligands d'affinité) pour étiqueter des macromolécules spécifiques joue un rôle de premier plan [Walker et Wilson, 2005]. Divers types de ligands sont utilisés (ex. anticorps reconnaissant des protéines de surface de cellules) et des sondes ont été développées pour une multitude de processus d'intérêt biologique, principalement pour la microscopie optique. Cette nouvelle avenue ouvre la voie à l'imagerie moléculaire optique (IMO) *in vivo* permettant d'obtenir de l'information sur des processus biomoléculaires bien précis ayant cours à l'intérieur d'organismes vivants intacts. Par exemple, en développement de nouveaux médicaments, les tests sont faits sur de petits animaux. Typiquement, on injecte des sondes fluorescentes dans l'animal capables de retracer l'activité du médicament. L'outil de choix actuellement pour ce type de tests est la microscopie optique. Elle nécessite toutefois le sacrifice de l'animal pour en extraire des minces tranches pour analyse sous le microscope. Sachant qu'une telle étude demande des prises de mesure longitudinales pouvant s'échelonner sur une grande période de temps, un nombre important d'animaux doivent être euthanasiés. L'arrivée de la TOD en IMO est très prometteuse en ce sens, sachant que l'analyse des sondes fluorescentes pourrait être effectuée *in vivo* sans tuer d'animaux, toutefois à plus faible résolution spatiale que la microscopie. Bref, le développement d'un appareil TOD permettant l'imagerie moléculaire recèle un grand potentiel pour devenir une technologie d'imagerie clé. En exploitant la large gamme des sondes fluorescentes déjà développées pour la microscopie optique, cette technologie aurait des applications en diagnostic (notamment du cancer), en développement de nouveaux médicaments, en génomique, en toxicologie chimique, pour ne nommer que celles-ci [Weissleder et Ntziachristos, 2003].

Bien que de nombreuses recherches se fassent actuellement au niveau du développement d'un appareil TOD apte à localiser la distribution spatiale de la fluorescence, bien des défis restent à être relevés. C'est ce sur quoi le groupe *TomOptUS* travaille. L'objectif général du groupe est la conception et la réalisation d'un tomographe optique sans contact pour l'imagerie moléculaire sur petit animal. Il sera question dans le présent mémoire

de travaux reliés à la conception d'un prototype de scanner ainsi que le développement d'un algorithme de localisation de la fluorescence basé sur une approche du temps de vol des premiers photons. L'introduction d'une nouvelle gamme de détecteurs en TOD résolue en temps, soient les photodiodes à avalanche (« avalanche photodiodes » (APD)) est également présentée. Ce mémoire se divise comme suit :

Le chapitre 2 se veut une revue des différents systèmes développés à ce jour pour la tomographie optique diffuse par fluorescence (TODF). À ce sujet, des aspects plus techniques sont d'abord présentés. Il sera question de la fluorescence, des géométries de scanners, de l'excitation, de la détection, des types de mesures ainsi que l'aspect sans contact. Ces notions permettront une meilleure compréhension du domaine de la TOD et seront très utiles lors de la discussion portant sur les différents systèmes.

Les chapitres 3 et 4 définissent les travaux du présent mémoire. On y retrouve les objectifs principaux ainsi que la méthodologie envisagée pour les atteindre.

Le chapitre 5 décrit le prototype de scanner développé. Des caractéristiques relatives au temps d'exécution ainsi que l'interface logicielle sont présentées.

Les chapitres 6, 7, 8, et 9 constituent 4 articles qui ont été publiés dans le cadre des présents travaux de maîtrise. Les trois premiers sont consacrés à des articles montrant le développement d'un algorithme de localisation de la fluorescence basé sur une approche par temps de vol des photons. Le chapitre 6 traite d'une nouvelle approche permettant d'obtenir de l'information au niveau de la profondeur d'une inclusion fluorescente. À cet effet, une technique permettant l'extraction du temps d'arrivée des premiers photons a été développée ; il s'agit de la technique du discriminateur à fraction constante numérique (numerical constant fraction discrimination technique (NCFD)). Le chapitre 7 présente des travaux où la relation *temps vs profondeur* trouvée dans l'article précédent est exploitée pour en déduire la position de l'inclusion dans un plan. Suivent les travaux du chapitre 8 qui se veulent un complément à ceux du chapitre 7. On y discute d'une technique permettant d'aller chercher la troisième dimension, résultant en une localisation spatiale 3D

complète d'une inclusion fluorescente en milieu diffusant. De son côté, le chapitre 9 présente un article portant sur l'utilisation des APDs en TODF résolue en temps.

Enfin, en dernière partie, la conclusion effectue un retour sur ce qui a été fait. Elle traite également de certaines améliorations à apporter au système développé ainsi qu'un aperçu des travaux futurs liés au développement de l'algorithme de localisation.

PREMIÈRE PARTIE

Définition du projet de recherche

CHAPITRE 2

État de l'art

À ce jour, la plupart des systèmes exploitent la nature traditionnelle de la tomographie optique diffuse. Des mesures en rétro réflexion et/ou transmission sont prises dans le but de reconstruire la distribution spatiale de l'absorption et la diffusion dans les tissus. La mammographie optique de même que l'imagerie du cerveau sont de bons exemples de domaines actifs de la TOD [Franceschini et coll., 2006; Colak et coll., 1999; Franceschini et coll., 1997; Franceschini et coll., 2000; Schmidt et coll., 2000; Benaron et coll., 2000; Hintz et coll., 1998; Danen et coll., 1988]. Récemment, avec le développement des sondes fluorescentes qui ne cesse de croître, la TOD a vu son champ d'intérêt s'élargir et s'ouvrir à l'imagerie moléculaire optique (IMO). Actuellement, plusieurs systèmes à l'état expérimental permettent l'imagerie moléculaire sur petit animal. La présente section se veut une revue de ces différents systèmes. Ce faisant, des notions de base telle une compréhension de la fluorescence, de la géométrie du scanner, de l'excitation, de la détection, du type de mesures effectuées ainsi que l'aspect sans contact sont nécessaires. C'est pourquoi une définition de chacune d'elles est d'abord présentée.

2.1 Fluorescence

En IMO, le but est de localiser *in vivo* la présence d'agents fluorescents qui permettent de cibler des processus cellulaires et biomoléculaires spécifiques. La fluorescence (Fig. 2.1.1) est un phénomène physique qui consiste à exciter une molécule avec de la lumière. Un photon d'excitation entrant en collision avec la molécule est absorbé avec une certaine probabilité, et en cas d'absorption, transfère alors son énergie à un électron, menant la molécule dans un état d'excitation. Dans cet état, la molécule devient alors instable et voulant revenir à son état initial, l'électron perdra son énergie. En fluorescence, l'énergie perdue se fait typiquement en deux étapes : en premier lieu une petite quantité est perdue

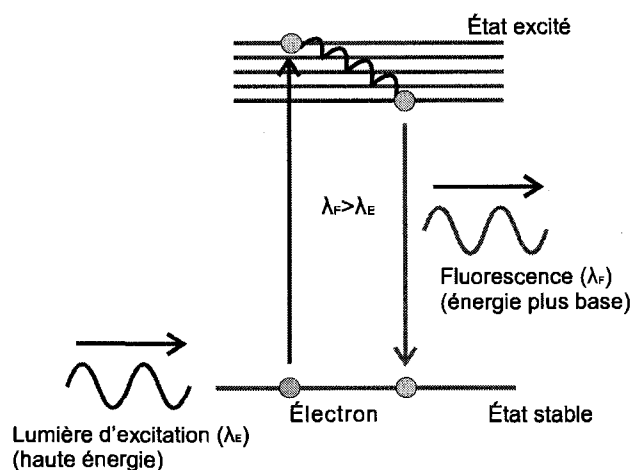
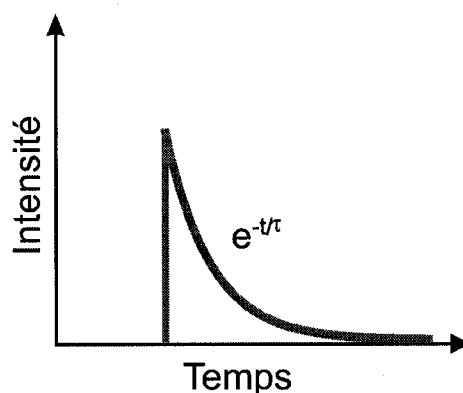


Figure 2.1.1 Principe de fluorescence

sans émission lumineuse (transition non-radiative) et par la suite une grande quantité est perdue résultant en l'émission d'un photon de lumière (transition radiative). L'énergie ($E = h\nu$) du photon émis étant plus petite que celle du photon absorbé (ceci étant nécessaire pour ne pas violer le principe de conservation de l'énergie), la longueur d'onde ($\lambda = c/\nu$) de réémission sera plus longue (couleur différente).

Figure 2.1.2 Décroissance de la fluorescence et temps de vie de fluorescence ($\tau = TVF$).

Suite à une excitation ultra-brève de molécules fluorescentes, la fluorescence émise décroît et mettra un certain temps avant de disparaître complètement. Le *temps de vie de fluorescence* (*TVF*) caractérise le taux moyen de cette décroissance qui est généralement de forme exponentielle ; la figure 2.1.2 montre une courbe typique de ce phénomène. Ce

paramètre est une source d'informations qui mérite d'être exploitée. En effet, le TVF dépend des paramètres chimiques environnants (pH, oxygénation, concentration de glucose, ou autres substances [Cubeddu et coll., 2002; Lakowicz, 1999]). Sachant que des changements du TVF sont reliés au degré de liaison d'une sonde fluorescente à des tissus malins, ses caractéristiques permettent en principe d'évaluer quantitativement la concentration d'analytes et de détecter la présence de tissus malins *in vivo*. Toutefois, bien du travail reste encore à faire pour exploiter les approches basées sur le TVF, mais citons cependant les travaux récents suivants qui vont en ce sens : Kumar et coll. 2006; Soloviev et coll. 2007; Godavarty et coll. 2005; Kumar et coll. 2008.

2.2 Géométrie du scanner

À la base d'un système tomographique optique se trouve une source d'excitation qui illumine l'objet et des détecteurs qui récoltent la lumière qui en ressort. La lumière récoltée peut être de type rétrodiffusée (*i.e.* réfléchi), transmise, ou de type intermédiaire à ces deux cas. Cette lumière récoltée dépend de la géométrie du scanner. Plusieurs arrangements *sources/détecteurs* existent et ont été discutés par Pogue et al. [Pogue et coll., 1999] dans le cadre de l'imagerie intrinsèque en absorption et diffusion (*i.e.* pas d'utilisation d'agents fluorescents). On retrouve *i)* la tomographie par rétrodiffusion (source et détecteur du même côté), *ii)* la tomographie par transillumination (source d'un côté, détecteur de l'autre), *iii)* la tomographie par rétrodiffusion/transillumination. Chacun de ces arrangements peut être exploité de façon circulaire ou linéaire (Fig. 2.2.1).

En analysant ces différentes configurations, on remarque que dans le cas de l'architecture en transillumination, l'information recueillie se limite essentiellement aux photons qui ont traversé le tissu (photons transmis). Toute la portion des photons rétrodiffusés est perdue. Ainsi dans le cas où l'information désirée (ex : présence d'une inclusion absorbante) serait située proche de la surface opposée des détecteurs (Fig. 2.2.1 (b)), l'information la plus utile serait évidemment contenue dans les photons rétrodiffusés. Or la seule information obtenue se fera par le biais de mesures en transilluminations où le rapport signal sur bruit (SNR) risque d'être très faible. On peut aussi penser au cas opposé où l'information

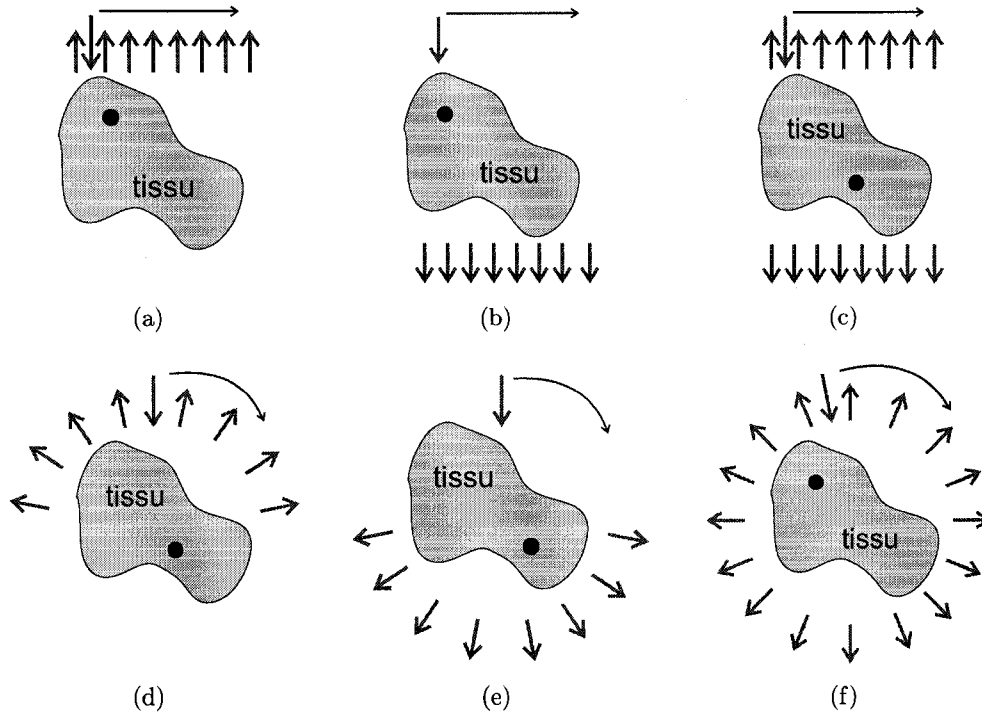


Figure 2.2.1 Illustration de géométries possibles de scanner (adapté de *Pogue et al.* [Pogue et coll., 1999]). Les flèches sortant du milieu représentent la position des détecteurs et les flèches dirigées vers l'intérieur du milieu représentent la position de la source d'excitation. L'inclusion à l'intérieur du milieu illustre la présence de tissus malins. (a) imagerie linéaire par rétrodiffusion (b) imagerie linéaire par transillumination (c) imagerie linéaire combinant rétro/transillumination (d) imagerie circulaire par rétrodiffusion (où le bloc source/détecteur tourne autour du milieu) (e) imagerie circulaire par transillumination (où le bloc source/détecteur tourne autour du milieu) (f) imagerie circulaire combinant rétro/transillumination.

désirée serait située proche de la surface opposée (donc très loin) de la source excitatrice (Fig. 2.2.1 (e)). Dans ce dernier cas la lumière incidente qui atteindra la zone en question sera très faible entraînant là aussi une détection à faible SNR. Des mesures en rétrodiffusion avec la source illuminant de près la région d'intérêt seraient alors plus adéquates.

Au niveau de l'architecture par rétrodiffusion, le même problème se pose à l'exception que cette fois-ci on ne récolte que des photons rétrodiffusés. Tous les photons traversant le tissu sont perdus. Dans ce cas, une information qui est éloignée de la surface où est située la source et les détecteurs (Fig. 2.2.1 (d)) engendrera des mesures à faible SNR.

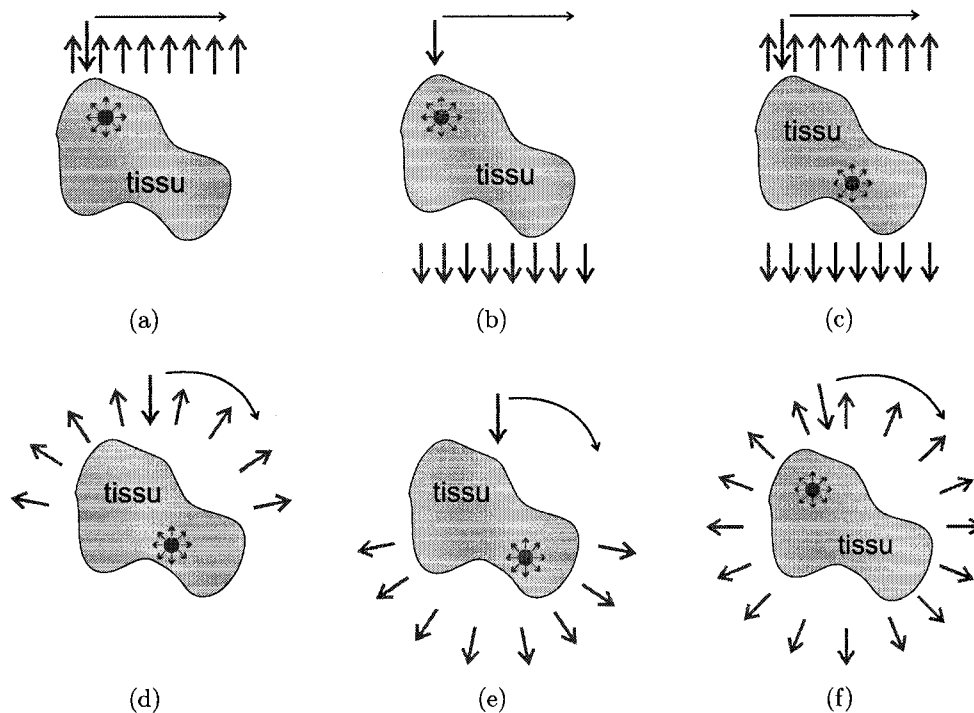


Figure 2.2.2 Reprise de la figure 2.2.1 mais cette fois-ci l'inclusion à l'intérieur du milieu illustre la présence de fluorescence.

Comme à prime à bord on ne connaît pas la position de l'inclusion dans le milieu, on ne peut savoir quel type de mesure sera le plus adéquat. Exploiter à la fois la lumière transmise et rétrodiffusée devient donc un grand atout. Davantage d'information « utile » est recueillie, ce qui permet de sonder plus profondément les tissus tout en gagnant au niveau de la résolution du scanner.

Dans le cas où il y a présence d'un traceur fluorescent (Fig. 2.2.2), les mêmes enjeux que pour la TOD par absorption et diffusion se présentent. La lumière produite par ce dernier agit du point de vue du scanner comme une source additionnelle interne au sujet, qui sera collectée par les détecteurs. Dans le cas de la fluorescence, la lumière est réémise de façon uniforme dans toutes les directions. Il apparaît donc important dans ce cas de détecter tout le tour du milieu dans lequel baigne la fluorescence.

En général, une augmentation du nombre de mesures améliore jusqu'à un certain point la qualité de la reconstruction de l'image [Lasser et Ntziachristos, 2007]. Il faut prendre soin d'utiliser des projections permettant un échantillonnage homogène entier de la zone d'intérêt et maximisant le nombre d'angles sur lesquels les mesures seront prises. En d'autres mots, la capacité à imager un objet s'accroît avec l'augmentation du nombre de projections angulaires autour de l'objet. Par conséquent, le balayage angulaire que permet la configuration circulaire en *rétrodiffusion/transillumination* est l'architecture qui permet l'obtention des meilleures images [Pogue et coll., 1999]. De ce fait, la version linéaire est très limitée lorsqu'il est question d'obtenir de l'information en profondeur, due à son manque de projections angulaires. On note enfin que plus le nombre de projections angulaires croît, moins la densité spatiale des détecteurs a besoin d'être grande [Turner et coll., 2005]. Cela veut dire que pour parvenir à une résolution spatiale équivalente, il faudrait plus de détecteurs dans le cas d'un système linéaire que dans celui à géométrie annulaire.

2.3 Excitation

En considérant une géométrie annulaire, plusieurs scénarios sont possibles pour illuminer le sujet sous plusieurs angles (Fig. 2.3.1) : source d'excitation tournant autour de l'objet, source fixe où l'on fait tourner le sujet, ou encore plusieurs sources fixes activées à tour de rôle. Dans le dernier cas, on peut simplifier en n'utilisant qu'une seule source fixe commutée vers plusieurs points d'illumination autour du sujet [Pogue et coll., 1997; Schmidt et coll., 2000; Hintz et coll., 1998].

En général, l'excitation lumineuse est produite par un ou des laser(s) (habituellement des diodes lasers, ou un laser Ti:Sapphire) [Ntziachristos et coll., 2004; Hillman et coll., 2001; Turner et coll., 2005; Montcel et coll., 2005; Gibson et coll., 2005]. Tout dépendant du tissu sous investigation ou de la sonde fluorescente utilisée, on choisira une longueur d'onde adéquate de manière à maximiser le contraste entre le phénomène observé et son environnement. La plage de longueurs d'onde à utiliser est préférablement dans la fenêtre thérapeutique, soit entre 600 *nm* et 1100 *nm*, en raison de la faible atténuation par les

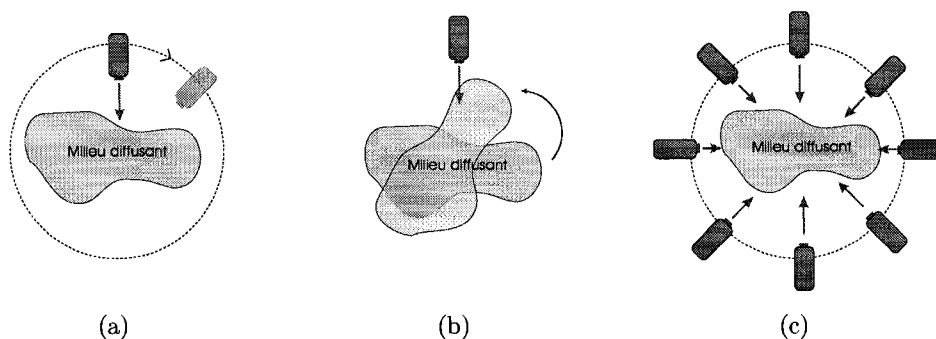


Figure 2.3.1 Configuration typique concernant l'excitation lumineuse (a) Une seule source mobile autour de l'objet (b) Une source fixe et où l'on fait tourner l'objet (c) Plusieurs sources autour de l'objet.

tissus biologiques. La source d'excitation peut soit être en régime continu, être modulée ou pulsée. Cela dépend du type de mesures ; sujet qui sera abordé à la section 2.5.

2.4 Détection

Tout comme l'excitation, la détection peut être effectuée sous diverses configurations. Les plus typiques utilisent plusieurs détecteurs individuels disposés autour de l'objet (soit un anneau) ou encore font appel à un bloc-détecteur¹ que l'on bouge. L'avantage d'un anneau de détecteurs est la récolte de toute la lumière (transmise et rétrodiffusée) en une lecture, permettant des prises de mesures plus rapides. Dans le cas d'un bloc-détecteur, si l'on désire obtenir l'information provenant des différents types de lumière, il faut pour une position d'excitation donnée, balayer l'objet par une série de mesures en déplaçant le bloc, d'où un temps de mesure plus long.

Les détecteurs peuvent être des tubes photomultiplicateurs (*photomultiplier tube (PMT)*), des photodiodes, des photodiodes à avalanches, des caméras CCD ou encore des caméras à balayage ultrarapides (*streak camera*). Dépendamment du type de mesure effectuée (voir section 2.5), certains détecteurs peuvent être plus adéquats que d'autres. Dû à l'intensité lumineuse qui varie beaucoup, le système de détection doit pouvoir accommoder une plage

¹Regroupement de détecteurs ne couvrant qu'une partie de l'objet permettant une configuration de détection en éventail ou « fan-beam ».

dynamique d'environ 80 dB de manière à obtenir des images de bonne qualité [Siegel et coll., 1999]. En présence de traceur fluorescent, il est nécessaire d'effectuer une discrimination des longueurs d'onde de manière à ne récolter que le signal de fluorescence et non le signal dû à la source d'excitation. L'utilisation de filtres optiques permet cette sélection en longueur d'onde.

À cause de contraintes mécaniques, une configuration où l'on aurait une série de sources d'excitation autour du sujet combinée à un anneau de détecteurs serait difficilement réalisable faute d'espace. Une telle configuration serait également très dispendieuse vu la quantité de sources et de détecteurs requise. La configuration à préconiser serait celle intégrant un anneau de détecteurs avec une seule source d'excitation fixe où l'on ferait tourner l'objet au centre. Tout en étant plus économique (une source d'excitation), elle est plus simple dans la mesure où il est plus facile de faire tourner l'objet que la source d'excitation dans le cas de petits animaux. De plus, par son anneau de détecteurs, on serait en mesure, pour une position d'excitation donnée, de récolter toute l'information en une seule prise.

2.5 Types de mesures

Il existe en TOD différentes approches de prises de mesures. Chacune d'elle comporte évidemment des avantages et des inconvénients, que ce soit au niveau de leur simplicité, leur coût, leur résolution spatiale, leur sensibilité, etc. Un résumé de chacune d'elles est présenté.

2.5.1 Système à régime continu

Les mesures à régime continu (*continuous-wave (CW)*) sont sans aucun doute celles qui nécessitent le système le plus simple et le moins dispendieux. Il s'agit en fait d'enregistrer l'intensité de la lumière transmise et/ou rétrodiffusée suite à l'illumination de l'objet avec une source lumineuse continue (Fig. 2.5.1).

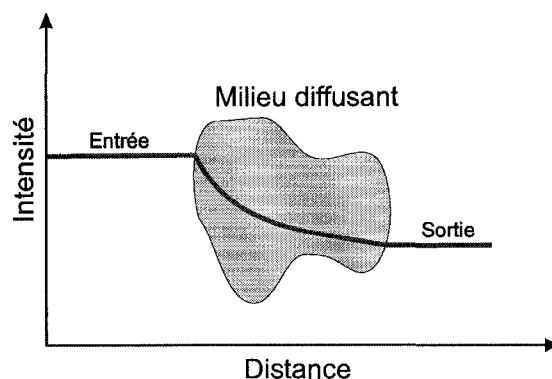


Figure 2.5.1 Mesure en régime continu (CW)

La source d'excitation est habituellement une diode laser et la détection est faite par des photodiodes [Schmitz et coll., 2002] ou une caméra CCD refroidie [Schulz et coll., 2005]. Dans le cas de systèmes à photodiodes, aucun élément électronique sophistiqué n'est nécessaire; ce qui fait d'elle une approche très économique. Il s'agit de mesures qui sont simples à faire et comportant un temps d'acquisition court. Le problème avec les mesures CW est qu'elles ne permettent pas la séparation des coefficients d'absorption et de diffusion avec une seule longueur d'onde [Gibson et coll., 2005]. La solution est donc d'aller sonder l'objet à plusieurs longueurs d'onde. Pour ce faire, on peut multiplexer temporellement les longueurs d'onde au détriment d'un temps d'acquisition plus long. De manière à ne pas ralentir l'acquisition des données, un multiplexage fréquentiel est souhaitable en modulant différentes sources lumineuses à basse fréquence (quelques kHz), ce qui permet la mesure simultanée à plusieurs longueurs d'onde. À la détection, un *lock-in amplifier* permet la séparation des différents signaux [Gibson et coll., 2005]. Sonder à plusieurs longueurs d'onde permet d'aller chercher différents contrastes causés par des atténuations différentes de ces dernières. Cela permet du même coup la différenciation des effets reliés à l'absorption et à la diffusion. Néanmoins, la présence de milieux hétérogènes au niveau des propriétés optiques rend impossible de localiser et de quantifier le changement d'absorption [Hillman et coll., 2001]. Des mesures en régime continu sont adéquates pour effectuer de l'imagerie en surface ou à travers de faibles épaisseurs de tissus et où la résolution n'est pas un critère de premier choix. Par exemple, une application active de la tomographie à régime continu consiste à l'étude des changements hémodynamiques et d'oxygénation dans les

tissus superficiels, comme en imagerie du cortex cérébral [Gibson et coll., 2005]. Il reste que cette approche rend impossible toute mesure reliée à la dépendance au temps. Or de riches informations peuvent être obtenues par des méthodes de mesures exploitant l'information temporelle, que l'on nomme « *time-resolved (TR)* ».

2.5.2 Mesures résolues en temps

En tomographie optique, lorsqu'on illumine un milieu diffusant avec de la lumière, les photons parcourront divers trajets selon qu'ils ne sont pas diffusés (photons balistiques), qu'ils sont peu diffusés (photons serpentiles ou *snake photons*), ou qu'ils sont fortement diffusés (photons diffus). La figure 2.5.2 illustre la situation.

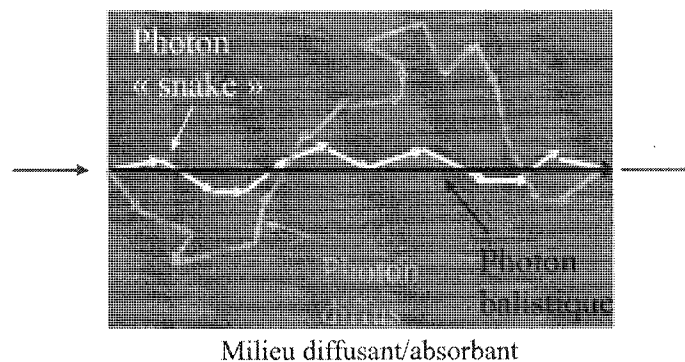


Figure 2.5.2 Différents trajets parcourus par les photons

La difficulté avec des mesures CW est qu'il n'est pas possible de distinguer les photons parcourant ces divers types de trajets. Plus un photon subit des diffusions, plus long est son trajet dans le milieu et donc plus il prendra de temps pour atteindre le détecteur. C'est ce raisonnement qui est à la base des mesures résolues en temps, introduites à la fin des années 1980 - début des années 1990 [Svanberg, 2004]. La distribution des photons dans un milieu diffusant, absorbant et éventuellement fluorescent (via l'injection d'un traceur) est très riche en contenu et permet d'extraire de l'information spatiale relative à l'absorption, la diffusion et à la fluorescence du milieu. Ces temps de transit sont obtenus via des mesures résolues en temps (TR measurements). En imagerie moléculaire, les mesures TR

permettent également de trouver le temps de vie de fluorescence (TVF) ; une information très utile à des fins de diagnostic tel que discuté précédemment.

Il existe deux approches pour réaliser des mesures résolues en temps. On peut les faire directement dans le domaine temporel (*time-domain (TD)*) ou dans le domaine fréquentiel (*frequency-domain (FD)*). Les approches TD et FD sont en théorie reliées par une *transformée de Fourier*.

2.5.2.1 Mesures dans le domaine temporel

Ce type de mesure permet de reconstruire directement la distribution temporelle (*temporal point spread function (TPSF)*) des photons ayant voyagé à l'intérieur d'un milieu diffusant. Pour ce faire, on envoie des pulses d'excitation lumineux très brefs ($<100\text{ ps}$) et suite à leur propagation dans le milieu diffusant, la durée des pulses résultant s'étendra sur plusieurs nanosecondes due aux différents temps de transit des photons causés par leur diffusion dans le milieu (Fig. 2.5.3). Grossièrement, pour les propriétés optiques typiques des tissus biologiques, le pulse s'élargit de l'ordre de 1 ns pour chaque cm de tissus traversé.

Dans le cas de mesures en absorption/diffusion, le temps auquel le maximum de la TPSF est atteint dépend du coefficient de diffusion (μ_s) alors que la pente décroissante de la courbe dépend du coefficient d'absorption (μ_a) [Hielscher, 2005]. Une TPSF peut être vue comme la fonction de transfert résultant du milieu diffusant et de la réponse du système de mesure. En déconvoluant la réponse du système à la TPSF il est possible de retrouver la fonction de transfert associée uniquement au milieu en question. Ce type de mesure

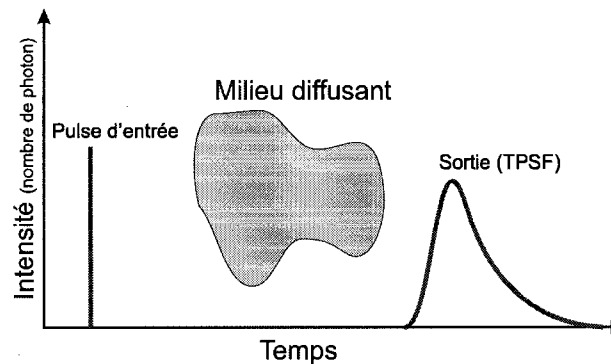


Figure 2.5.3 Mesure dans le domaine temporel (TD)

nécessite cependant des équipements spécialisés ; ce qui fait d'elle une technique plus dispendieuse que les autres. En effet, il faut faire appel à une source lumineuse capable de générer des pulses très brefs, à des détecteurs très sensibles et possédant une grande résolution temporelle. Une des premières techniques utilisées à cet effet fut la caméra à balayage ultrarapide (*streak camera*) [Wu et coll., 1995; Wu et coll., 1997]. Bien que ce type de caméra possède la meilleure résolution temporelle (< 1 ps [Hebden et coll., 1997]), elle reste un système très dispendieux où la surface de collection est petite limitant ainsi le nombre de canaux de détection simultanés (8 est typiquement le nombre maximal de canaux pouvant être mesurés par une *streak camera* en utilisant des fibres optiques présentées à son entrée). Les systèmes de comptage de photons corrélé en temps dont les performances se sont constamment améliorées (*Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC)*) ont pris la relève en raison de leur coût moindre [Gibson et coll., 2005]. Ce type de détection est basé sur un convertisseur temps-à-amplitude (time-to-amplitude converter (TAC)) permettant de mesurer le temps de vol des photons [Becker]. Dans ces systèmes, des tubes photomultiplicateurs (*photomultiplier tube (PMT)*) sont habituellement utilisés comme détecteurs. Bien que la résolution soit moindre que celle de la *streak camera* (environ 30 ps avec MCP PMT à 25000 \$ ch., 200 ps étant plus typique), cela suffit pour les applications en tomographie optique. Les PMTs possèdent une aire de collection d'un diamètre atteignant habituellement 10 mm. D'autres alternatives existent : par exemple la technique d'intégration « boxcar » (« boxcar integrator ») utilisée par le passé en imagerie optique [Chance et Kaufmann, 1995]. Cette technique utilise des mesures du nombre de photons à l'aide d'un détecteur ponctuel (typiquement une PMT) dans une tranche temporelle avec un délai spécifique. L'acquisition de plusieurs tranches temporelles décalées successivement dans le temps (balayage du délai de la tranche et possiblement changement de sa largeur) permet de reconstruire la TPSF. Cette technique a le désavantage que pour une tranche donnée, tous les photons en dehors de la tranche sont perdus et ne contribuent pas au résultat. Ceci rend le temps d'acquisition très lent comparativement aux systèmes TCSPC où chaque photon détecté contribue à l'acquisition de la TPSF [Becker et coll., 2005]. L'approche TCSPC permet également une meilleure linéarité temporelle et une plus grande plage dynamique [Schmidt et coll., 2000]. Une variante de l'approche

boxcar est d'utiliser une caméra CCD intensifiée à crénelage temporel (time-gated ICCD) au lieu d'un détecteur ponctuel. Cela permet d'obtenir le nombre de photons dans une tranche temporelle spécifique [Zacharakis et coll., 2005] sur un élément de surface.

Un système TD permet également de détecter l'arrivée des premiers photons. Exploiter cette information est très intéressant. Les photons ayant le temps de transit le plus court ont parcouru le chemin le plus court parmi tous les photons. La diffusion de ces photons est donc moindre et cela rend possible l'utilisation d'algorithmes de reconstruction plus simples [Turner et coll., 2005]. Cette approche est également très prometteuse au niveau de la localisation des agents fluorescents par temps de vol [Robichaud et Bérubé-Lauzière, 2007b; Robichaud et Bérubé-Lauzière, 2007a].

Évidemment des mesures en domaine temporel exigent un temps de collection plus long que tout système procédant à des mesures CW ou à des mesures dans le domaine fréquentiel, qui est de l'ordre de la seconde [Schmitz et coll., 2002]. Malgré cela et malgré leur coût plus élevé, les mesures TD permettent potentiellement de recueillir davantage d'information pour la reconstruction de l'image et d'obtenir une meilleure résolution spatiale [Cai et coll., 1996], se traduisant en images plus nettes.

2.5.2.2 Mesures dans le domaine fréquentiel

Les techniques dans le domaine fréquentiel ne permettent pas une mesure directe de la distribution du temps de transit des photons dans le milieu. On procède plutôt en modulant l'intensité d'une source lumineuse (typiquement de 100 MHz à 1 GHz) et l'on mesure l'amplitude et la phase de la lumière transmise ou rétrodiffusée par rapport à l'onde incidente (Fig. 2.5.4). Ceci est équivalent à mesurer la transformée de Fourier de la réponse temporelle du milieu. En effet, si $h(t)$ est la réponse temporelle du milieu lorsqu'il est illuminé par une impulsion infiniment brève (*i.e.* sa fonction de transfert), alors la réponse temporelle du milieu à une excitation sinusoïdale $Ae^{j\omega t}$ sera donnée par la convolution de cette excitation avec $h(t)$, ce qui donne $\hat{h}(\omega)e^{i\omega t}$. Donc les mesures FD nous donnent $\hat{h}(\omega) = \left| \hat{h}(\omega) \right| e^{i \arg(\hat{h}(\omega))}$. Or, il est techniquement impossible de prendre des mesures à toutes les fréquences. De plus, le contenu en fréquence d'une TPSF s'étale jusqu'à plusieurs GHz. Même si l'électronique des systèmes FD est capable de supporter

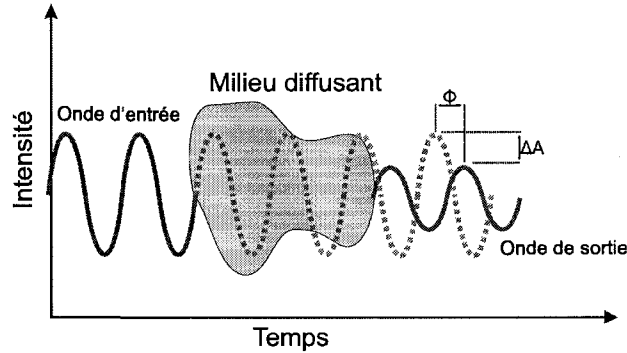


Figure 2.5.4 Mesure dans le domaine fréquentiel (FD)

de telles fréquences, il n'y a pas de détecteurs assez sensibles pour opérer dans cette plage et il n'est actuellement pas encore possible de moduler une source lumineuse à de telles fréquences [Gibson et coll., 2005]. On est donc limité à mesurer une partie de la réponse fréquentielle, ce qui rend impossible de faire une transformée de Fourier inverse pour obtenir la réponse temporelle exacte. Pour pallier à cette difficulté, on a généralement recours à un modèle analytique de la réponse temporelle et on fait une régression (un « *fit* ») pour retrouver les paramètres de ce modèle à partir des mesures FD. Prenons par exemple la mesure d'une courbe de TVF sans absorption ni diffusion².

Dans ce cas, le modèle est une exponentielle décroissante de la forme

$$g(t) = Ae^{-\frac{t}{\tau}}, \quad (2.1)$$

où l'on suppose que la décroissance commence à $t = 0$. Pour avoir son équivalent dans le domaine des fréquences, il faut procéder à sa transformée de Fourier ($\omega = 2\pi f$) :

$$\hat{g}(\omega) = \frac{A}{2\pi} \int_0^{+\infty} e^{-(i\omega + \frac{1}{\tau})t} dt = \hat{g}(\omega) = \frac{A}{2\pi} \frac{1}{(\frac{1}{\tau} + i\omega)}$$

$$\hat{g}(\omega) = \frac{A}{2\pi} \frac{\tau}{(1 + i\omega\tau)} = \hat{g}(\omega) = \frac{A\tau}{2\pi} \frac{e^{-i \arctan(\omega\tau)}}{\sqrt{1 + \omega^2\tau^2}} \quad (2.2)$$

²Dans le cas où on voudrait tenir compte de la diffusion/absorption, on pourrait utiliser un modèle du type de celui développé par Patterson *et al* [Patterson et coll., 1989]

où $\phi(\omega) = -\arctan(\omega\tau)$ est l'information de phase et $\frac{A\tau}{2\pi\sqrt{1+\omega^2\tau^2}}$ donne l'information d'amplitude.

Pour reconstruire la courbe temporelle, comme on n'a qu'un échantillonnage limité, on utilisera ce modèle dans le domaine fréquentiel pour retrouver les paramètres A et τ du modèle temporel de la TPSF. Nous avons donc besoin d'une information d'amplitude et de phase et ce, pour toutes les fréquences.

Avec les valeurs de déphasage obtenues pour plusieurs fréquences, il est alors possible d'effectuer un « *fit* » de l'équation 2.2 à ces données pour déterminer la valeur de τ . Une fois trouvée, on rapporte cette valeur de τ dans l'équation de l'amplitude pour déterminer la valeur de A à partir des données en amplitude mesurées. En somme, l'intensité et la valeur du TVF (τ) sont en gros équivalentes à l'amplitude et au déphasage recueillis par une méthode fréquentielle.

À cause des limitations de la technique FD qui viennent d'être mentionnées, davantage d'informations permettant une meilleure distinction entre le coefficient d'absorption et de diffusion sont obtenues par des mesures TD qui n'ont malheureusement aucune équivalence dans le domaine fréquentiel [Gibson et coll., 2005]. De plus, dans le cas d'imagerie de tissus très épais (>6 cm), l'intensité de la lumière résultante est très faible (possibilité de n'obtenir que quelques photons lors de la détection). Le cas échéant, la seule technique assez sensible pour détecter un tel signal est le comptage de photons (mesures TD). De plus, la détection des premiers photons est également impossible par des mesures FD. La TPSF retrouvée par des mesures en domaine fréquentiel est une reproduction imparfaite de celle que l'on aurait directement obtenue par des mesures temporelles. Notamment, au temps $t = 0^+$, qui correspond à l'arrivée des premiers photons, il est impossible de résoudre avec exactitude cette portion en FD. Seules des mesures TD permettent une détection exacte de ces premiers photons.

Malgré leur moins bonne sensibilité et leur moins bonne résolution, les systèmes FD sont beaucoup moins dispendieux et permettent un temps de collection plus court donnant lieu à des taux d'acquisition pouvant aller jusqu'à 50 Hz. [Gibson et coll., 2005], ce qui est

beaucoup rapide qu'un système TD. La source lumineuse est habituellement une diode laser dont l'intensité est modulée par un oscillateur générant des ondes radiofréquences. Du côté de la détection, on peut utiliser des tubes photomultiplicateurs, des photodiodes ou encore des caméras CCD. Cela dépend en fait de la sensibilité désirée. Tout comme un système CW, un système FD permet de sonder le milieu à plusieurs longueurs d'onde simultanément. Il s'agit alors d'effectuer un multiplexage fréquentiel en modulant différentes sources lumineuses à différentes fréquences de modulation [Franceschini et coll., 1997; Chance et coll., 1998], ce qui est impossible dans le cas d'un système TD. Il est ainsi possible d'aller chercher différents contrastes dus à des atténuations à différentes longueurs d'onde en une seule mesure. On peut aussi effectuer ce multiplexage temporellement [Danen et coll., 1988; Eda et coll., 1999; Schmitz et coll., 2002]. Dans ce cas, le temps d'acquisition sera d'autant plus long que le nombre de longueurs d'onde utilisées pour sonder sera grand.

2.6 Mesures sans contact

Un autre sujet très actuel en TOD est l'aspect dit « sans contact ». Jusqu'à récemment, la majorité des systèmes utilisaient une approche avec contact. Typiquement, on retrouvait des fibres optiques en contact avec le sujet pour acheminer la lumière d'excitation jusqu'au sujet et pour détecter le signal qui en ressort [Pogue et coll., 1997; Schmidt et coll., 2000; Hintz et coll., 1998]. Cette approche avec contact permet une simplification des algorithmes de reconstruction. En effet, sachant qu'il existe deux modes de propagation de la lumière, soit en espace libre dans l'air et en régime diffusant/absorbant dans l'objet, cette approche permet d'éliminer la portion voyageant dans l'air libre. Seule la propagation dans le sujet est présente. Une autre approche simplifiant la reconstruction consiste à réduire l'objet en une forme géométrique simple (typiquement cylindrique). L'approche la plus commune consiste à plonger l'objet dans un fluide ayant des propriétés optiques semblables à ce dernier. En plus d'impliquer un montage plus complexe, cette technique introduit davantage d'absorption et de diffusion provoquant une dégradation du SNR et de la résolution [Ripoll et coll., 2003].

Avec la venue de l'IMO, en particulier sur petit animal, la mise en contact de fibres optiques avec l'animal est une tâche très fastidieuse en pratique, voire irréalisable. Une solution courante à ce problème est de restreindre l'animal à l'intérieur d'une chambre contenant un fluide adaptateur d'indices, toujours dans le but de le transformer en une géométrie de base [Ntziachristos et coll., 2004]. Or, en plus d'affecter la résolution, la chambre peut engendrer des déformations sur l'animal ce qui n'est pas souhaitable, sans compter que de plonger ce dernier dans un liquide sans le noyer n'est pas une tâche évidente. Une technique sans contact permettant l'imagerie de formes arbitraires est donc de mise. Dans ce cas, il est absolument nécessaire de connaître la forme extérieure de l'objet pour être en mesure de distinguer la portion de la lumière ayant voyagé dans l'air libre de celle ayant voyagé dans l'animal (milieu diffusant/absorbant). Il faut également faire appel à des algorithmes de reconstruction plus complexes tenant compte des différents modes de propagation de la lumière.

2.7 Systèmes de TOD existants

L'analyse des systèmes qui suit porte principalement sur la géométrie du scanner, le type de mesures effectuées ainsi que l'aspect sans contact. Bien que les méthodes de reconstruction 3D de la forme extérieure du sujet de même que les algorithmes de reconstruction soient des aspects importants d'un système de TOD, ces notions dépassent largement le cadre du présent document. Par conséquent, elles ne seront pas élaborées dans la présente revue des systèmes de TOD par fluorescence pour petits animaux.

2.7.1 Systèmes de Ntziachristos

2.7.1.1 Système 1 : Mesures CW

Le groupe de Ntziachristos, au *Massachusetts General Hospital (MGH)* et *Havard*, a plus d'un prototype à son actif. Il a présenté en 2004 un système tomographique pouvant imager la fluorescence à l'intérieur de petits animaux (Fig. 2.7.1) [Schulz et coll., 2004; Ntziachristos et coll., 2004].

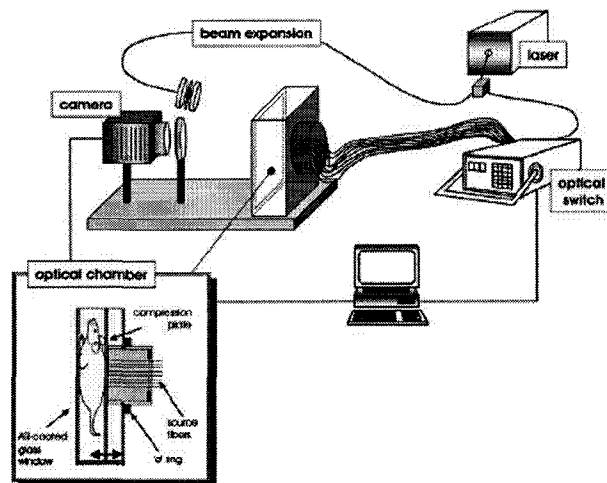


Figure 2.7.1 Ntziachristos *et al* : Système CW [Ntziachristos et coll., 2004]

Bien que ce système n'implique aucun contact direct du détecteur et de la source d'excitation avec l'animal, une chambre contenant ce dernier est utilisée. L'animal est comprimé à l'intérieur de celle-ci et on y introduit un liquide adaptateur d'indice de manière à simplifier sa géométrie [Ntziachristos et coll., 2004]. À tour de rôle, une des 32 fibres optiques d'illumination est activée correspondant à une projection. Le type d'informations recueillies consiste essentiellement en des mesures CW en transillumination.

Il s'agit d'un système simple et économique (une diode laser comme source d'excitation et une caméra CCD pour la détection). Cependant, de par la nécessité de restreindre l'animal dans une chambre, ce système n'est pas réellement sans contact. N'effectuant également que des mesures CW en transillumination, une grande portion de l'information utile est perdue. De géométrie plane, les projections effectuées (de type linéaire) ne maximisent pas le nombre d'angles sur lesquels les mesures sont prises, aspect important discuté en section 2.2. La résolution de ce système et sa capacité d'imager l'information en profondeur sont de ce fait limitées. À noter également que toute analyse du temps de vie de fluorescence (TVF) ainsi que l'arrivée des premiers photons sont impossibles avec des mesures CW.

2.7.1.2 Système 2 : Mesures CW dans le visible

En 2005, Ntziachristos et ses collègues ont présenté une nouvelle configuration (Fig. 2.7.2) [Zacharakis et coll., 2005]. La particularité de ce système est la possibilité d'imager dans le domaine visible. En effet, les protéines fluorescentes, pouvant être conçues pour détecter l'expression spécifique de gènes, ont souvent un spectre d'émission fluorescent couvrant les régions du vert et du rouge (500-630 nm). Or les systèmes actuels couvrent habituellement la région du proche infrarouge (650 nm à 1100 nm). Ce système est basé sur un laser Argon émettant de la lumière continue à des longueurs d'onde de 488 nm et 514 nm (couleur bleue).

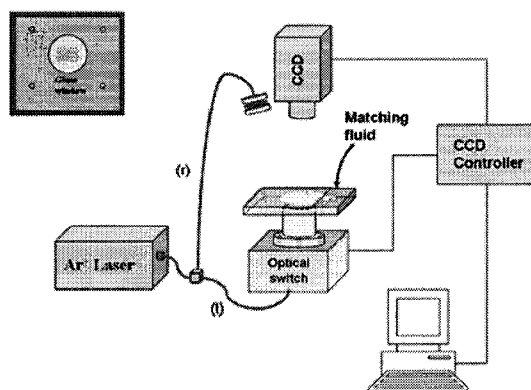


Figure 2.7.2 Ntziachristos *et al* : Système CW dans le domaine visible [Zacharakis et coll., 2005]

Pour le reste, on utilise toujours un fluide adaptateur d'indice afin de simplifier la géométrie de l'animal. Il s'agit de mesures CW en transillumination et vu la faible pénétration de la lumière bleue dans les tissus biologiques, il devient impossible de sonder les structures épaisses.

2.7.1.3 Système 3 : Mesure résolue en temps

Un 3^e système [Turner et coll., 2005], cette fois-ci utilisant des mesures résolues en temps est présenté à la figure 2.7.3. Bien que ses auteurs n'aient testé cette approche que pour des applications de tomographie optique traditionnelles (imagerie de l'absorption et de la diffusion), elle reste très intéressante au niveau de la localisation de sondes fluorescentes [Robichaud et Bérubé-Lauzière, 2007b; Robichaud et Bérubé-Lauzière, 2007a].

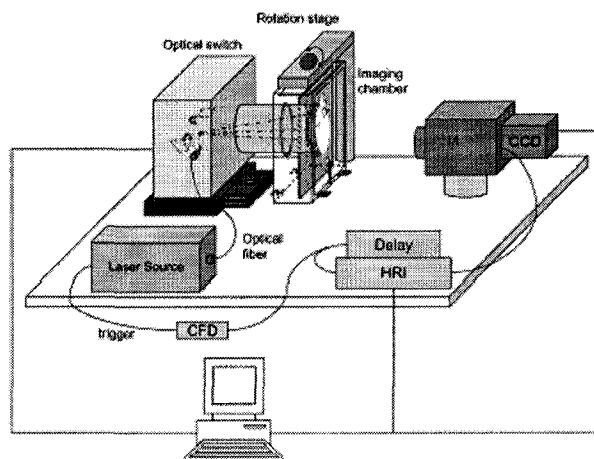


Figure 2.7.3 Ntziachristos *et al* : Système résolu en temps [Turner et coll., 2005]

Ce système ressemble beaucoup à celui de la figure 2.7.1 sauf quelques modifications et/ou améliorations. On note maintenant une plate-forme pour faire tourner la chambre ce qui permet des mesures sous plusieurs angles de projection. Le type de mesures effectuées est maintenant résolu en temps dans le domaine temporel. Une caméra CCD intensifiée à crénelage temporel (*time-gated ICCD*) est utilisée pour aller chercher l'intensité lumineuse à l'intérieur d'une tranche temporelle avec un délai fixe spécifique (crénelage temporel ou « *time-gating* »). En choisissant un délai court, on isole la portion des premiers photons. Ces derniers ayant été les moins diffusés dans leur parcours en empruntant une trajectoire serpentine, il est possible de reconstruire des images avec une résolution limitée en utilisant un algorithme standard emprunté de la tomодensitométrie. De plus, il n'y a pas de procédure systématique pour choisir le délai fixe. Cette technique a été utilisée précédemment par plusieurs chercheurs, notamment pour la mammographie laser [Svanberg, 2004]. Il s'agit encore de mesures uniquement en transillumination, ce qui limite l'information utile recueillie. Dans le cas où ce système serait appelé à faire de l'imagerie par fluorescence, la reconstruction du temps de vie de fluorescence (TVF) serait alors très long. En effet, en ne récoltant que les photons d'une tranche temporelle spécifique, tous les autres sont ignorés. Ainsi, pour reconstruire la courbe du TVF, il faut balayer l'axe temporel par une succession de tranches, ce qui nécessite un temps d'acquisition énorme.

2.7.2 Système de Sevick-Muraca *et al.*

Sevick-Muraca (« *Photon Migration Laboratories, Texas A&M University* ») présente un système d'imagerie tomographique permettant des mesures (CW) ou des mesures FD (Fig. 2.7.4) [Sevick-Muraca et coll., 2002].

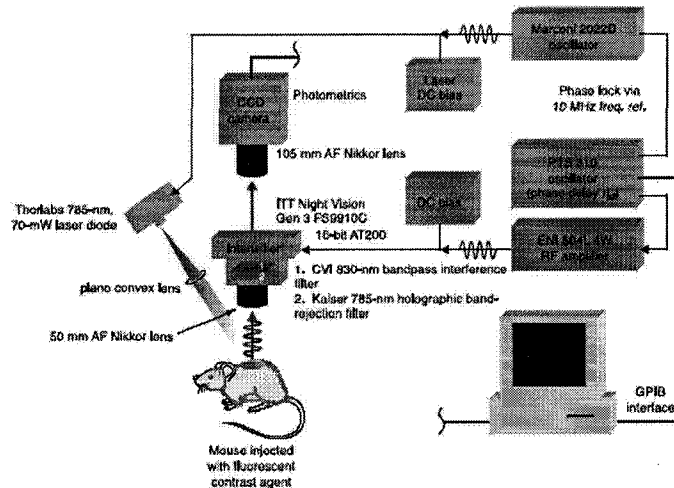


Figure 2.7.4 Système de Sevick-Muraca *et al.* [Sevick-Muraca et coll., 2002]

Ce système éclaire en entier l'animal ciblé et récolte le signal avec une caméra CCD intensifiée (ICCD). Aucune projection angulaire ou linéaire n'est effectuée; la source et le détecteur restent fixés et permettent uniquement des mesures en réflexion. Lorsqu'exploitée en régime continu, l'intensité de la fluorescence émergente de la souris est directement enregistrée par la caméra. Cette technique est beaucoup moins sensible et ne permet pas de sonder aussi profondément qu'avec des mesures FD. En mode FD, l'intensité lumineuse est modulée (centaines de MHz) et à la détection on enregistre l'amplitude et la phase du signal fluorescent. Comme le détecteur ne peut capter des signaux à une fréquence aussi haute, une modulation du gain de l'intensificateur à la même fréquence que la source lumineuse est nécessaire. Il en résulte un signal DC qui sera alors détectable par la caméra.

Bien que sans contact, ce système n'effectue aucune projection. Il s'agit en fait d'un système d'imagerie planaire où l'information liée à la profondeur est impossible à obtenir.

De plus, ne récoltant que les photons rétrodiffusés, sa capacité à aller chercher de l'information en profondeur est limitée. Bref, ce système n'est suffisant que pour obtenir une image 2D en surface de la distribution fluorescente.

2.7.3 Système de Schulz *et al.*

L'équipe de Schulz (*German Cancer Research, Heidelberg Allemagne*) propose un système tomographique par fluorescence sans contact [Schulz et coll., 2005] développé suite à un séjour de Schulz dans le laboratoire de Ntziachristos. Il s'agit d'un système intéressant très semblable à ceux de Ntziachristos puisqu'il permet des prises de mesure sous plusieurs projections angulaires. La source d'excitation est une diode laser (670 nm) fixée à un châssis permettant un déplacement linéaire. À la détection, on retrouve une caméra CCD refroidie munie d'une lentille permettant une capture entière de l'animal à une distance de 6 cm. L'animal est placé à l'intérieur de la chambre et la paire source/caméra, reliée rigidement, tourne autour de celui-ci à l'aide d'un mécanisme d'entraînement costaud qui supporte la caméra refroidie (voir figure 2.7.5).

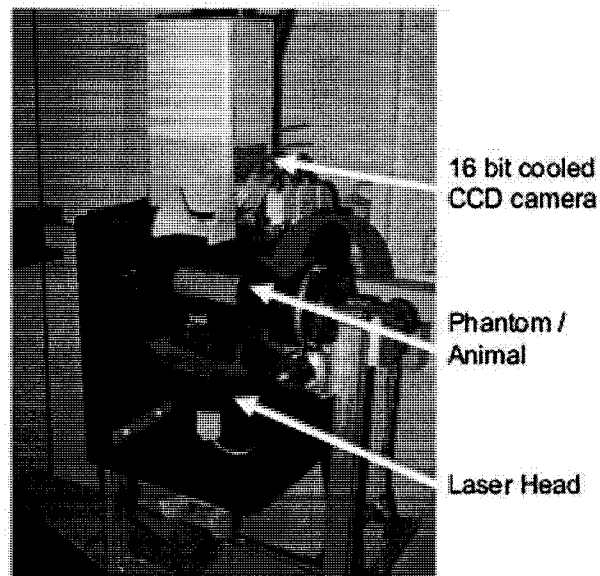


Figure 2.7.5 Système de Schulz *et al.* [Schulz et coll., 2005]

Le système effectue des mesures CW en transillumination uniquement. La capacité à sonder de l'information en profondeur est donc limitée. En outre, l'étude du temps de vie de fluorescence ainsi que l'arrivée des premiers photons est impossible avec ce système. On note que la façon de tenir l'animal à l'horizontale par ses extrémités, notamment par son museau, n'est pas idéale pour un animal vivant.

2.7.4 Advanced Research Technologies Inc. (ART)

ART, une entreprise de la région de Montréal, présente un système pour petits animaux basé sur le temps de vie de fluorescence (TVF) [ART Advanced Research Technologies Inc., 2004; Long et coll.,]. Pour ce faire, des mesures TD selon une technique *TCSPC* sont prises. La source d'excitation est une diode laser (670 nm) émettant des pulses brefs (<70 ps) à un taux de répétition de 80 MHz. À la détection on retrouve un tube photomultiplicateur. Par un système de lentilles et d'un miroir galvanométrique (permettant de diriger un faisceau lumineux très précisément et très rapidement) on balaie l'animal en déplaçant le point d'illumination. Le point de détection est également déplacé à l'aide d'un miroir galvanométrique de manière à suivre le point d'illumination à distance fixe (Fig. 2.7.6).

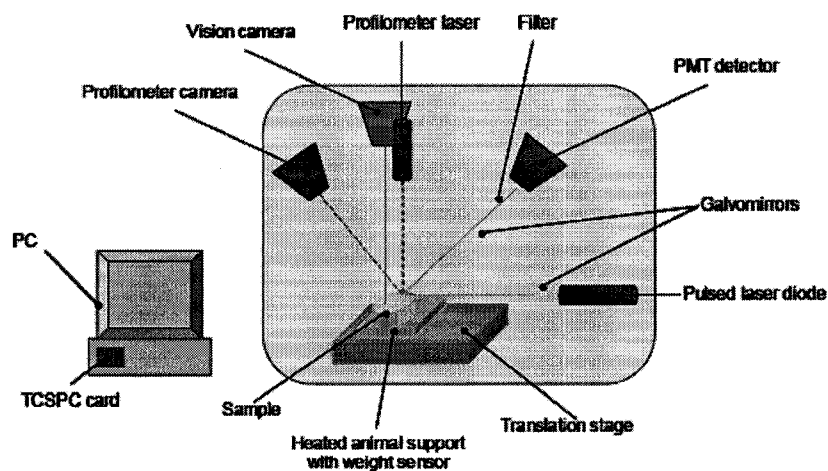


Figure 2.7.6 Système d'imagerie optique développé chez ART [ART Advanced Research Technologies Inc., 2004]

À partir des courbes temporelles (combinant TVF et diffusion/absorption) le temps où le maximum est atteint est trouvé pour en déduire l'information de profondeur. En effet, plus la fluorescence est en surface, plus les photons parcourront une courte distance avant d'atteindre le détecteur. Une corrélation existe donc entre le temps où est atteint le maximum d'une courbe de TVF et la profondeur d'où provient la fluorescence (Fig. 2.7.7).

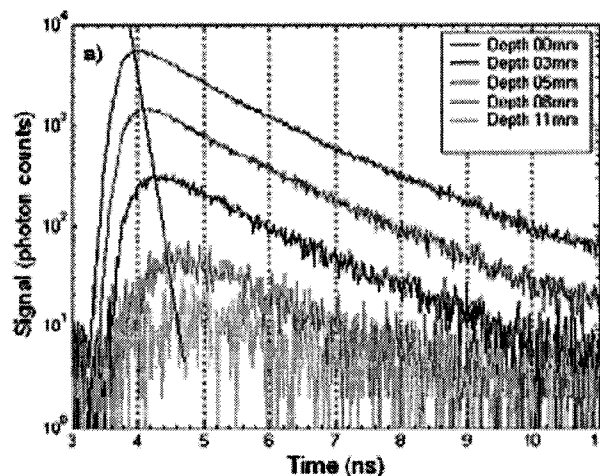


Figure 2.7.7 Relation entre la profondeur de l'inclusion et le temps où est atteint le maximum de la courbe temporelle (combinant TVF et diffusion/absorption) [Gallant et coll., 2004].

Une difficulté qu'on peut entrevoir avec cette approche est de déterminer avec précision la position du maximum par un calcul automatisé. En effet, la région de la courbe autour du maximum a localement la forme d'un plateau où le signal peut osciller à cause du bruit (Fig. 2.7.8). Ainsi la position du maximum peut être sensible à ce bruit entraînant une incertitude dans l'interprétation des résultats.

Un aspect intéressant du système d'ART, à cause des mesures TR, est la possibilité de distinguer des agents fluorescents ayant des spectres d'émission qui se chevauchent. En effet, si leurs TVFs diffèrent, il sera alors possible de séparer des processus fluorescents émettant des spectres similaires. Ceci peut devenir nécessaire dans le cas où une sonde fluorescente est noyée par la présence de fluorescence naturelle venant des tissus biologiques. Retrouver la position de la sonde est alors très difficile à moins de recourir à une analyse du TVF qui est différente pour chacun des processus fluorescents.

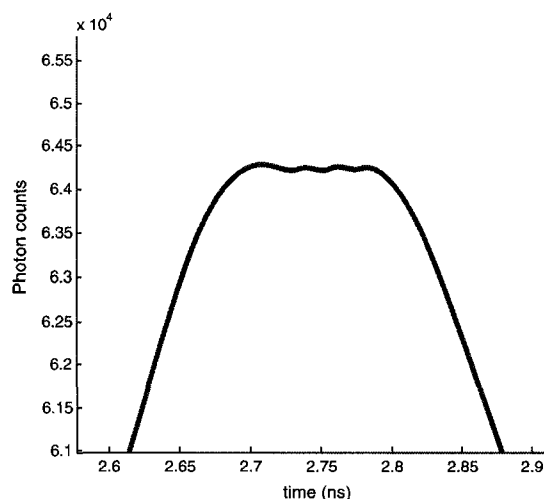


Figure 2.7.8 Fluctuation du signal au niveau du maximum d'une courbe de TVF

Enfin, ce système permet des mesures sans contact avec l'animal. Cependant, de par sa structure, il n'est pas possible d'effectuer des mesures tout le tour de l'animal et seules des mesures en rétrodiffusion sont effectuées. Aucune projection angulaire n'est également faite; il s'agit d'un système d'imagerie planaire. Ce système d'ART est par conséquent limité dans sa capacité à imager en profondeur.

2.7.5 Xenogen

La compagnie Xenogen, faisant maintenant partie de *Caliper Life Sciences Inc.*, a développé un appareil de tomographie optique pour petits animaux permettant l'imagerie en fluorescence. Il s'agit également du premier appareil commercial capable d'imager la bioluminescence [Caliper Life Sciences Inc., 2007]. La bioluminescence se définit comme étant la production et l'émission de lumière par un organisme vivant de façon autonome (la lumière émise par les lucioles est un exemple). Elle résulte d'une réaction par laquelle de l'énergie chimique est convertie en énergie lumineuse. Comparativement à la fluorescence, la bioluminescence n'a donc pas besoin d'une source d'excitation externe puisque la réaction interne à l'animal fournit l'énergie nécessaire. Ce phénomène est très utile dans l'étude non-invasive de processus biologique *in vivo*, car on peut modifier génétiquement des animaux pour qu'ils deviennent bioluminescents.

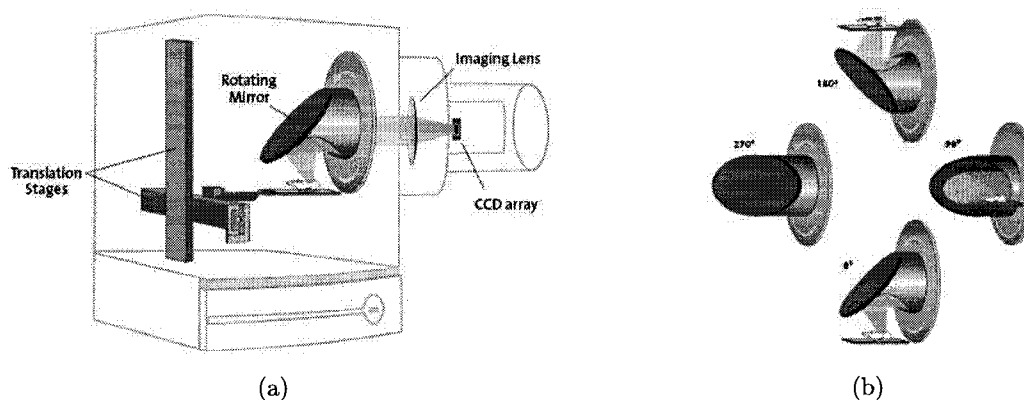


Figure 2.7.9 Système de tomographie optique *IVISTM ImagingSystem3D Series* développé par Xenogen [Caliper Life Sciences Inc., 2007] (a) Vue globale (b) Illustration des différentes projections (bien que seulement 4 points de vue soient montrés, il est également possible de prendre des mesures à 45° , 135° , 225° et 315°).

Ce système fonctionne en mode CW et récolte la lumière rétrodiffusée. Une caméra CCD refroidie (-90°C) est utilisée pour la détection. Il s'agit d'un système sans contact où le champ de vision est de 15 cm . La figure 2.7.10 montre les images obtenues. Il s'agit d'une distribution de l'intensité lumineuse superposée à une image de l'animal. Pour obtenir l'information de profondeur, un algorithme baptisé « *Diffuse Luminescence Imaging Tomography (DLIT) algorithm* » est utilisé. Se servant des données d'émission de photons obtenues à la surface de l'animal, et utilisant un model de diffusion des photons dans les tissus, cet algorithme permet de déduire la position 3D de la source lumineuse, ainsi que son intensité. À noter que le model utilisé suppose un milieu homogène, ce qui n'est pas tout à fait le cas chez un animal considérant que celui-ci est composée de structures ayant des propriétés optiques différentes les unes des autres. La résolution spatiale des reconstructions se situe entre 1 mm et 3 mm , dépendamment de la position de la source dans l'animal. Dû aux mesures en mode CW, il n'est pas possible d'effectuer une analyse du TVF ni d'exploiter le temps d'arrivée des premiers photons. Enfin, l'aspect mécanique n'est pas idéal. Le miroir tournant autour de l'animal, il faut donc à chaque rotation faire subir une translation à l'animal afin qu'il se repositionne adéquatement face au miroir. Il en résulte donc un système mécanique complexe et encombrant, rendant difficile une intégration future à d'autres modalités d'imagerie (TDM, IRM).

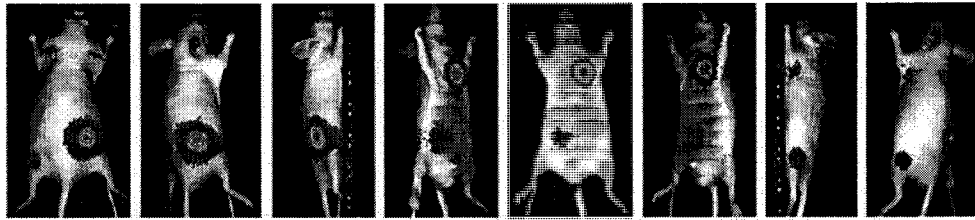


Figure 2.7.10 Images obtenues avec le système de Xenogen [Caliper Life Sciences Inc., 2007]. Il s'agit de 8 images provenant de 8 projections différentes. Sur chaque image, il y a eu localisation de la source lumineuse (soit fluorescente, soit bioluminescente) avec une distribution de l'intensité à cet endroit (le rouge identifiant l'enregistrement d'une forte intensité et le bleu marquant l'enregistrement d'une faible intensité).

2.7.6 Système tomographique de VisEn Medical

Le *FMTTM* de *VisEn medical* consiste en un système tomographique offrant des images 3D de la distribution fluorescente. Il s'agit d'une évolution commerciale du système présenté en section 2.7.1.1. Le principe de base est pratiquement le même. On procède à différentes combinaisons source/détecteur permettant l'obtention de multiples projections. Des mesures CW en transillumination, collectées par une caméra CCD refroidie, sont effectuées. On retrouve à l'excitation 2 canaux distincts, composés respectivement d'une diode laser émettant respectivement à 670 nm et à 745 nm. À la détection on retrouve deux filtres d'émission qui sont respectivement à 700 nm et à 780 nm. Il s'agit d'un système avec contact. L'animal est plongé à l'intérieur d'une chambre remplie d'un fluide adaptateur de manière à le restreindre à une forme géométrique simple.

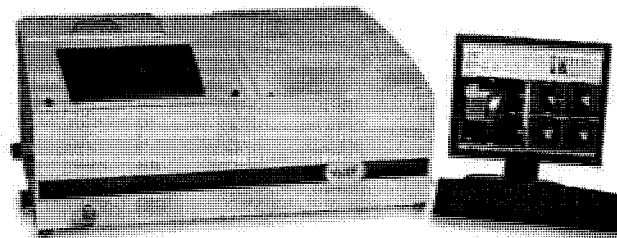


Figure 2.7.11 Système tomographique de VisEn Medical (FMT) [VisEn Medical]

Récemment, *VisEn medical* a sorti une évolution du *FMT*, soit le *FMT 2500* (voir figure 2.7.12). Cette nouvelle version permet une imagerie sans contact ; l'utilisation d'un fluide adaptateur n'est plus nécessaire. Ce système intègre les travaux les plus récents de Ntziachristos au niveau des méthodes de projections utilisées lors de l'acquisition des données [Lasser et coll., 2008]. À cet effet, on retrouve un axe motorisé sur lequel la chambre, contenant l'animal, est fixée. Cela permet la prise de mesures sous plusieurs projections angulaires, se traduisant en un gain de la résolution en profondeur.

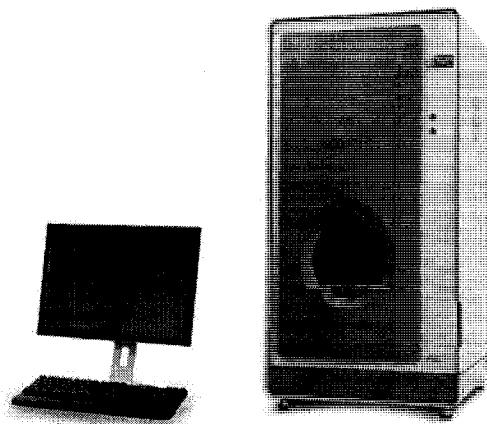


Figure 2.7.12 Système tomographique de VisEn Medical (FMT 2500) [VisEn Medical]

2.7.7 Système d'imagerie de Kodak

Le système *FX Pro* de *Kodak* intègre plusieurs modes de détection. Le principal est le mode en fluorescence, permettant l'imagerie moléculaire. Dans ce mode, il peut produire jusqu'à 14 longueurs d'onde d'excitation différentes (380 *nm* à 780 *nm*). À la détection, on retrouve une caméra CCD refroidie avec 4 filtres d'émission pouvant couvrir une plage allant de 440 *nm* à 830 *nm*. Des mesures CW basées sur la lumière rétrodiffusée sont exploitées. Aucune mesure tomographique n'est effectuée faisant de ce système un imageur planaire. L'obtention d'information en profondeur est ainsi absente, rendant impossible la création d'images 3D. Cependant, l'intérêt pour ce système lui vient de l'intégration de l'imagerie par rayons X. Il permet d'obtenir des images anatomiques sur lesquelles on superpose l'imagerie moléculaire. Cet aspect bimodal rend possible une localisation anatomique 2D des agents fluorescents dans les tissus.

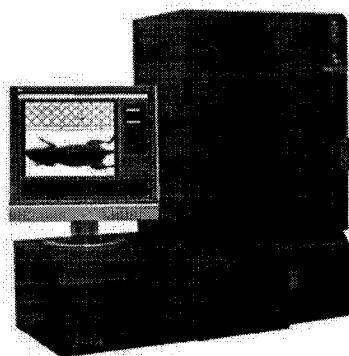


Figure 2.7.13 Système d'imagerie moléculaire de Kodak [Carestream Health]

2.7.8 Système d'imagerie du CRI

Cambridge Research & Instrumentation, Inc. (CRI) a développé le *MaestroTM 2*. La force de ce système réside dans sa capacité à séparer spectralement la fluorescence provenant du milieu (auto-fluorescence) de la fluorescence provenant des agents fluorescents et ainsi pouvoir éliminer le signal d'auto-fluorescence. L'auto-fluorescence peut être perçue comme un bruit de fond nuisant au signal utile (fluorescence produite par la peau et les poils de l'animal est un exemple d'auto-fluorescence). L'obtention d'images de meilleures qualités devient donc possible. Ici aussi, une caméra CCD refroidie est utilisée à la détection pour obtenir des mesures CW en transillumination. Aucune mesure tomographique n'est faite résultant en un système d'imagerie planaire où seule une quantification de l'intensité est faite. Il résulte de la distribution fluorescence des images 2D que l'on superpose à une image de l'animal.

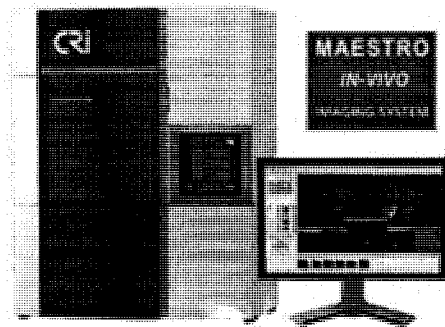


Figure 2.7.14 Système d'imagerie moléculaire du CRI [CRI]

2.7.9 En résumé

Le tableau 2.7.1 donne un sommaire des systèmes discutés précédemment ainsi que le créneau visé par le groupe *TomOptUS*. Actuellement, le gros désavantage des systèmes purement sans contact en TOD est qu'ils utilisent tous des mesures en rétrodiffusion ou bien en transillumination [Schulz et coll., 2003; Schulz et coll., 2005; Herve et coll., 2006; ART Advanced Research Technologies Inc., 2004]. Aucun ne combine les deux types de mesures. La transillumination peut être adéquate pour des structures peu épaisses [Turner et coll., 2005], mais dans le cas d'une souris contenant des organes opaques (ex. coeur, foie, etc.) il est souhaitable d'obtenir des données par la lumière rétrodiffusée [Pogue et coll., 1999], puisqu'elles pourraient être les seules qui permettent d'obtenir un rapport signal à bruit suffisant. De plus, en imagerie par fluorescence, comme l'émission est isotropique (*i.e.* émission dispersée également dans toutes les directions), il appert important de récolter le signal sur tout le tour. Utiliser ces deux types d'information pourra vraisemblablement permettre de sonder plus profondément les tissus et améliorerait la résolution des scanners TOD actuels (1-3 mm [Ntziachristos et Weissleder, 2001; Schulz et coll., 2005; Caliper Life Sciences Inc., 2007]). On note également que la majorité des scanners font des mesures CW. Bien que cette approche rende ces systèmes plus simples et moins coûteux, il demeure que toute dépendance au temps est alors impossible, ce qui signifie une énorme perte d'information. Les mesures résolues en temps permettent d'exploiter cette dépendance temporelle. Davantage d'information peuvent donc être utilisée, comme la possibilité de distinguer les différents types de photons. À ce jour, aucun système sans contact faisant des mesures TR en rétrodiffusion/transillumination n'est disponible. L'exploitation des premiers photons pour faire de la localisation par temps de vol est également une avenue encore peu explorée. Cette dernière approche semble prometteuse selon nos résultats; elle nécessite des algorithmes simples de reconstruction et apparaît comme un moyen efficace pour la localisation 3D d'une inclusion fluorescente en milieu diffusant [Bérubé-Lauzière et Robichaud, 2006; Robichaud et Bérubé-Lauzière, 2007a; Robichaud et Bérubé-Lauzière, 2007b].

CHAPITRE 3

Définition et objectifs du projet

La section 2.7 fait ressortir 3 aspects décrivant bien la situation actuelle des systèmes tomographiques optiques pour petits animaux :

- Aucun système ne combine des mesures en rétrodiffusion/transillumination
- La majorité des systèmes sans contact utilisent uniquement des mesures CW
- L'utilisation des premiers photons pour la reconstruction des images est une avenue encore peu exploitée

L'objectif du groupe *TomOptUS* est de pallier à ce manque en réalisant un *tomographe optique sans contact et résolu en temps* pour l'*imagerie par fluorescence* sur *petit animal*. Une architecture 3D intégrant une configuration annulaire sera utilisée afin d'exploiter l'information provenant de la lumière rétrodiffusée et transmise (mesures tout le tour). La réalisation d'un tel système représente un programme de recherche hautement interdisciplinaire que l'on peut diviser en trois grands secteurs :

- Mesures 3-D de la forme extérieure du sujet par vision numérique
- Conception et réalisation mécanique, optique et électronique d'un scanner tomographique
- Développement d'algorithmes de reconstruction tomographique

Dans le cadre de la présente maîtrise, les travaux se rattachent au niveau du 2^e et du 3^e point. L'objectif premier est l'étude de l'arrivée des premiers photons pour en déduire de l'information au niveau de la profondeur quant à la provenance du signal fluorescent. À cet effet, un système permettant l'acquisition de signaux résolus en temps est nécessaire. Les grandes étapes de mon projet se résument donc ainsi :

1. Développer un prototype de scanner :
 - Sans contact
 - Permettant des prises de mesures tout le tour de l'animal
 - Exploitant des mesures résolues en temps
2. Développement d'algorithmes de localisation 3D de la fluorescence basés sur le temps d'arrivée des premiers photons
3. Démontrer la viabilité d'une nouvelle gamme de photodiodes à avalanche (APD) ultra-rapides comme détecteur en TOD

Au niveau du troisième point, il faut savoir qu'actuellement les détecteurs de choix pour des mesures TD sont les tubes photomultiplicateurs (PMT). L'intégration d'une nouvelle gamme d'APD ultra-rapides (G-APD pour « geiger mode APD ») représente une innovation en TOD. Le problème avec les PMTs est qu'ils sont très sensibles à la lumière ambiante. Il est absolument nécessaire de les manipuler dans le noir pour ne pas les endommager. Leurs dimensions sont également importantes ce qui impose des contraintes mécaniques sérieuses si on veut éventuellement en intégrer un grand nombre sur un anneau de détection. De leur côté, les G-APDs permettent une plus grande densité d'intégration. En particulier, celles de *Micro Photon Devices* (MPD) utilisées dans le présent projet ne sont pas sensibles à la lumière ambiante. Leur aspect le plus intéressant est au niveau de leur excellente résolution temporelle (< 50 ps comparativement à environ 200 ps pour une PMT d'un prix équivalent). Les G-APDs permettent ainsi d'obtenir une meilleure résolution au niveau des temps de transit des photons, ce qui est très important pour détecter l'arrivée des premiers photons. Le seul point moins intéressant vient de leur surface active beaucoup plus petite, soit de 50 μm comparativement à 8 mm pour une PMT. Or cela peut être facilement compensé par une configuration optique adéquate d'un système de lentilles [Robichaud et coll., 2007].

CHAPITRE 4

Méthodologie

4.1 Réalisation du prototype de scanner

Pour procéder à des mesures optiques, un montage est nécessaire. Ce montage doit pouvoir accueillir les canaux de détection que nous développerons et permettre des mesures tout le tour de l'objet. À cet effet, étant donné que les premières mesures ne seront effectuées qu'avec un seul canal de détection, le montage doit permettre une rotation du canal de détection autour de l'objet à imager (« mire » ou souris) de manière à simuler la présence d'un anneau complet. De plus, de manière à obtenir une série de projections angulaires de l'objet, un plateau rotatif devra figurer au centre du montage pour en permettre la rotation. Une ébauche préliminaire de cette plate-forme utilisée au début du présent projet est présentée à la figure 4.1.1. Il faudra également intégrer au montage un appareil qui permettra des déplacements verticaux de l'objet afin d'imager plusieurs tranches tomographiques. Une automatisation des différents composants du montage sera réalisée par une programmation LabView.

Pour l'objet à imager, débiter immédiatement avec un vrai animal complexifierait trop le problème. Nous commencerons plutôt avec un objet de forme simple, connue et comportant des propriétés optiques stables. Pour ce faire, nous faisons appel à une solution simulant les propriétés optiques des tissus biologiques et communément appelée « mire » ou en anglais « *phantom* ». Plusieurs recettes existent. Dans notre cas, nous avons opté pour une solution lipidique constituée d'Intralipid®-20% (Baxter) diluée d'un facteur 1:48. Un cylindre de verre (diamètre = 2 *pouces*, épaisseur = 1.5 *mm*, hauteur = 12 *mm*) sera rempli de cette solution, menant à un coefficient de diffusion $\mu'_s = 5 \text{ cm}^{-1}$ [Ripoll et coll., 2002]. L'inclusion fluorescente sera réalisée par un tube de verre (diamètre = 4 *mm*, épaisseur = 0.5 *mm*, longueur = 1 *cm* et bouché aux deux extrémités) rempli d'*indocyanine green*

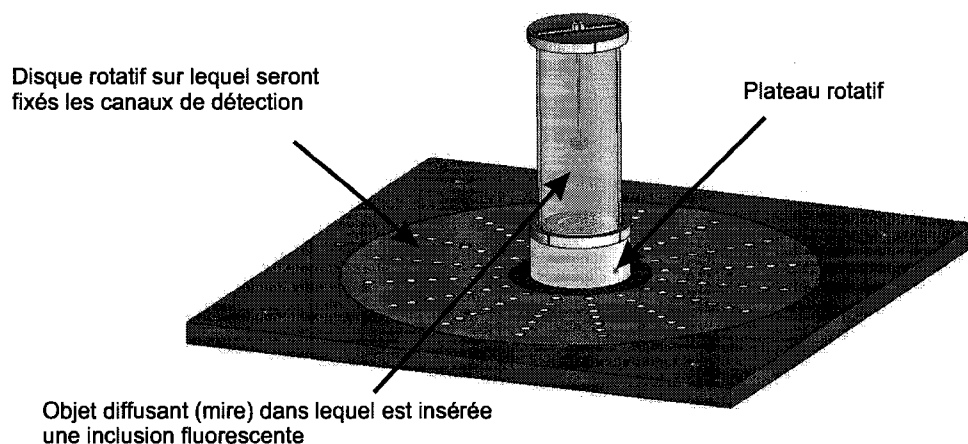


Figure 4.1.1 Prototype préliminaire

(ICG). Cet agent fluorescent comprend un spectre d'absorption maximal à une longueur d'onde de 780 nm et réémet à une longueur de 830 nm . La concentration utilisée sera de $10 \mu\text{Mol}/\ell$. Une mince tige de métal sera fixée à une extrémité de l'inclusion, ce qui assurera son maintien à une hauteur constante tout en permettant de la bouger latéralement.

4.2 Algorithme de localisation de la fluorescence

Afin d'exploiter le temps d'arrivée des premiers photons, une technique de détection résolue en temps est nécessaire. Pour ce faire, une technique de comptage de photons corrélé en temps (*Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC)*) sera utilisée. Il s'agit d'une méthode de détection en domaine temporel. Les modules utilisés seront ceux de la compagnie *BECKER & HICKL GMBH* [Becker, t Ed]. Cette méthode de détection nécessite également l'utilisation de pulses lasers très brefs obtenus avec un laser Tsunami de la compagnie Spectra-Physics (longueur d'onde = 780 nm , puissance maximale de sortie = 750 mW , taux de répétition = 80 MHz , durée du pulse = 150 fs FWHM).

Ceci dit, et avant de se lancer directement dans le développement d'algorithmes de localisation, une validation du concept s'impose. Il nous faut élaborer dans un premier temps une technique permettant l'extraction des temps d'arrivée reliés aux premiers photons. Il faut voir si l'on peut extraire une relation entre ces temps d'arrivée et la profondeur

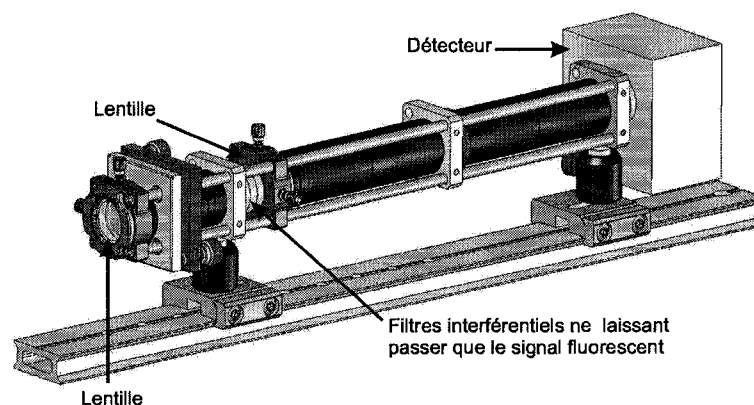


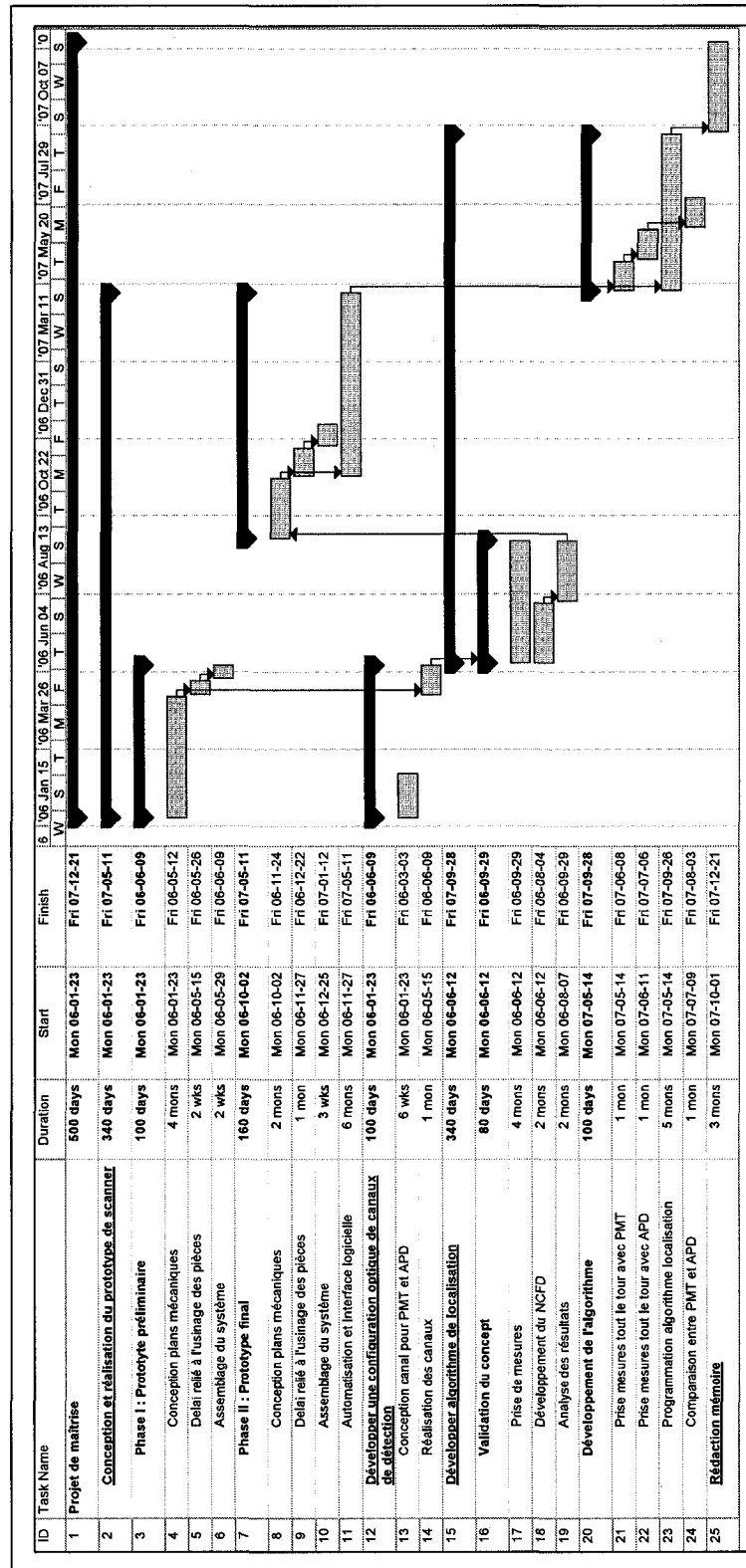
Figure 4.3.1 Configuration typique d'un canal de détection

de l'inclusion fluorescente. Si cela fonctionne, nous irons alors plus loin et chercherons à développer un algorithme exploitant les temps d'arrivée. Le but ultime sera d'utiliser les temps d'arrivée des premiers photons pour localiser en 3D la position de l'inclusion en milieu diffusant.

4.3 Intégration d'une APD comme détecteur

Que ce soit un canal de détection intégrant une PMT ou une APD, la base reste la même. Le but du canal est de faire le pont entre le point de collection sur l'objet et le détecteur. On retrouve habituellement un arrangement de lentilles permettant une focalisation du signal sur toute la surface active du détecteur. En imagerie par fluorescence, on retrouve également des filtres optiques qui permettent de ne sélectionner que le signal fluorescent. La configuration typique utilisée est présentée à la figure 4.3.1. Dans le cas d'un canal intégrant une APD, la seule différence réside dans le choix des lentilles. Comme sa surface active est beaucoup plus petite ($50 \mu m$ comparativement à $8 mm$ pour une PMT), il faudra modifier la configuration optique afin de focaliser correctement le point de collection sur la surface de détection de l'APD. Enfin, des comparaisons entre les résultats obtenus avec PMT et APD seront effectuées pour valider l'utilisation de l'APD en TOD. Le tableau 4.3.1 présente le diagramme de Gantt du projet.

TABLEAU 4.3.1 Diagramme de Gantt du projet



DEUXIÈME PARTIE

Développement du prototype

CHAPITRE 5

Développement du prototype

5.1 Description

Le système développé est montré à la figure 5.1.1. Il permet des mesures sans contact résolues en temps. On retrouve à la détection un canal (intégrant soit une APD ou une PMT) fixé sur un disque rotatif. Le canal est relié à un module de comptage de photons corrélé en temps (module TCSPC de la compagnie Becker & Hickl GmbH) permettant l'acquisition des signaux. À la source d'excitation on retrouve un laser Tsunami de la compagnie Spectra-Physics (longueur d'onde = 780 nm , puissance maximale de sortie = 750 mW , taux de réplétion = 80 MHz , durée du pulse = 150 fs FWHM). Ce prototype permet des prises de mesures sur plusieurs projections grâce à un plateau rotatif sur lequel repose l'objet (dans notre cas la mire). Afin de simuler un anneau de détecteur permettant la récolte du signal tout le tour de l'objet, un disque rotatif est utilisé et fait tourner le canal de détection. À noter qu'il est impossible de prendre des mesures sur un intervalle de $\pm 40^\circ$ de part et d'autre de l'axe laser, le faisceau laser étant bloquée dans cet intervalle par le canal de détection. Afin de permettre des prises de mesures sur plusieurs tranches, un piston de translation est utilisé pour effectuer les déplacements verticaux.

Une précaution au niveau de l'excitation de la fluorescence a également été prise. L'agent fluorescent a tendance à se photo-dégrader avec le temps (« photo-bleaching » suite à son excitation répétée et le signal fluorescent diminue avec le temps). Un moyen de réduire les effets de ce phénomène est de minimiser la dose laser envoyée dans la solution. Un obturateur est donc utilisé à cette fin. Son rôle consiste à laisser passer le faisceau laser uniquement dans les moments d'acquisition et de bloquer autrement (*i.e.* pendant que le système effectue un mouvement). L'obturateur joue également un rôle de protection. Dans le cas où il y a un signal trop puissant sur le détecteur, ce qui pourrait l'endommager

(particulièrement important pour les PMTs), l'obturateur s'enclenche automatiquement et bloque le faisceau laser afin de ne pas l'abîmer.

Selon le type d'expérience effectuée, une variation de l'intensité laser envoyée sur l'objet peut être nécessaire. Une roue à densité variable montée sur un disque rotatif est utilisée à cet effet. Il est ainsi facile et rapide de varier l'intensité.

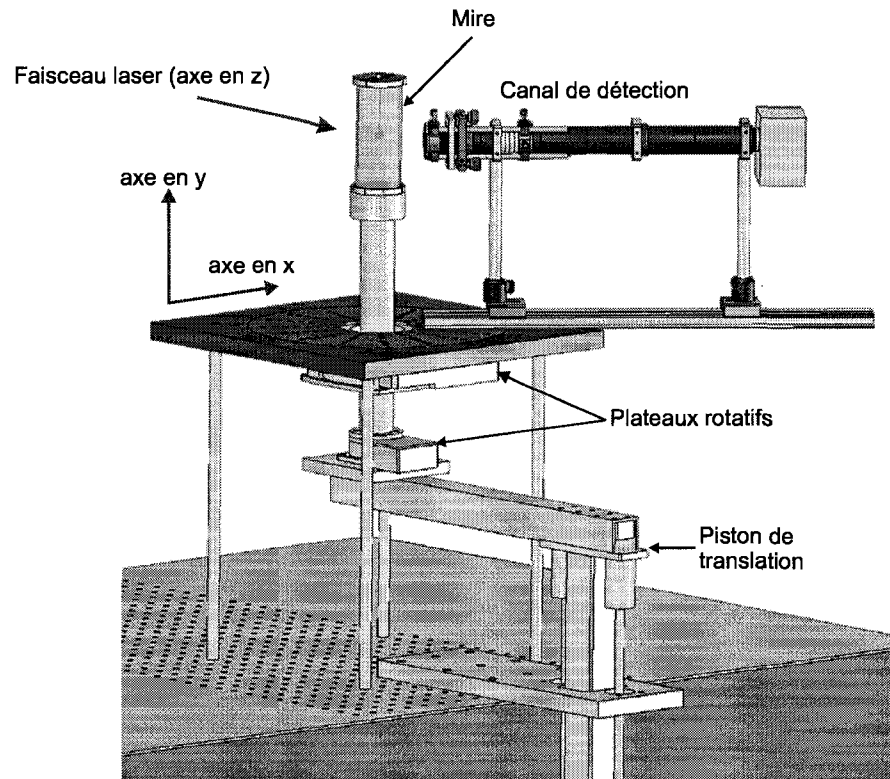


Figure 5.1.1 Prototype développé

5.2 Temps d'exécution

Le système conçu est très versatile et permet d'effectuer différentes séquences selon les besoins. Comme expliqué dans l'article du chapitre 8, deux séquences nous intéressent plus particulièrement, soit celle permettant de déterminer la tranche horizontale dans laquelle se situe une inclusion fluorescente et celle permettant une localisation 2D de l'inclusion dans cette tranche. Dans les deux cas, le temps d'acquisition (soit le temps pendant lequel

nous comptons les photons arrivant au détecteur) est de 5 secondes. Pour la première séquence, il s'agit d'un balayage de l'axe vertical à tous les mm sur une longueur de 50 mm , et ce pour 8 positions angulaires différentes de l'objet. Le temps d'exécution d'une telle expérience est d'environ une heure. La deuxième séquence consiste en de multiples mesures prises tout le tour de l'objet, et ce pour plusieurs projections tomographiques. Dans le cas d'un scénario typique où le canal de détection effectue une rotation allant de 40° à 320° par intervalle de 10° , et pour des projections de l'objet allant de 0° à 350° par intervalle de 10° , le temps d'exécution est d'environ 3 heures. Éventuellement, ces temps diminueront d'un facteur 16 avec l'intégration de 16 canaux de détection.

5.3 Contrôle par ordinateur

Ce système est entièrement contrôlé par ordinateur via un logiciel développé dans *Lab-View*. L'utilisateur n'a qu'à fournir au logiciel quelques paramètres d'entrée et par la suite le processus est entièrement automatisé et ne nécessite aucune intervention de l'utilisateur. L'interface utilisateur est présentée à la figure 5.3.1. Pour chaque plateau de rotation ainsi que pour le piston de translation, il faut spécifier les limites relatives aux déplacements souhaités de même que l'incrément entre chaque position. Une option d'asservissement en intensité est également disponible. L'asservissement augmente ou diminue en temps réel la puissance laser envoyée sur l'objet afin d'obtenir des signaux fluorescents comportant toujours une amplitude semblable à la détection.

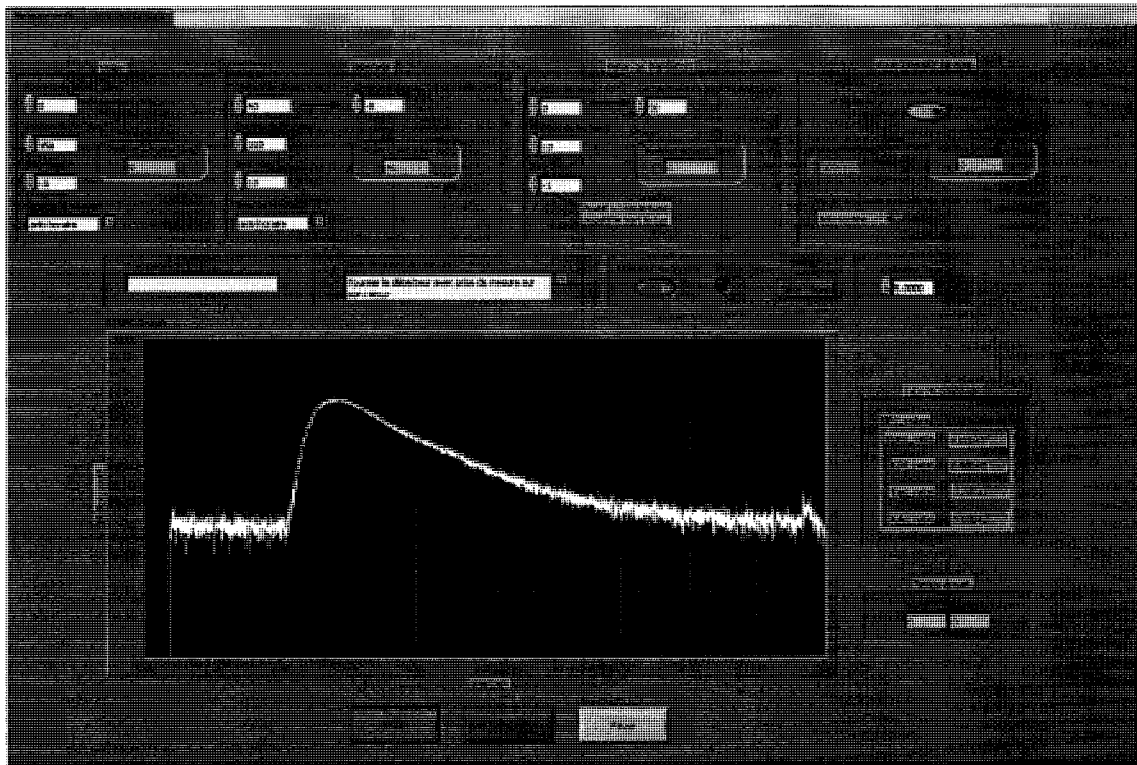


Figure 5.3.1 Interface logicielle

TROISIÈME PARTIE

Articles

CHAPITRE 6

Optics East 2006 : NCFD

6.1 Mise en contexte

Cet article a été publié dans le cadre de la conférence *Optics East 2006* à Boston en octobre 2006. Une présentation orale résumant les résultats de nos recherches a été faite lors de la séance portant sur le comptage de photons corrélé en temps. Bien que le premier auteur de cet article soit Yves Bérubé-Lauzière, nous avons convenu de l'inclure au présent mémoire car le sujet traité est à la base de tous les travaux à suivre. Cet article a donc grandement sa place et au lieu de tout le réécrire, il est présenté dans sa version intégrale. À noter que j'ai contribué à part égale avec mon directeur de recherche (l'auteur principal) à la réalisation de cet article.

6.2 Titre de l'article

Version anglaise

Time-resolved fluorescence measurements for diffuse optical tomography using ultrafast time-correlated single photon counting

Version française

Mesures résolues en temps de la fluorescence pour tomographie optique diffuse utilisant une technique ultra-rapide de comptage de photons corrélé en temps

6.3 Auteurs

Yves Bérubé-Lauzière et Vincent Robichaud

Laboratoire *TomOptUS*, Département de génie électrique et de génie informatique

Université de Sherbrooke, 2500 boul. Université, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada

6.4 Résumé de l'article

Cet article présente une nouvelle approche permettant d'obtenir de l'information au niveau de la profondeur d'une inclusion fluorescente baignant dans un milieu diffusant. Cette technique s'appuie sur des mesures résolues en temps de la distribution des temps de vols des photons fluorescents suite à une excitation laser ultra brève. Nous formulons l'hypothèse que les photons associés au temps de transit le plus court ont emprunté une trajectoire quasi-rectiligne (photons serpentiles). Dans cet esprit, il devrait alors être possible d'obtenir de l'information de profondeur par une analyse des temps de vol des premiers photons. Afin d'extraire de manière stable les temps d'arrivée des premiers photons, une technique novatrice consistant en une version numérique du discriminateur à fraction constante (numerical constant fraction discrimination technique) est présentée. Les résultats obtenus montrent bien l'existence d'une relation quasi-linéaire entre les temps d'arrivée et la profondeur de l'inclusion. Cette approche servira éventuellement à effectuer une localisation 3D d'une inclusion fluorescente en milieu diffusant.

Time-resolved fluorescence measurements for diffuse optical tomography using ultrafast time-correlated single photon counting

Yves Bérubé-Lauzière and Vincent Robichaud

Laboratoire TomOptUS, Département de génie électrique et de génie informatique
Université de Sherbrooke, 2500 boul. Université, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada

ABSTRACT

We develop a novel approach to infer depth information about a small fluorophore-filled inclusion immersed in a scattering medium. It relies on time-resolved measurements of the time of flight distribution of emitted fluorescent photons after short pulse laser excitation. The approach uses a novel numerical constant fraction discrimination technique to assign a stable arrival time to the distribution's early photons. Our experimental results show a linear relationship between these arrival times and the position of the inclusion. This approach will serve as a useful technique in fluorescence diffuse optical tomography.

Keywords: Fluorescence, Diffuse Optical Tomography, Time-Resolved Measurements, Time-Domain, Time-Correlated Single Photon Counting, Numerical Constant-Fraction Discrimination, Time Point-Spread Functions

1. INTRODUCTION

Our motivation for the present work is to infer depth information about a small fluorophore-filled inclusion immersed in a scattering medium from time-resolved measurements of emitted fluorescence after short pulse laser excitation. The present work will serve in a fluorescence diffuse optical tomography (FDOT) scanner that we are developing for small animal *non-contact* molecular imaging. More precisely, our goal is to exploit the arrival time of early fluoresced photons to localize the inclusion with a time-of-flight (TOF) technique.

The rationale behind our approach is motivated by the following gedanken experiment: Imagine that a diffusing medium were not diffusing, that we had infinitely short laser pulses propagating as spherical waves, and that our fluorophore had an infinitely short lifetime, while emitting a spherical wave with a measurable amount of light when it fluoresces. The fluorophore can here be seen as a secondary source of light within the medium. Using spherical waves for describing light propagation provides a rough, but nevertheless useful, picture of how light pulses travel in a diffusing medium. In this thought experiment, after a laser pulse is injected into the medium, the time for the first fluorescent photons to be detected at a given position on the boundary of the medium is determined by 1) the time taken by the laser spherical wavefront to reach the inclusion, plus 2) the time for the fluoresced spherical wavefront to reach the detection position. Fig. 1 (a) illustrates the situation. By measuring the time between the injection of a laser pulse in the medium and the arrival of fluoresced photons at several locations around the medium, it is then possible to infer the position of the inclusion. This is a TOF technique, with several measurements around the medium being required to avoid ambiguity on the possible location of the inclusion (*i.e.* to break the degeneracy between symmetrical situations from the detector's point of view). Fig. 1 (b) illustrates this.

Correspondence should be sent to Y. B-L. at Yves.Berube-Lauziere@USherbrooke.ca

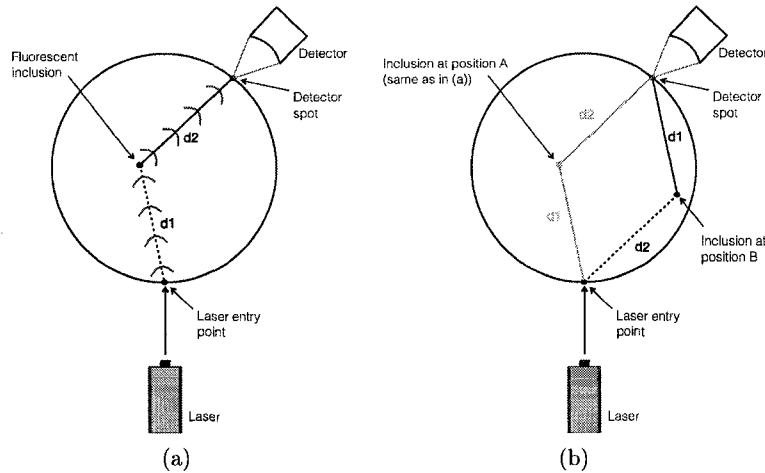


Figure 1. (a) Cross-sectionnal view of a cylindrical phantom used in the gedanken experiment. (b) Indistinguishable position (from the detector's temporal point of view) of the inclusion (in dark) from that shown in (a) (reproduced here in light gray). In both cases, the fluoresced light will reach the detector in the same time because the total path traveled (i.e. by the laser excitation pulse and the fluoresced light) is the same.

In reality, light pulses are broadened as they travel in diffusing media. Two types of photons can be distinguished: ballistic photons that do not suffer scattering events at all (which are not detectable¹ in thick ($>1\text{cm}$) biological tissues), and diffused photons whose time of flight distribution (time point-spread function (TPSF)) starts some delay after the time it takes for ballistic photons to propagate.² Consider the early arriving photons in real measurements of fluorescence TPSFs (FTPSFs), *i.e.* photons detected in the leading rising edge of an FTPSF. Being the fastest to reach the detector, 3 important facts can be said about them: 1) they must have resulted from the early laser photons that reached and excited the fluorophore, 2) they must have been emitted early by the fluorophore (*i.e.* in the early part of the fluorescence decay curve), and moreover, in both previous these processes, the photons must have followed a near ballistic path (*i.e.* be so-called "snake photons"). This brings us close to our gedanken experiment if we identify early photons with our spherical wavefronts.

Exploiting temporal information from time-resolved signals to infer the position of a fluorescent inclusion in a scattering medium has been first described by Feld, and coworkers.³ Their approach uses the rising edge 50% point of the FTPSF maximum as the early photons arrival time. In further work,⁴ the convolution theorem for Laplace transforms is exploited to devise a tomographic reconstruction algorithm from time-resolved data based on the diffusion approximation model for light propagation in scattering media. Their algorithm requires an optimal s value of the Laplace transform to be chosen. This choice is a trade-off between temporal (and consequently spatial) resolution (better at earlier times) and signal-to-noise ratio (SNR) (better at later times). However, no complete procedure on how to compute the optimal s is described. In a similar vein, Gallant et al. from ART have proposed to use the FTPSF maximum.⁵ Their motivation was to determine the depth of fluorescent inclusions with ART's eXplore OptixTM system, a planar geometry time-resolved non-contact small animal imager.⁶ Disadvantages of using the FTPSF maximum are: i) the FTPSF curve is relatively flat nearby the maximum, thus making the search for the maximum prone to errors due to noise, and ii) the maximum does

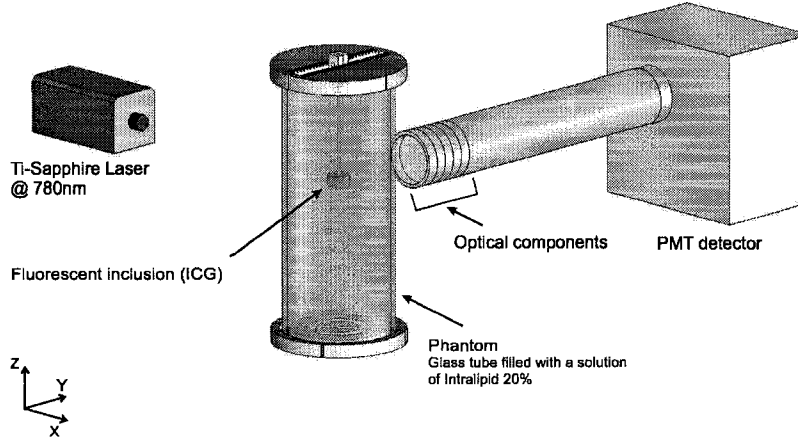


Figure 2. Schematic of the experimental setup showing the laser source, the phantom containing the fluorescent inclusion, the optical components (lens, attenuator, filters), and the PMT detector.

not convey information from the fastest detectable photons.

In this article, we assign a stable arrival time to early photons detected in the front edge of FTPSFs by way of a novel numerical constant fraction discrimination (NCFD) technique. Our experimental results show a clear linear relationship between these arrival times and the position of a fluorescent inclusion.

2. MATERIALS AND EXPERIMENTAL SETUP

2.1. Optical setup

A schematic of the experimental setup is shown in Fig. 2. A Tsunami laser (Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA), is used (wavelength set to $780nm$, maximum output power = $750mW$, repetition rate = $80MHz$, pulse duration = $100fs$ FWHM). The optical power was attenuated by a neutral density absorptive filter to $47mW$ and directed to our phantom. Detection was made using a time correlated single photon counting (TCSPC) system (Becker&Hickl GmbH, Germany: SPC-134 and PMC-100 PMT). The PMT was cooled for reducing dark noise. The diffused light emitted from the phantom was first collected by a plano-convex lens (focal length = $25.4mm$) and then focussed onto the photocathode of the PMT by a plano-convex lens (focal length = $200mm$). With this configuration we image a $\phi = 1.25mm$ spot on the phantom onto the whole surface area of our PMT ($\phi = 10mm$). Between the two lenses, an optical attenuator is inserted to ensure that the intensity of detected light does not saturate or damage the PMT and that the photon flux is sufficiently small to prevent detection of multiple photons during each laser cycle (single photon counting limit).⁷ Interference filters (Omega Filters, Brattleboro, VT, USA) were also inserted to attenuate as much as possible the laser wavelength.

2.2. Phantoms

We used a phantom to simulate tissue optical properties. It consisted of a $2inch$ outer diameter glass tube (wall thickness = $1.5mm$, length = $12cm$) filled with a 48:1 (V/V) aqueous dilution of Intralipid® 20% (Baxter). This suspension liquid yields a scattering coefficient of $\mu'_s = 5cm^{-1}$.⁸ In this scattering solution we inserted a

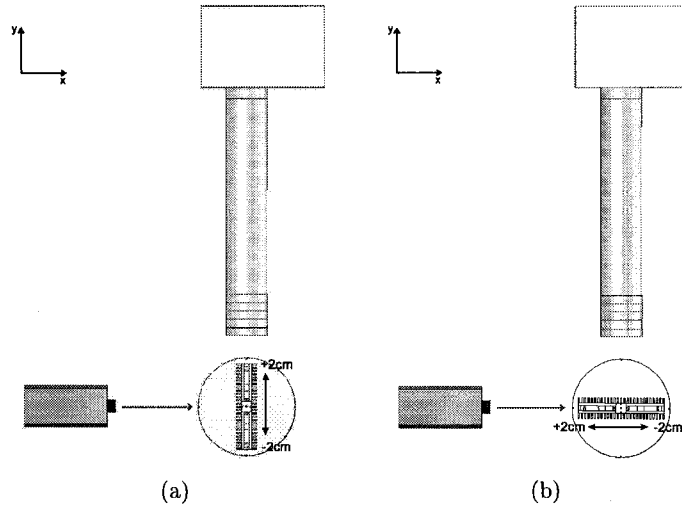


Figure 3. Top view of the setup. (a) Measurements taken by displacing the inclusion perpendicular to the laser beam axis. (b) Measurements taken by displacing the inclusion parallel to the laser beam axis.

fluorescent inclusion made with a glass tube (O.D. = 4mm , wall thickness = 0.5mm , length = 1cm , capped at both ends) filled with indocyanine green (ICG) (Fisher Scientific), a NIR fluorescent agent (absorption peak @ 780nm , emission peak @ 830nm), at a concentration of $10\mu\text{Mol}/\ell$. The inclusion was attached at one end with a very thin nylon wire to allow us to fix it at a constant height along the z axis while being able to move it in the x - y plane.

2.3. Measurements

As shown in Fig. 3, we took measurements on the phantom at right angle with respect to the laser beam. The TCSPC collection time was 10 seconds. The cylinder surface was positioned a focal distance away from the collecting lens. The laser beam was adjusted at the same height as the inclusion and so that it hit the phantom at the center (Fig. 3). First, a background measurement (*i.e.* without an inclusion embedded in the medium) was made (Fig.4). As can be seen, we detected a small amount of light at the laser wavelength. Better optical filtering would have avoided this laser leak-through. We are currently working on more efficient optical filtering to avoid this. A first set of measurements was made by displacing the inclusion perpendicular to the axis of the laser beam (Fig. 3a) and a second set by displacing the inclusion parallel to the axis of the laser beam (Fig. 3b). The measurements consisted of a different position of the inclusion in the corresponding axis from -2cm to $+2\text{cm}$ with a moving step of 2mm . The raw data acquired with our TCSPC system consisted FTPSFs which combine the effect of the temporal broadening of the laser pulses within the medium, the fluorescence decay and the temporal broadening of the fluoresced light.

3. DATA PROCESSING

To eventually locate a fluorescent inclusion using information from early photons times of flight, we need to assign these photons a stable arrival time. In an ideal case, this would be the time at which the FTPSF starts

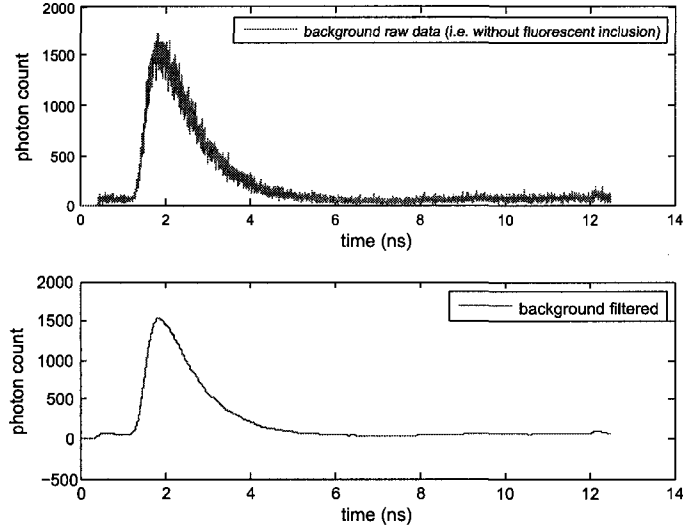


Figure 4. Plot of the signal obtained without a fluorescent inclusion embedded in the phantom. A small amount of laser leak-through is detected (max. number of photon counts around 1500)

rising. However, this is prone to noise in real measurements, since few photons are detected in that portion of the FTPSF. Using the rising edge of the FTPSF is a better alternative, but a leading edge discriminator cannot be used since FTPSFs vary in amplitude depending on the location of the inclusion. This is analogous to the difficulty met in the electronic detection of single photon PMT pulses in TCSPC systems.⁹ We thus implemented a numerical constant fraction discriminator (NCFD) technique. The NCFD is designed to trigger on a certain optimum fraction of the FTPSF height. It results in a bipolar signal with a zero crossing which is independent of the pulse amplitude. *These zero crossings correspond to the arrival time we assign to the early fluoresced photons.* Fig. 5 illustrates the steps to achieve the NCFD. Each FTPSF and the background measurement were first smoothed with a digital Butterworth low-pass filter of order 2 and cutoff frequency at 3GHz. Thereafter the smoothed background was subtracted from the smoothed FTPSF. This will be called the background subtracted filtered FTPSF (BSFTPSF). The BSFTPSF was then delayed (delay = 0.48ns), inverted and attenuated by a fraction η of the original amplitude*. This was next added to the BSFTPSF. The bipolar signal obtained is finally analyzed to find its zero crossing.

4. RESULTS

The NCFD was applied to each FTPSF to find a relationship between the zero crossing and the position of the fluorescent inclusion in the scattering medium. As Fig. 6 exhibits, there is a nice quasi-linear relationship between the positions of the inclusion and the arrival times of early photons in the range from $-1.2cm$ to $+2cm$ for both perpendicular and parallel measurements. From $-1.2cm$ to $-2cm$, the data do not follow the same trend as the rest of the data. In fact, in this range, not enough fluoresced photons are collected for reliable data to be acquired. Fig. 7 (a) and (b) shows the degradation of the raw FTPSFs for perpendicular and parallel measurements as the

* η was set to 1.0 (no attenuation)

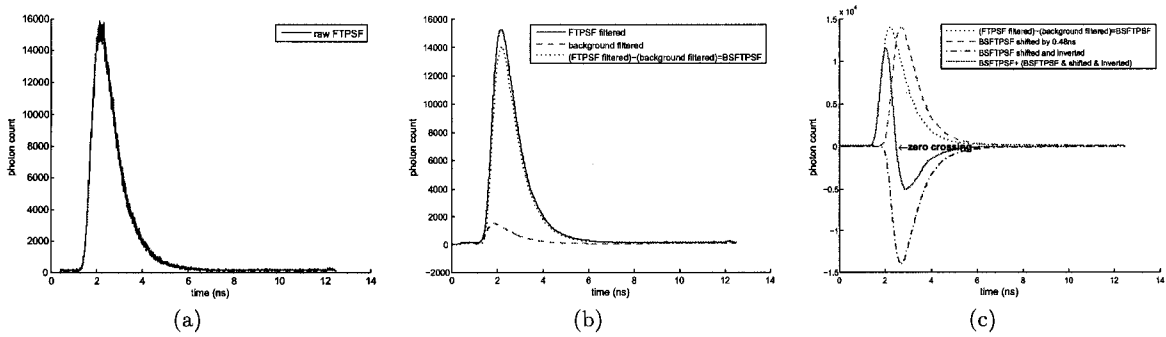


Figure 5. Steps to achieve our NCFD shown for raw data from a perpendicular measurement at position $+1.2cm$. (a) Raw data (FTPSF). (b) Filtered background signal subtracted from filtered FTPSF (BSFTPSF). (c) BSFTPSF added to a time delayed inverted version of the BSFTPSF resulting in a bipolar signal with a zero crossing.

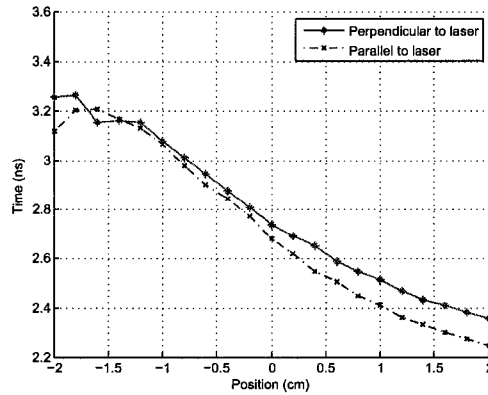


Figure 6. Graph showing the linear relationship between the positions of the fluorescent inclusion and the arrival time of early fluoresced photons as determined with our NCFD technique.

inclusion gets farther, and Fig. 7 (c) shows the NCFD result for a perpendicular measurement at $-1.2cm$. Notice the oscillations in the NCFD signal. We eliminate these cases by a simple thresholding technique: FTPSFs that do not contain enough photons are rejected (which is equivalent to say that the photon count rate was too low when they were acquired). For parallel measurements, this occurs when the inclusion is getting too far from the entry point of the laser into the phantom. Then not enough laser power reaches the inclusion to produce a reliable measurement at the detection spot on the phantom. In the case of perpendicular measurements, the inclusion is too far from the detection spot below $-1.2cm$. This shows clearly in Fig. 8 which serves to compare perpendicular measurements at (a) $-1.2cm$ and (b) $+1.2cm$. Because of the symmetry of these positions with respect to the laser entry point, there is definitely enough laser light reaching the inclusion at $-1.2cm$. The reason is as follows: In perpendicular measurements, the path traveled by the laser light to reach the inclusion and the laser power exciting the inclusion are the same for symmetrical positions with respect to the center of the phantom ($0cm$), see Fig. 3 (a). The only parameter that influences the arrival time of the early fluoresced photons and the fluorescence intensity reaching the detection spot is the distance traveled from the inclusion to

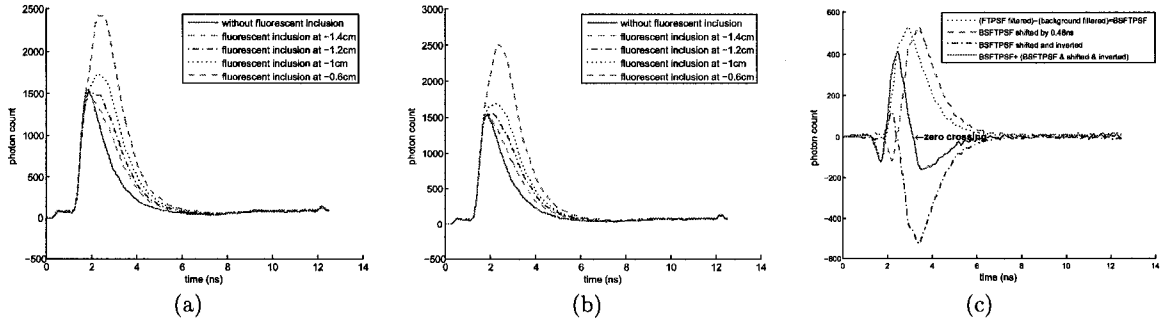


Figure 7. Filtered FTSPFs showing the degradation of the signal when the fluorescent inclusion is getting farther (a) from the detector in the case of perpendicular measurements, and (b) from the laser entry point in the case of parallel measurements. The farther the inclusion, the more alike is the signal to a background measurement. This illustrates the necessity for a background measurement. (c) shows the NCFD results for the -1.2cm measurement. Notice how the NCFD signal oscillates, being much more unstable as compared to FTSPFs containing more photons, see *e.g.* Fig. 5 (c).

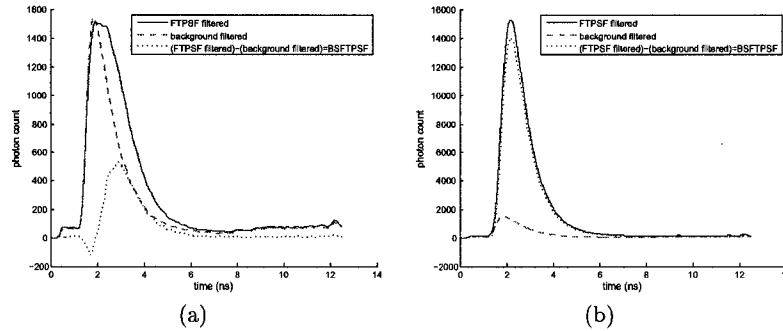


Figure 8. Comparing data at (a) -1.2cm and (b) +1.2cm for perpendicular measurements. Notice that the extent of the vertical scales are not the same in (a) and (b).

that spot. A similar reasoning is applicable to parallel measurements (see Fig. 3 (b)): For symmetrical positions of the fluorescent inclusion with respect to the center, the distance traveled by the fluoresced light to reach the detection spot is the same, but the path followed by the laser light that differs.

5. CONCLUSIONS AND FUTURE WORK

This work has focused on a stable NCFD technique to determine the arrival time of early photons in FTSPFs. It does not depend on the FTSPF amplitude, and is minimally prone to noise. Our measurements, made in a non-contact manner, and our experimental results show the usefulness of this technique in providing depth information from time-resolved signals. Indeed, a linear relationship between the arrival time and the depth of a fluorescent inclusion was demonstrated. These are very encouraging results towards deriving a time-of-flight based fluorescence diffuse optical tomography reconstruction algorithm for a non-contact small animal scanner we are developing. We were able to establish a simple criterion for discarding FTSPFs that do not provide

reliable arrival timing information. Our technique has the additional attractive feature that lower cost modern ultra-fast TCSPC technology can be used, instead of more expensive streak cameras, to determine precise timing information about early photons. This, even though TCSPC does not have the exquisite temporal resolution of streak cameras. In this respect, we nevertheless rely on the ability of modern TCSPC hardware to provide for high SNR and high sensitivity measurements. Our approach does not require obscure parameter selection. Only the delay and attenuation needed to implement the NCFD are required, parameters which have a simple sound physical interpretation. We are currently working on our next step, which is to use our NCFD technique to infer the 3D position of a fluorescent inclusion.

6. ACKNOWLEDGMENTS

Support from Spectra-Physics, Boston Electronics and Becker&Hickl in a Canada Foundation for Innovation (CFI) On-going New Opportunities Fund is gratefully acknowledged. This CFI grant has allowed the purchase of the major equipments used in this work. Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (Discovery Grant and Research Tools and Instruments Grant) and the Université de Sherbrooke (Fonds de démarrage) has also made this research possible.

REFERENCES

1. e. G. Mueller et al., *Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring*, SPIE Institutes for Advanced Optical Technologies, SPIE Press, 1993.
2. M. S. Patterson, B. Chance, and B. C. Wilson, "Time resolved reflectance and transmittance for the noninvasive measurement of tissue optical properties," *Appl. Opt.* **28**, pp. 2331–2336, 1989.
3. J. Wu, Y. Wang, L. Perelman, I. Itzkan, R. Dasari, and M. Feld, "Time-resolved multichannel imaging of fluorescent objects embedded in turbid media," *Opt. Lett.* **20**, pp. 489–491, 1995.
4. J. Wu, L. Perelman, R. Dasari, and M. Feld, "Fluorescence tomographic imaging in turbid media using early-arriving photons and laplace transforms," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, pp. 8783–8788, 1997.
5. P. Gallant, A. Belenkov, G. Ma, F. Lesage, Y. Wang, D. Hall, and L. McIntosh, "A quantitative time-domain optical imager for small animals in vivo fluorescence studies," in *OSA Conf. Biomed. Optics*, p. Paper WD2, 2004.
6. W. Long, Y. Bérubé-Lauzière, D. Hall, and L. McIntosh, "Method and apparatus for time resolved optical imaging of biological tissues as part of animals." US Pat. 6,992,762, January 2006.
7. F. E. W. Schmidt, M. E. Fry, E. M. C. Hillman, J. C. Hebden, and D. T. Delpy, "A 32-channel time-resolved instrument for medical optical tomography," *Rev. Sci. Instrum.* **71**, pp. 256–265, 2000.
8. J. Ripoll, M. Nieto-Vesperinas, R. Weissleder, and V. Ntziachristos, "Fast analytical approximation for arbitrary geometries in diffuse optical tomography," *Optics Letters* **27**, pp. 527–529, 2002.
9. W. Becker, *Advanced time-correlated single photon counting techniques*, Springer, New York, 2005 (1st Edition).

CHAPITRE 7

Photonics North 2007 : TOF Algorithm

7.1 Mise en contexte

Cet article a été publié dans le cadre de la conférence *Photonics North 2007* à Ottawa en juin 2007. Une présentation orale résumant les résultats de nos recherches a été faite le mardi 5 juin 2007 dans le cadre de la conférence.

7.2 Titre de l'article

Version anglaise

A wavefront intersection algorithm for time-of-flight non-contact diffuse optical tomography of fluorescent inclusions in thick turbid media

Version française

Algorithme d'intersection de fronts d'ondes pour tomographie optique diffuse sans contact d'une inclusion fluorescente en milieu diffusant par temps de vol

7.3 Auteurs

Vincent Robichaud et Yves Bérubé-Lauzière

Laboratoire *TomOptUS*, Département de génie électrique et de génie informatique

Université de Sherbrooke, 2500 boul. Université, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada

7.4 Résumé de l'article

Dans les travaux précédents, nous avons introduit une version numérique du discriminateur à fraction constante (NCFD) permettant le traitement de signaux optiques résolus en temps. Cette technique permet d'extraire de manière stable, le temps d'arrivée des premiers photons émis par une inclusion fluorescente noyée dans un milieu diffusant. Nous avons démontré de manière expérimentale qu'il existe une relation quasi-linéaire entre ces temps d'arrivée et la profondeur de l'inclusion. Dans cet article, nous exploitons cette relation *temps vs profondeur* pour déduire la position de l'inclusion par l'entremise d'un algorithme par temps de vol. L'algorithme développé utilise un détecteur de référence ; le temps d'arrivée qui lui est associé est soustrait des temps enregistrés par les autres détecteurs. On obtient ainsi des temps d'arrivée relatifs provenant de plusieurs positions de détecteur autour du milieu diffusant. Ces temps relatifs servent à localiser la position de l'inclusion dans le plan horizontal. L'algorithme ainsi développé procure une localisation précise de l'inclusion, démontrant le plein potentiel de la localisation de fluorescence basée directement sur une approche par temps de vol. Un schéma bloc de l'algorithme est présenté en annexe A.

A wavefront intersection algorithm for time-of-flight non-contact diffuse optical tomography of fluorescent inclusions in thick turbid media

Vincent Robichaud and Yves Bérubé-Lauzière

Laboratoire TomOptUS, Département de génie électrique et de génie informatique
Université de Sherbrooke, 2500 boul. Université, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada

ABSTRACT

In previous work, we have introduced a numerical constant fraction discrimination (NCFD) technique for processing time-resolved optical signals. It allows to extract, in a stable manner, the arrival time of early photons emitted by a fluorescent inclusion embedded in a scattering medium. We showed experimentally that these arrival times correlate quasi-linearly with inclusion depth. We now exploit this arrival time vs depth relationship for inferring the inclusion position by way of a time of flight algorithm. The algorithm uses the relative arrival times measured at several detector positions around the scattering medium with respect to a reference detector position. The latter is chosen as that detector position for which the arrival time is shortest. Our approach provides accurate inclusion localization, showing the potential of direct time-of-flight fluorescence diffuse optical tomography.

Keywords: Fluorescence diffuse optical tomography, numerical constant fraction discrimination, time-of-flight, volumetric optical imaging

1. INTRODUCTION

Fluorescence diffuse optical tomography (FDOT) aims to find the position of fluorescent heterogeneities in 3D in thick turbid media non-invasively by optical imaging techniques.^{?,1} In our work, we perform optical measurements in a non-contact manner with the medium, thereby implementing non-contact FDOT which is a necessity as we target small animal imaging. The advantages of non-contact measurements in this context have been clearly expounded by Schulz *et al.*² Fluorescence imaging in intact living organisms leads to *in vivo* optical molecular imaging which is of great interest for the medical and pharmaceutical communities, as small animals are extensively used in biomedical research.³ In previous work,⁴ we have introduced a numerical constant fraction discrimination (NCFD) technique for processing time-resolved optical signals. It allows to extract, in a stable manner, the arrival time of early photons emitted by a fluorescent inclusion embedded in a scattering

Correspondence should be sent to Vincent.Robichaud@USherbrooke.ca

Copyright 2007 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) This paper was published in Proceedings of SPIE Vol. SPIE 6796 - Photonics North 2007 Conference and is made available as an electronic reprint with permission of SPIE. One print or electronic copy may be made for personal use only. Systematic or multiple reproduction, distribution to multiple locations via electronic or other means, duplication of any material in this paper for a fee or for commercial purposes, or modification of the content of the paper are prohibited.

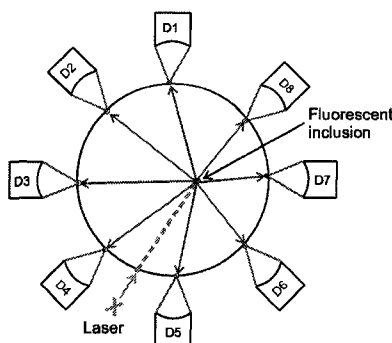


Figure 1. Time of flight (TOF) approach. The fluorescent signal will reach the detector D7 first resulting in the shorter arrival time. Similarly, detector D3 will record the longer arrival time.

medium. Our experimental results showed that these arrival times correlate quasi-linearly with inclusion depth. We now exploit this arrival time vs depth relationship for inferring the position of the inclusion by way of a novel time-of-flight (TOF) FDOT algorithm. Our approach is similar in spirit to that of Feld,⁵ but it is more direct in the sense that no free proportionality factor is left unknown (see in particular Eq.(1) in Feld's paper⁵). Our experimental set-up detects the optical signals in a multi-view ring configuration. The algorithm uses relative arrival times measured at several positions around the scattering medium with respect to a reference position, which is a further distinction from Feld's work.

Section 2 provides the motivations for our approach. Section 3 details the materials and the experimental set-up used for our measurements which are described in Sect. 4. Data processing is discussed in Sect. 5, along with experimental results obtained on a cylindrical thick turbid medium with optical properties representative of biological tissues. These results illustrate the capability of our technique to find the position of a small 3mm diameter spherical inclusion filled with indocyanine green (ICG). Finally, Sect. 6 presents conclusions of our work.

2. OVERVIEW OF THE APPROACH

The rationale behind our approach is best understood by referring to Fig. 1. Consider the fluorescent inclusion embedded in a scattering medium as a secondary source emitting spherical pulses of fluorescence as it is excited by ultra-short laser pulses. The time for a fluorescence pulse to reach each detector will be proportional to the inclusion-detector distance. Hence, being able to measure this time at each detector position provides depth information about the inclusion relative to that position. From the point of view of each detector position, however, all that can be said is that the inclusion must lie on a sphere of radius proportionnal to the arrival time of the fluorescent pulse. The intersection of these spheres should then coincide with the position of the inclusion. In practice, however, it is not that simple because we cannot measure directly the time for a pulse to travel from inclusion to detector as will be described shortly.

We resort to time-correlated single photon counting (TCSPC) for detecting fluorescence pulses. Fig. 2 illustrates a typical fluorescence curve we measure with TCSPC, called a fluorescence time point-spread function (FTPSF). It is a histogram of the number of fluoresced photons as a function of their arrival time at a detector.

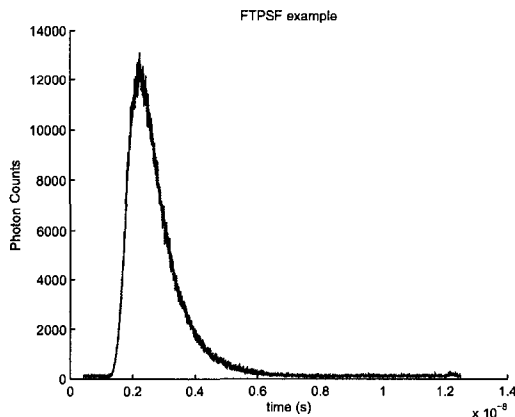


Figure 2. Example of an FTPSF recorded with TCSPC.

When normalized appropriately, it can be interpreted as a probability distribution of photons time-of-flight. It combines the effects of temporal broadening due to scattering of a laser excitation pulse as it reaches a fluorescent inclusion, the decay characteristics of the fluorophore used in the inclusion (the so-called lifetime), and temporal broadening due to scattering of the fluoresced pulse.

When we say we detect the arrival of a fluorescence pulse, we mean detection of the early part (*i.e.* rising edge) of its associated FTPSF. Photons in that part of the FTPSF are called early or "snake" photons, since their trajectory wanders nearby the ballistic trajectory*. For a given detector position, the arrival time corresponds to the time taken by early photons to reach the detector. Referring to Fig. 3, the arrival time we measure is the combination of several different times (T1, T2, T3, T4, and T5 in the figure). The problem is that we do not have access to these times individually, but only to their sum, since we do not know where the inclusion is (we are indeed trying to find it!). However, we know that for a given fixed position of the point at the boundary of the scattering medium where the laser beam is injected into the medium (laser injection point), the only parameter that varies with detector position is T3, *i.e.* the time taken by a fluorescence pulse to reach the scattering medium boundary. Thus, by choosing one of the detectors to serve as a reference and by subtracting the arrival time at the reference detector to those at the other detectors, we obtain time differences that solely depend on the travel of early fluoresced photons *within* the medium. These "measured" time differences will be exploited to find the *radial* position of the inclusion in the scattering medium as explained in detail in Sect. 5.

Finding the angular position of the inclusion is based on the following observation. If we consider the set of arrival times for a given position of the laser injection point, then the detector that records the smallest arrival time is the one closest to the inclusion. Thus, the angular position of this detector is a good approximation to the angular position of the inclusion provided the angular difference between successive detector positions is small. By collecting the radial and angular information for multiple projections around the object and averaging the results, we obtain a measure of the inclusion's position which will be considered to be the inclusion's position. In our terminology, a projection corresponds to a set of FTPSFs measured at several detector positions around the

*In practice ballistic photons are never detected in scattering media of thicknesses ≥ 1 cm with optical properties alike those of biological tissues in which we are interested here.⁶

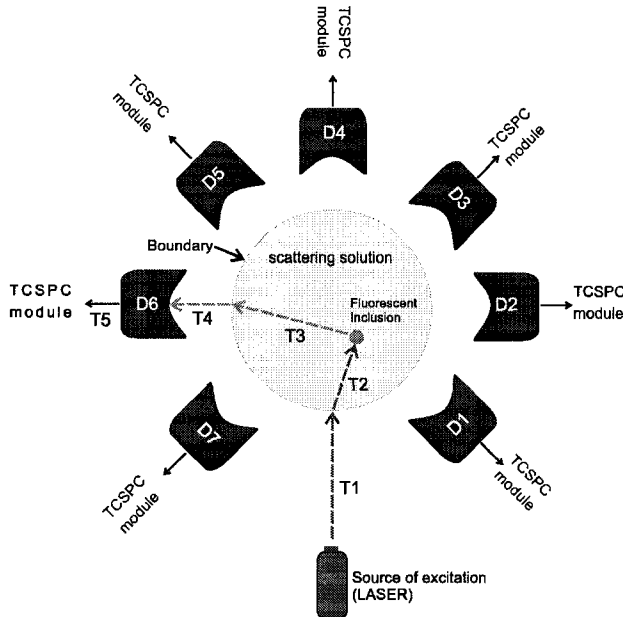


Figure 3. The time recorded via our TCSPC system is $T_1 + T_2 + T_3 + T_4 + T_5$ (T_1 = time taken by the laser to reach the solution boundary, T_2 = time between the boundary and the fluorescent inclusion, T_3 = time from the inclusion to the boundary of the scattering medium, T_4 = time between the boundary and the detector and T_5 = electronics delays. As far as localizing the inclusion is concerned, T_3 is the time of interest.

scattering medium for a given laser injection point position (this is similar to fan-beam measurements in X-ray CT).

A key aspect to our approach is the necessity to assign a stable arrival time to early photons since our fluorescence localization technique requires consistent and accurate arrival times. Because the amplitudes of FTPSFs vary in amplitude depending on the position of the inclusion, arrival times need to be amplitude independent. For this purpose, we resort to a method we have developed earlier, called numerical constant fraction discrimination (NCFD),⁴ able to extract these arrival times. Fig. 4 summarizes the steps. The NCFD is designed to trigger on a certain optimum fraction of the height of a fluorescence time point-spread function (FTPSF). It results in a bipolar signal with a zero crossing independent of the pulse amplitude. The zero crossing corresponds to the arrival time we assign to the early fluoresced photons. Constant fraction discrimination is a standard technique in ultra-fast electronics that require precise timing of electrical pulses (such as in TCSPC electronics⁷). We have transposed it for processing time-resolved signals numerically.

3. MATERIALS AND EXPERIMENTAL SET-UP

3.1. Optical set-up

A schematic of our experimental setup is shown in Fig. 5. A Tsunami laser (Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA, wavelength set to 780nm, max output power = 750mW, rep. rate = 80MHz, pulse duration = 150fs FWHM) is used to illuminate the scattering medium (phantom) and excite the fluorescent inclusion. Detection is made

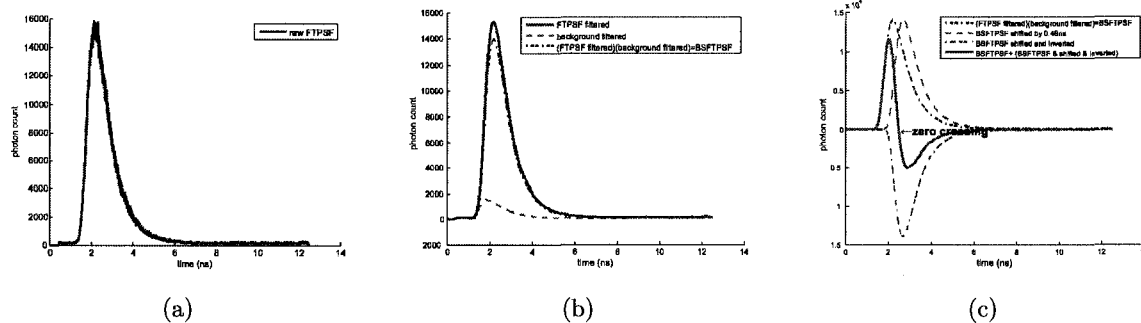


Figure 4. Steps to achieve our NCFD. (a) Raw data (FTPSF). Each FTPSF and the background measurement are first smoothed (here a digital Butterworth low-pass filter of order 2 and cutoff frequency at 3GHz is used). The smoothed background is then subtracted from the smoothed FTPSF. This is called the background subtracted filtered FTPSF (BSFTPSF) and is shown in (b). The BSFTPSF is then delayed (delay = 0.48ns), inverted and attenuated by a fraction η of the original amplitude (η was set to 1.0, *i.e.* no attenuation). This is next added to the BSFTPSF. The bipolar signal obtained (c) is finally analyzed to find its zero crossing.

using a time-correlated single photon counting (TCSPC) system (SPC-134 and PMC-100 PMT, Becker&Hickl GmbH, Berlin, Germany). The PMT is cooled for reducing dark counts. To ensure an appropriate collection rate, the average output laser power is attenuated by a certain amount depending on the experiment (the power is typically in the range from 10 to 40mW). The diffused fluorescence light exiting the phantom is collected by a first plano-convex lens (focal length = 25.4mm) and then imaged onto the photocathode of the PMT by a second plano-convex lens (focal length = 200mm). With this configuration we image a $\phi = 1.25$ mm spot on the phantom onto the whole surface area of our PMT ($\phi = 10$ mm). Between the two lenses, interference filters (Omega Filters, Brattleboro, VT, USA) are inserted to attenuate as much as possible the laser wavelength.

Presently, our experimental set-up includes only one detector. This is why the detector and collection optics are attached to a rotational disc. In this manner, we can simulate a set of detectors by moving our detector around the object. This is very useful for development purposes, as it allows to test detection at arbitrary angles. We are currently working on an experimental set-up with 16 detectors distributed over nearly 360° in a fan-beam like configuration as discussed by Pogue *et al.*⁸

As mentioned in Sect. 2, we acquire multiple tomographic projections to compute an average position of the inclusion. To obtain multiple projections with our experimental set-up (and with the tomograph we are developing), instead of rotating the laser around the phantom[†] to inject the laser at different points, we rotate the phantom and keep the laser beam fixed since this is easier. This is done with a rotation stage onto which the cylinder containing the scattering medium is placed. Rotating the cylinder by an angle α is the same as if we were rotating the laser beam around and injecting it at an angle $-\alpha$. We will nevertheless talk in terms of rotating the laser beam on some occasions (although we do not do that in practice), since it is equivalent and more convenient to think that way in certain situations. This corresponds to taking the point of view that the cylinder is fixed and the laser moves. In this case, we say we are working in the cylinder's reference frame. To make things clear, we will use the following notation related to the angle α : $[\alpha_{cyl}]_{laser}$ means that we are

[†]Small animal in the case of the tomograph.

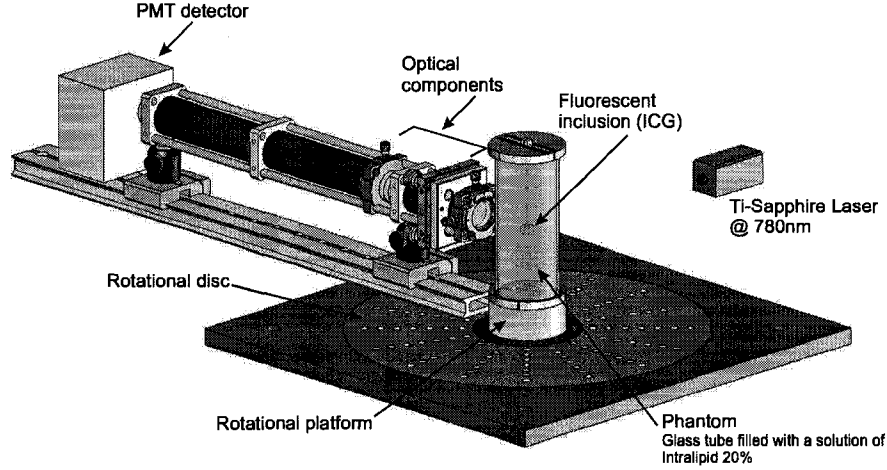


Figure 5. Schematic of the experimental setup showing the laser source, the phantom containing the fluorescent inclusion, the optical components (lens, attenuator, filters), and the PMT detector.

thinking in terms of rotating the cylinder in the laser reference frame (which is the actual angle of rotation of the cylinder in our set-up) and $[\alpha_{laser}]_{cyl}$ means that we are thinking in terms of rotating the laser beam in the cylinder's reference frame. Or course, $[\alpha_{laser}]_{cyl} = -[\alpha_{cyl}]_{laser}$. Then, to each angular position of the cylinder $[\alpha_{cyl}]_{laser}$ (or equivalently of the laser $[\alpha_{laser}]_{cyl}$), there corresponds a projection $P_{[\alpha_{cyl}]_{laser}}$ (or $P_{[\alpha_{laser}]_{cyl}}$).

3.2. Phantoms

We used a phantom to simulate tissue optical properties. It consisted of a 5cm outer diameter glass tube (wall thickness = 1.5mm, height = 12cm) filled with a 48:1 (V/V) aqueous dilution of Intralipid® 20% (Baxter). This suspension liquid yields a scattering coefficient of $\mu'_s = 5cm^{-1}$.⁹ In this scattering solution we inserted a fluorescent inclusion made with a glass tube (O.D. = 4mm, wall thickness = 0.5mm, length = 1cm, capped at both ends) filled with indocyanine green (ICG) (Fisher Scientific), a NIR fluorescent agent (absorption peak @ 780nm, emission peak @ 830nm), at a concentration of $10\mu mol/l$. Due to the poor stability of ICG in aqueous solution, we added sodium polyaspartate (PASP) to enhance fluorescence stability.¹⁰ Finally, the inclusion was attached at one end with a very thin rod to allow us to fix it at a constant height along the z axis while being able to move it in the $x-y$ plane.

4. MEASUREMENTS

As mentioned in the previous section, measurements consisted of multiple tomographic projections around the phantom. Due to mechanical restrictions, it was impossible to collect fluorescent signals between $-40^\circ (= 320^\circ)$ and $+40^\circ$. This is the reason why results are presented for detector angles from 40° to 320° . Note that angles are measured counterclockwise with respect to the laser beam, the latter being at 0° .

The first plano-convex collection lens was positioned a focal distance away from the cylinder's surface. The laser beam was adjusted at the same height as the inclusion so that it hit the phantom at the center (we are considering planar measurements here). As shown in Fig. 6, measurements for a given tomographic projection

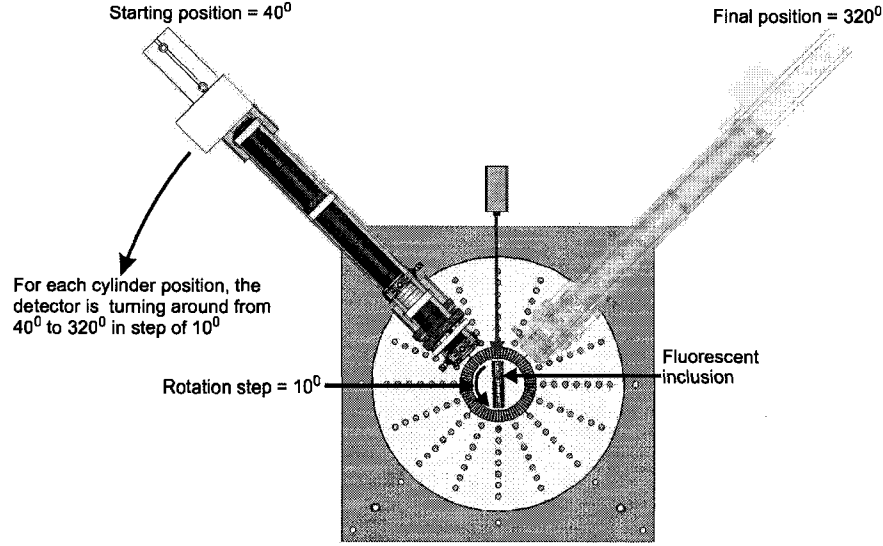


Figure 6. Top view of the setup. For each angular position of the cylinder (phantom), the detector is rotated around from 40° to 320° in steps of 10° .

(*i.e.* a given cylinder position) were acquired by rotating the detector around the cylinder from 40° to 320° in steps of 10° . The next projection is then acquired after rotation of the cylinder by 10° and repeating the process (rotation of the detector). After acquisition of the projections, background measurements without an inclusion immersed into the medium were also made for each detector position. These backgrounds are used in our NCFD technique, see Fig. 4. The reason for this is that, at present, light at the laser wavelength slightly contaminates our fluorescence measurements. This is caused by our interference filters that do not provide sufficient extinction at the laser wavelength. We are working on this temporary problem and in a near future we will not need to acquire background measurements anymore.

5. DATA PROCESSING AND RESULTS

To relate arrival times to distances traveled by diffused fluorescence pulses, we need an estimate of their speed in the medium. We have developed an experimental technique for this.¹¹ It yields an average speed of 4×10^7 m/s for the scattering medium we have used here. Knowing this speed, we are now ready to exploit arrival times.

The results presented next were obtained by placing the fluorescent inclusion at a radial position of +1cm and initially parallel to the laser beam axis (*i.e.* angular position of 0°) when the cylinder was at $[\alpha_{cyl}]_{laser} = 0^\circ$, as shown in Fig. 6. Thus cylinder angle and inclusion angle are the same. Note that in a real situation, we don't know the inclusion's position, we are trying to find it. The fact that we know it here allows to validate our approach. The laser power delivered to the cylinder was 10mW. Since no detection is made between 320° and 40° , all tomographic projections contain data in the range from 40° to 320° . Recall that the goal of the tomographic algorithm is to recover the position of the inclusion within the cylinder, *i.e.* with respect to the cylinder's reference frame.

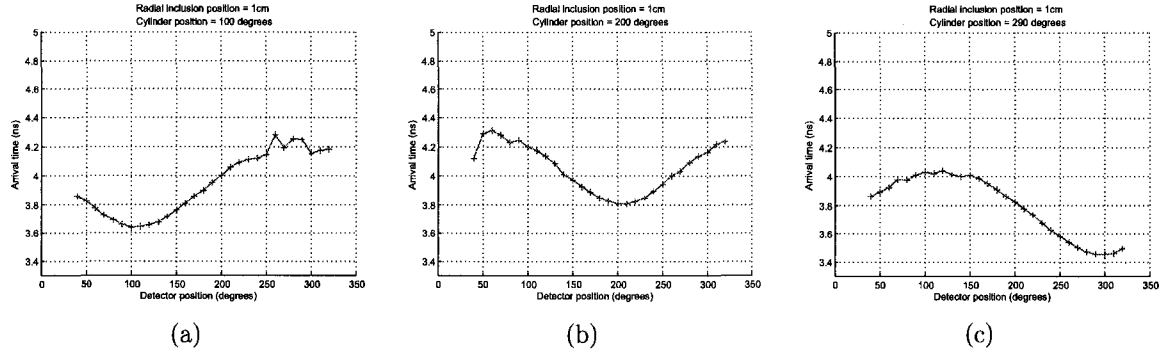


Figure 7. Graphs showing the arrival time as a function of detector position for different angular positions of the cylinder. The shortest arrival time occur at the detector which is closest to inclusion.

5.1. Angular position of the inclusion

For each FTPSF in a tomographic projection, NCFD is applied to get the arrival time of the fluorescent signal as a function of detector position. Fig. 7 shows results for different cylinder angular positions (in the laser reference frame), each cylinder position corresponding to a projection. Notice that, in each of these graphs, the shortest arrival time occurs for the detector closest to the inclusion. For a given projection $P_{[\alpha_{cyl}]_{laser}}$, we consider the angular position of the shortest time (ST) detector to be the angular position of the inclusion in the laser reference frame *as predicted from that projection*. This angular position is denoted by $\gamma_{ST, [\alpha_{cyl}]_{laser}}$. This angle is next reported in the cylinder reference frame since we ultimately want to know the inclusion's position within the cylinder. To do this, $[\alpha_{cyl}]_{laser}$ is subtracted from the detector's angle in the laser reference frame. We finally get $\gamma_{ST, [\alpha_{laser}]_{cyl}} = \gamma_{ST, [\alpha_{cyl}]_{laser}} - [\alpha_{cyl}]_{laser}$.

Finally, the average of all shortest time detector angles referred to the cylinder reference frame found for all projections is computed.

$$[\gamma_{incl}]_{cyl} = \langle \gamma_{ST, [\alpha_{laser}]_{cyl}} \rangle_{\text{over all projections}}, \quad (1)$$

with $\langle \rangle$ meaning the average. This average gives what we consider to be in our approach the angular position of the inclusion $[\gamma_{incl}]_{cyl}$ which will be referred to as the averaged angle of minimal arrival times. The radius corresponding to this angle will be called the radius of minimal arrival times and the inclusion is supposed to lie on this radius.

5.2. Radial position of the inclusion

There remains to find the radial position of the inclusion along the radius of minimal arrival times. For this, we exploit the experimental time differences alluded to in Sect. 2 and compare them to time differences computed for a set of several possible positions along the radius of minimal arrival times. We use positions at every millimeter from the center to the boundary of the cylinder. The radial position corresponding to the smallest discrepancy between experimental and computed "theoretical" time differences will be taken as the inclusion's position.

Let $\mathcal{R} = \{\rho_i\}_{i=1}^R$ be the set of possible radial positions and $\mathcal{P} = \{P^n\}_{n=1}^N$ the set of projections. For each projection P^n , the first step consists in computing the "theoretical" times it would take for the fluorescence pulses to propagate from a given inclusion position ρ_i to the different points on the boundary of the scattering medium associated to each detector position in the projection. This theoretical time is obtained by computing the

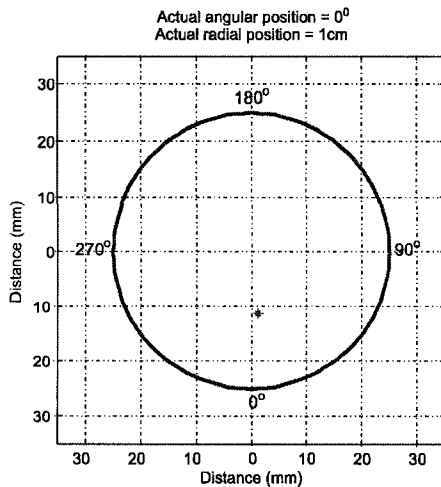


Figure 8. Inclusion localization with our approach. The actual radial and angular positions are respectively 10mm and 0° . Our algorithm finds respectively 11mm and 5.8° .

geometrical distance from the inclusion to a given boundary point and using the average speed in the scattering medium to convert this distance into a time. The second step computes theoretical time differences, using as reference detector the one associated with the shortest arrival time obtained experimentally.

At this point, we get for each position ρ_i a vector $\Delta \mathbf{t}_{i,theo}^n$ containing theoretical time differences as a function of detector position for projection P^n . These vectors are compared against their corresponding experimental counterparts $\Delta \mathbf{t}_{exp}^n$ in a least squares sense, *i.e.* we compute the following individual discrepancies

$$\delta_i^n = \|\Delta \mathbf{t}_{i,theo}^n - \Delta \mathbf{t}_{exp}^n\|^2. \quad (2)$$

We select the index i_{min}^n of possible inclusion positions that corresponds to the smallest discrepancy and keep the associated position $\rho_{i_{min}}^n$ in memory. This is repeated for all projections. Finally, the average of the radial positions found over all projections, *i.e.*

$$\bar{\rho} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \rho_{i_{min}}^n, \quad (3)$$

is considered to be the radial position of the inclusion. This average radial position together with the averaged angle of minimal arrival times $[\gamma_{incl}]_{cyl}$ is then the final position of the inclusion determined by our approach.

Fig. 8 shows the reconstruction obtained with our method. The angular and radial positions found are respectively 5.8° and 11mm which is close to what we should have found. Other results are presented in Fig. 9 for different initial angular and radial positions.

We have noticed that when the inclusion is closer to the center of the cylinder, the error on the angular position is larger (Fig. 9 (a) is an example). This can be explained by the fact that in such cases the detectors receive less fluorescence signal. Decreasing the step between successive detector positions would probably improve our results (but also the acquisition time). Note also that the way in which the inclusion is held in the solution at present does not allow to know its absolute exact position in the scattering medium better than to within

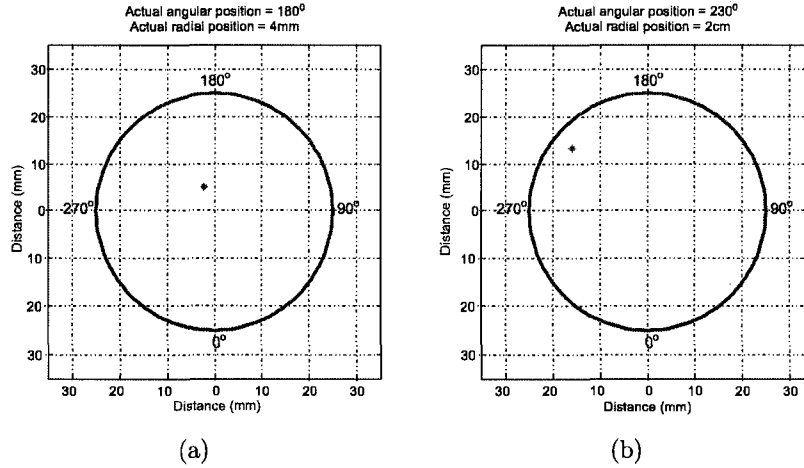


Figure 9. Others inclusion localizations performed with algorithm. Radial and angular positions found were respectively (a) 5.5mm and 204° (true positions 4mm and 180°) (b) 20.7mm and 230° (true positions 20mm and 230°).

1mm in each dimension. Consequently, it is not possible at this time to fully characterize the precision of our method. Nevertheless, the method we developed is intuitive and performs good reconstructions showing the great potential of direct time of flight localization of fluorescent inclusions.

6. CONCLUSION

In this work we developed a novel approach enabling direct time of flight diffuse optical tomography for localizing a fluorescent inclusion. To achieve this, we used a NCFD technique to determine the arrival time of early photons. NCFD has the advantage not to depend on the signal amplitude and is minimally prone to noise. Made in a non-contact manner, our experimental results show the validity of our algorithm where inclusion localizations were near to reality. This is a simple, fast and effective technique. At present, we are not able to quantify the precision of our system for the simple reason that we can't know the exact position of the inclusion in the medium. We need to improve our experimental set-up in this respect, which will be part of future work. Our experimental results show clearly that this novel approach provides accurate reconstruction in terms of localizing the position of a fluorescent inclusion in a plane. We are currently working to go one step further by exploiting this novel approach for inferring the 3D position of the inclusion.

7. ACKNOWLEDGMENTS

Support from Spectra-Physics, Boston Electronics and Becker&Hickl in a Canada Foundation for Innovation (CFI) On-going New Opportunities Fund is gratefully acknowledged. This CFI grant has allowed the purchase of the the major equipments used in this work. Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (Discovery Grant and Research Tools and Instruments Grant) and the Université de Sherbrooke (Fonds de démarrage) has also made this research possible.

REFERENCES

1. V. Ntziachristos and R. Weissleder, "Charge-coupled-device based scanner for tomography of fluorescent near-infrared probes in turbid media," *Medical Physics* **29**, pp. 803–809, 2002.
2. R. Schulz, J. Ripoll, and V. Ntziachristos, "Experimental fluorescence tomography of tissues with noncontact measurements," *IEEE Transactions on Medical Imaging* **23**(4), pp. 492–500, 2004.
3. T. Massoud and S. Gambhir, "Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light," *Genes & Development* **17**, pp. 545–580, 2003.
4. Y. Bérubé-Lauzière and V. Robichaud, "Time-resolved fluorescence measurements for diffuse optical tomography using ultrafast time-correlated single photon counting," in *Advanced Photon Counting Techniques, SPIE Optics East*, W. Becker, ed., *Proceedings of SPIE* **6372**(Paper 6372-6), pp. 637206–1 – 637206–8, 2006.
5. J. Wu, Y. Wang, L. Perelman, I. Itzkan, R. Dasari, and M. Feld, "Time-resolved multichannel imaging of fluorescent objects embedded in turbid media," *Optics Letters* **20**(5), pp. 489–491, 1995.
6. W. Becker, *The bh TCSPC Handbook*, Becker&Hickl GmbH, Available for download at www.becker-hickl.com, Berlin, Germany, 2005 (1st Ed.).
7. W. Becker, *Advanced time-correlated single photon counting techniques*, Springer, 2005 (1st Ed.).
8. B. Pogue, T. McBride, U. Osterberg, and K. Paulsen, "Comparison of imaging geometries for diffuse optical tomography of tissue," *Optics Express* **4**(8), pp. 270–286, 1999.
9. J. Ripoll, M. Nieto-Vesperinas, R. Weissleder, and V. Ntziachristos, "Fast analytical approximation for arbitrary geometries in diffuse optical tomography," *Optics Letters* **27**(7), pp. 527–529, 2002.
10. R. Rajagopalan, P. Uetrecht, J. Bugaj, S. Achilefu, and R. Dorshow, "Stabilization of the optical tracer agent indocyanine green using noncovalent interactions," *Photochemistry and Photobiology* **71**(3), pp. 347–350, 2000.
11. Y. Bérubé-Lauzière and V. Robichaud, "Time-of-flight non-contact fluorescence diffuse optical tomography with numerical constant fraction discrimination," in *Invited Oral Presentation at Diffuse Optical Imaging in Tissue, European Conferences on Biomedical Optics, Munich, Germany*, **6629**(Paper 6629-34), 2007.

CHAPITRE 8

Optics East 2007 : Détermination de la tranche

8.1 Mise en contexte

Cet article a été publié dans le cadre de la conférence *Optics East 2007* à Boston en septembre 2007. Une présentation orale résumant les résultats de nos recherches a été faite lors de la séance portant sur le comptage de photons corrélé en temps.

8.2 Titre de l'article

Version anglaise

Time-of-flight 3D localization of fluorescent inclusions in thick turbid media with ultra-fast TCSPC APDs and electronics

Version française

Localisation 3D d'une inclusion fluorescente en milieu diffusant par temps de vol utilisant une APD et une électronique TCSPC ultra-rapide

8.3 Auteurs

Vincent Robichaud et Yves Bérubé-Lauzière

Laboratoire *TomOptUS*, Département de génie électrique et de génie informatique

Université de Sherbrooke, 2500 boul. Université, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada

8.4 Résumé de l'article

Dans l'article précédent, une approche par temps de vol est présentée permettant la localisation 2D d'une inclusion fluorescente à l'intérieur d'un plan. Nous faisons ici un pas supplémentaire en présentant une technique capable de déterminer la troisième dimension, permettant une localisation spatiale 3D complète d'une inclusion fluorescente en milieu diffusant. La procédure se divise en deux étapes. Premièrement, il y a détermination de la tranche horizontale où se situe l'inclusion. Pour ce faire, une analyse en intensité est effectuée sur des signaux provenant de différentes hauteurs. Deuxièmement, une localisation 2D à l'intérieur de cette tranche est faite en utilisant la technique présentée dans l'article précédent, *i.e.* une approche par temps de vol. Les résultats obtenus sont concluants et démontrent la technique développée. Suite à la publication de cet article, une nouvelle technique de localisation de la tranche verticale a été développée. Il s'agit d'une technique basée sur le temps de vol des premiers photons. L'annexe B résume et présente des résultats obtenus avec cette nouvelle approche.

Time-of-flight 3D localization of fluorescent inclusions in thick turbid media with ultra-fast TCSPC APDs and electronics

Vincent Robichaud and Yves Bérubé-Lauzière

Laboratoire TomOptUS, Département de génie électrique et de génie informatique
Université de Sherbrooke, 2500 boul. Université, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada

ABSTRACT

Keywords: Diffuse optical tomography, 3D localization, fluorescence, numerical constant fraction discrimination, time-of-flight, time-domain, time-correlated single photon counting, time point-spread functions

1. INTRODUCTION

We herein describe a time-of-flight (TOF) technique to localize in 3D the position of a small fluorophore-filled inclusion immersed in a scattering medium. To achieve this, we exploit the arrival time of early excited and fluoresced photons. This is an embodiment of fluorescence diffuse optical tomography (FDOT) which aims to find the position of fluorescent heterogeneities in 3D in thick turbid media non-invasively via optical imaging techniques.¹⁻³ In Ref. 4, we gave a short review of previous work on the problem of localizing a fluorescent inclusion via time-resolved measurements. This will not be discussed again here.

Our approach exploits time-resolved measurements of emitted fluorescence pulses after short pulse laser excitation. Time-correlated single photon counting (TCSPC) and an avalanche photodiode (APD) are used for detecting the fluorescence pulses.⁵ Our set-up allows tomographic optical measurements without contact with the medium, thereby implementing non-contact FDOT. We target small animal imaging, and non-contact measurements are of great importance in this context as has been discussed by Schulz *et al.*⁶

We have previously introduced a numerical constant fraction discrimination (NCFD) technique for processing time-resolved optical signals.⁷ It allows to extract in a stable manner the arrival time of early photons emitted by a fluorescent inclusion embedded in a scattering medium. We showed that these arrival times highly correlate with inclusion depth. Recently,⁴ we presented a novel TOF FDOT algorithm that exploits NCFD and the arrival time vs depth relationship to find the 2D position of an inclusion in a plane ("in-slice localization"). Here, we go one step further, by adding a technique to find the position along the 3rd dimension, which, combined with in-slice TOF localization, provides for complete 3D spatial localization of a fluorescent inclusion.

Our approach is reminiscent of pulse echo ultrasound imaging,⁸ whereby here the fluorescent inclusion can be seen as a secondary source of echoes (playing more or less the role of impedance changes in ultrasound), but with the distinction that the echoes do not have the same wavelength as the excitation pulses.

Correspondence should be sent to Yves.Berube-Lauziere@USherbrooke.ca

Copyright 2007 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) This was published as paper No. 6771-17 in Proceedings of SPIE Vol. 6771: Advanced Photon Counting Techniques II Conference as part of Optics East 2007 and is made available as an electronic reprint with permission of SPIE. One print or electronic copy may be made for personal use only. Systematic or multiple reproduction, distribution to multiple locations via electronic or other means, duplication of any material in this paper for a fee or for commercial purposes, or modification of the content of the paper are prohibited.

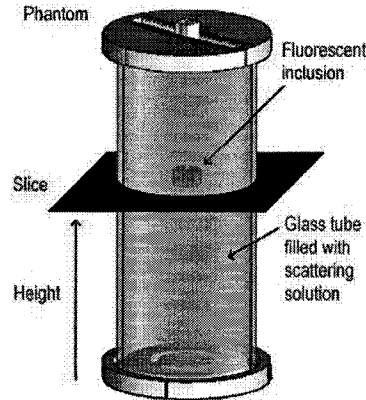


Figure 1. Phantom used in our experiments and geometry associated with slice finding (described later in Sect. 3). A slice corresponds to an axial plane through the medium being imaged (here a cylindrical phantom, but which will eventually be a mouse).

The outline of the present paper is as follows. Section 2 details the materials, experimental set-up and methods used in our measurements. We then provide details of our 3D spatial localization technique in Sect. 3. Results obtained with a cylindrical thick turbid medium with optical properties representative of biological tissues are presented Sect. 4. These results illustrate the capability of our approach to find the position in 3D of a small 3mm diameter spherical inclusion filled with indocyanine green (ICG). Sect. 5 concludes our work.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Phantoms

In our experiments, tissue optical properties are simulated by way of a phantom (Fig. 1) made of a 5cm outer diameter cylindrical glass tube (wall thickness = 1.5mm, height = 12cm) filled with a 48:1 (V/V) aqueous dilution of Intralipid® 20% (Baxter). This suspension liquid yields a scattering coefficient of $\mu'_s = 5\text{cm}^{-1}$.⁹ In this scattering solution we embed a fluorescent inclusion made with a glass tube (O.D. = 4mm, wall thickness = 0.5mm, length = 1cm, capped at both ends) filled with indocyanine green (ICG) (Fisher Scientific), a NIR fluorescent agent (absorption peak @ 780nm, emission peak @ 830nm), at a concentration of $10\mu\text{mol}/\ell$. Due to the poor stability of ICG in aqueous solution, sodium polyaspartate (PASP) is added to enhance fluorescence stability.¹⁰ The inclusion is attached at one end with a very thin rod to allow us to fix it at a constant height along the vertical axis while being able to move it in the horizontal plane.

2.2. Experimental set-up

Our experimental setup is depicted in Fig. 2. This is a full 3D update of a previous 2D set-up that we present for the first time.

2.2.1. Electro-optics

A Tsunami laser (Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA, wavelength set to 780nm, max output power = 750mW, rep. rate = 80MHz, pulse duration = 130fs FWHM; not shown on the schematic) is used to illuminate

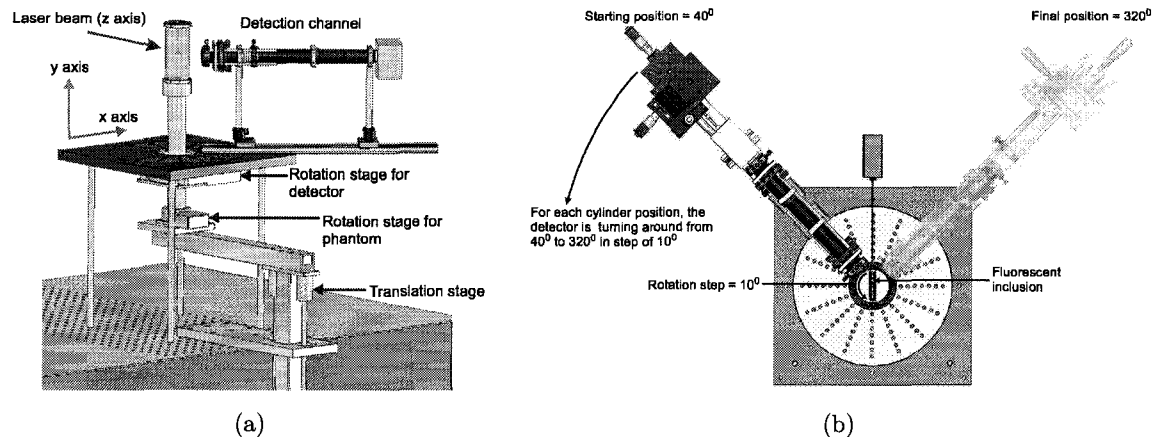


Figure 2. (a) Schematic of the experimental setup showing the laser beam, the glass cylinder (phantom), the detection channel with APD at its end, translation stage to move the phantom axially, and rotation stages to move, independently from each other, the phantom and detector angularly. (b) Top view of the setup. For each angular position of the cylinder (phantom), the detector can be rotated around from 40° to 320° .

the scattering medium (phantom) and excite a fluorescent inclusion. Detection is made with an SPC-134 TCSPC PC plug-in power package (Becker&Hickl GmbH, Berlin, Germany) and an APD from Micro Photon Devices (MPD, Bolzano, Italy, model PDM 50ct, $50\mu\text{m}$ diameter active area, with cooling to reduce dark counts). The detector is always at the same height as the laser beam. In all our measurements, TCSPC collection time is 5 seconds.

2.2.2. Opto-mechanics

The collection channel, described in detail in Ref. 5, serves to detect diffused fluorescence light exiting the surface of the phantom in a non-contact manner. A first lens (plano-convex, focal length (f.l.) = 25.4mm) collects the light, which is then relayed to the photosensitive area of the APD via a second lens (aspherical, f.l. = 4.6mm). The first lens is positioned a focal distance away from the phantom's surface and the second lens is a focal distance away from the APD sensitive area. This is a standard condenser configuration with magnification. Here, a $\phi = 0.28\text{mm}$ detection spot on the phantom is imaged onto the whole sensitive area of the APD ($\phi = 50\mu\text{m}$). Between the two lenses, interference filters (Omega Filters, Brattleboro, VT, USA) are inserted to attenuate as much as possible the laser wavelength. To ensure our measurements remain in the single photon counting limit,¹¹ the average output laser power is attenuated to 40mW .

Our set-up currently includes only one detector. Hence, the collection channel is mounted onto a disc that can be rotated from 40° to 320° to simulate a set of detectors around the phantom (Fig. 2 (b))* . We currently develop a 2nd version of our set-up with 16 detectors distributed over nearly 360° in a fan-beam like configuration as discussed by Pogue *et al.*¹² This will allow to speed up our measurements. We can acquire data for multiple laser injection points around the phantom by rotating the phantom instead of the laser, since this is easier.

*Due to mechanical restrictions, it is impossible to detect fluorescent signals between -40° ($= 320^\circ$) and $+40^\circ$; the detector obstructs the laser beam in this range and prevents it to reach the phantom. This is why only detector angles from 40° to 320° are considered.

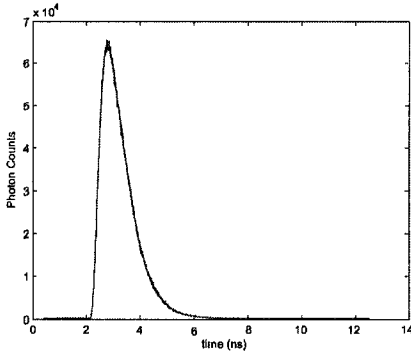


Figure 3. Example of an FTPSF recorded with TCSPC.

For each injection point, measurements can be made with the detector at several positions around the medium. All these measurements can be repeated with the scattering medium positioned at different heights via vertical translation. As such, our set-up allows highly flexible and rather complete acquisition of tomographic time-resolved optical data sets. This is all automated via the use of motorized translation and rotation stages and LabViewTM software that we've developed.

It should be stressed here that our system covers the whole spectrum of measurements from transillumination to nearly backscattered, which we deem important for tomographic reconstruction purposes.

2.3. Time-resolved optical data acquisition

TCSPC is used to acquire fluorescence time point-spread functions (FTPSFs). Fig. 3 illustrates a typical case. In the context of TCSPC, a FTPSF is a histogram of the number of fluoresced photons as a function of their arrival time at a detector. It combines temporal broadening effects due to diffusive propagation of a laser excitation pulse as it reaches a fluorescent inclusion and of the ensuing fluorescence pulse, the lifetime decay characteristics of the fluorophore used in the inclusion, and the instrument's time of response (instrument response function (IRF)). From measured FTPSFs, we extract with our NCFD technique⁷ the arrival time of fluorescent wavefront at a detector.

3. 3D SPATIAL LOCALIZATION

As alluded to in the introduction, our approach to localize a fluorescent inclusion in 3D divides into 2 parts: 1) Find the slice in which the inclusion is located ("slice finding"), and 2) Find the position of the inclusion in that slice (in-slice localization).

3.1. Slice finding

Slice finding amounts to determining the height at which the inclusion is located (Fig. 1). To achieve this, measurements along the vertical y axis (" y -sweeps") are performed as illustrated in Fig. 4. For each sweep s (with s an index over sweeps, $s = 1$ to N_s), the height $y_{s,max}$ with the largest area under the FTPSF is recorded. The average of these heights y_{max}^- is what we consider to be the height of the inclusion, and hence determines the slice in which the inclusion is to be found. We have found that using $N_s = 8$ sweeps for the average provides for reliable results by attenuating fluctuations over sweeps.

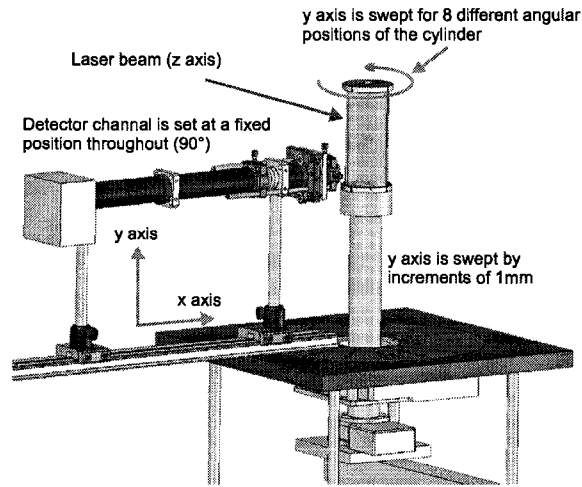


Figure 4. Slice finding. Vertical sweeps (along y in our system of axes) are performed for 8 different angular positions of the phantom. The detector is held at a constant angular position throughout.

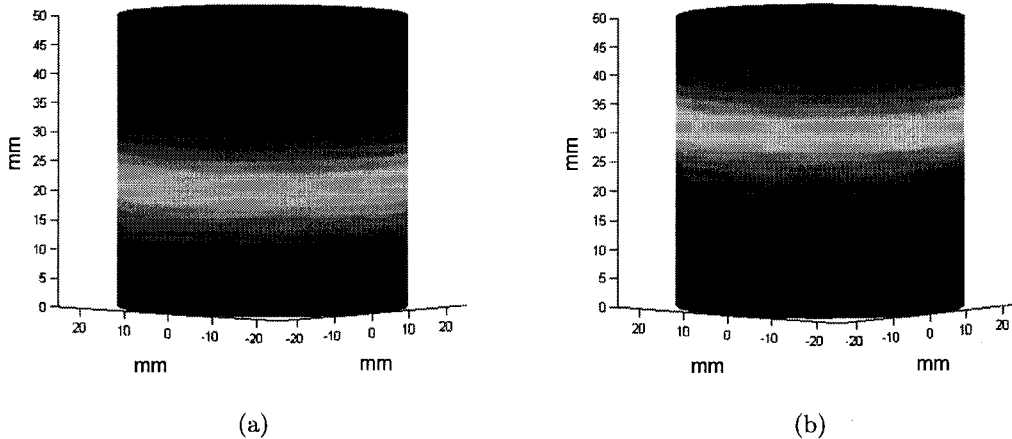


Figure 5. (a) Slice finding result where the inclusion was actually at a height $y = 20\text{mm}$, and the height found is 22mm . (b) Here the inclusion was actually at a height $y = 30\text{mm}$, with the height found being 32mm .

Fig. 5 shows slice finding results, with (a) showing a result where the height found was 22mm , whereas the actual height of the inclusion was $y = 20\text{mm}$, and (b) giving similar results with a measured height of 32mm for an actual height of 30mm . We have noticed in our experiments a systematic discrepancy of 2mm , which may be caused by several factors, within others the size of the inclusion (3mm in diameter) and the precision of its positioning within the scattering fluid. We are currently working on this last point to increase the accuracy in our positioning of the inclusion within the phantom cylinder. We nevertheless see a close agreement between the actual and measured values.

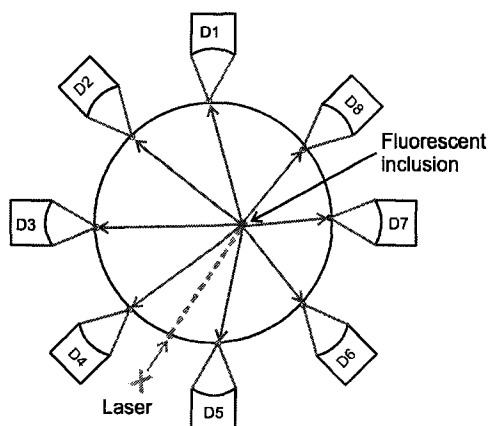


Figure 6. Measurements at several detection spots around the phantom for inclusion localization in a TOF approach. The fluorescent signal will reach detector D7 first resulting in the shortest recorded arrival time. Similarly, detector D3 will record the longest arrival time.

3.2. In-slice localization

In-slice localization is somewhat more involved. Since it has been described in great detail elsewhere,⁴ only a short outline will be given here. The basis is depicted in Fig. 6. The medium is excited with an ultra-short laser pulse. This pulse, propagating diffusively into the medium, reaches the inclusion, which in turn absorbs part of the excitation light and re-emits a fluorescence pulse propagating in all directions alike a spherical wavefront. The time for this diffused wavefront to arrive at a given detection position on the boundary of the diffusing medium (to be called a "detection spot") will be proportional to the distance between inclusion and detection spot (we have shown in Refs 4, 7 that this is indeed true to a good approximation). This time ("arrival time") thus provides depth information about the inclusion relative to that detection spot. Now, by measuring arrival times of wavefronts at several detection spots around the medium it then becomes possible to determine the position of the inclusion. Multiple measurements around the medium are required since all that can be said is that the inclusion must lie on a sphere centered at each spot with radius proportionnal to the arrival time of the fluorescent wavefront at that spot. The intersection of these spheres for several spots should then coincide with the position of the inclusion. In principle, in 3D, only 3 detection spots are necessary, since the intersection of 3 spheres is a point. In 2D (planar case), this reduces to 2 as the intersection of 2 circles is a point. In practice, however, we use more than these minimum number of detection spots to provide for more redundancy and increase robustness.

The previous ideas provide the rationale for a direct TOF in-slice localization technique. In reality, things are not so simple since we are dealing with ultra-fast and short signals. Consequently, it is impossible to directly measure the time for a pulse to travel from the inclusion to a detection spot. This forces us to use time differences and a minimization technique to find the inclusion's position. At this point, the reader is referred to Ref. 4 for further details on the algorithm.

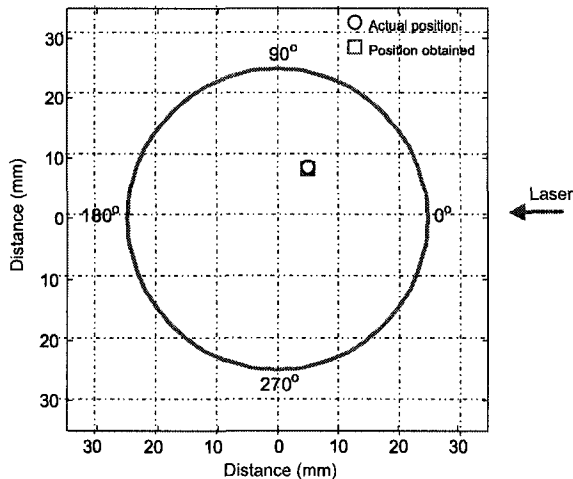


Figure 7. In-slice localization results. As shown, the actual position (radial and angular) was 10mm from the center at 60° , with the found position at 9.93mm at 59° .

4. RESULTS

Fig.7 shows a representative result obtained for in-slice localization. As can be seen, there is a close agreement between the actual and the found position of the inclusion. In this case, the inclusion height was 20mm and the result for slice finding is that already shown in Fig 5 (a). This demonstrates the capability of our technique to find in 3D the position of a small inclusion.

5. CONCLUSION

In this work, we have supplemented our previously developed 2D spatial fluorescent inclusion localization technique with the capability of finding the position along the 3rd dimension. For this, we resort to sweeps along the height of the scattering medium and determine for each sweep the height at which the most photons are detected. Localization within 2-3mm has been shown to be possible. To be more quantitative on the 3D precision of our localization technique, we need to improve the way the inclusion is held in the phantom, especially as regards its height. Notice that the number of photons was used as the criterion for finding the height of the inclusion, but other criterion could be used as well, such as the arrival time. In fact, for a given detection angular position, the shortest arrival time in a y-sweep should occur at the height of the inclusion. This will be the subject of future work to be published shortly. Finally, we stress that we never use intensity information for in-slice localization purposes, which distinguishes our approach from time-gating.

6. ACKNOWLEDGMENTS

Support from Spectra-Physics, Boston Electronics and Becker&Hickl in a Canada Foundation for Innovation (CFI) On-going New Opportunities Fund is gratefully acknowledged. This CFI grant has allowed the purchase of the the major equipments used in this work. We also thank support from Micro Photon Devices (MPD) and OptoElectronic Components (OEC), in particular Nick Bertone. Financial support from the Natural Sciences

and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (Discovery Grant and Research Tools and Instruments Grant) and the Université de Sherbrooke (Fonds de démarrage) has also made this research possible.

REFERENCES

1. M. O’Leary, D. Boas, X. Li, B. Chance, and A. Yodh, “Fluorescence lifetime imaging in turbid media,” *Optics Letters* **21**(2), pp. 158–160, 1996.
2. J. Wu, L. Perelman, R. Dasari, and M. Feld, “Fluorescence tomographic imaging in turbid media using early-arriving photons and laplace transforms,” *PNAS Medical Sciences* **94**(16), pp. 8783–8788, 1997.
3. V. Ntziachristos and R. Weissleder, “Charge-coupled-device based scanner for tomography of fluorescent near-infrared probes in turbid media,” *Medical Physics* **29**, pp. 803–809, 2002.
4. Y. Bérubé-Lauzière and V. Robichaud, “Time-of-flight non-contact fluorescence diffuse optical tomography with numerical constant fraction discrimination,” in *Invited Oral Presentation at Diffuse Optical Imaging in Tissue, European Conferences on Biomedical Optics, Munich, Germany*, **6629**(Paper 6629-34), 2007.
5. Y. Bérubé-Lauzière and V. Robichaud, “Time-resolved non-contact diffuse optical tomography measurements with ultra-fast time-correlated single photon counting avalanche photodiodes,” in *Diffuse Optical Imaging in Tissue, European Conferences on Biomedical Optics, Munich, Germany*, **6629**(Paper 6629-32), 2007.
6. R. Schulz, J. Ripoll, and V. Ntziachristos, “Experimental fluorescence tomography of tissues with noncontact measurements,” *IEEE Transactions on Medical Imaging* **23**(4), pp. 492–500, 2004.
7. Y. Bérubé-Lauzière and V. Robichaud, “Time-resolved fluorescence measurements for diffuse optical tomography using ultrafast time-correlated single photon counting,” in *Advanced Photon Counting Techniques, SPIE Optics East*, W. Becker, ed., *Proceedings of SPIE* **6372**(Paper 6372-6), pp. 637206–1 – 637206–8, 2006.
8. J. Bushberg, S. J.A., E. J. Leidholdt, and J. Boone, *The Essential Physics of Medical Imaging*, Lippincott Williams & Wilkins, 2002 (2nd Ed.).
9. J. Ripoll, M. Nieto-Vesperinas, R. Weissleder, and V. Ntziachristos, “Fast analytical approximation for arbitrary geometries in diffuse optical tomography,” *Optics Letters* **27**(7), pp. 527–529, 2002.
10. R. Rajagopalan, P. Uetrecht, J. Bugaj, S. Achilefu, and R. Dorshow, “Stabilization of the optical tracer agent indocyanine green using noncovalent interactions,” *Photochemistry and Photobiology* **71**(3), pp. 347–350, 2000.
11. F. Schmidt, M. Fry, E. Hillman, J. Hebden, and D. Delpy, “A 32-channel time-resolved instrument for medical optical tomography,” *Review of Scientific Instruments* **71**(1), pp. 256–265, 2000.
12. B. Pogue, T. McBride, U. Osterberg, and K. Paulsen, “Comparison of imaging geometries for diffuse optical tomography of tissue,” *Optics Express* **4**(8), pp. 270–286, 1999.

CHAPITRE 9

Photonics North 2007 : APD vs PMT

9.1 Mise en contexte

Cet article a été publié dans le cadre de la conférence *Photonics North 2007* à Ottawa en juin 2007. Une présentation orale résumant les résultats de nos recherches a été faite le mardi 5 juin 2007 dans le cadre de la conférence.

9.2 Titre de l'article

Version anglaise

Ultra-fast time-correlated single photon counting avalanche photodiodes for time-domain non-contact fluorescence diffuse optical tomography

Version française

Comptage de photons ultra-rapide corrélé en temps utilisant une photodiode avalanche pour tomographie optique diffuse sans contact par fluorescence en domaine temporel

9.3 Auteurs

Vincent Robichaud et Yves Bérubé-Lauzière

Laboratoire *TomOptUS*, Département de génie électrique et de génie informatique

Université de Sherbrooke, 2500 boul. Université, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada

9.4 Résumé de l'article

Le progrès récent dans le design et la fabrication de photodiodes avalanches (APDs) a permis l'arrivée de détecteurs très performants en comptage de photons corrélé en temps (TCSPC). En plus d'être beaucoup moins dispendieuses, les APDs offrent une résolution comparable aux tubes photomultiplicateurs à micro-canaux (MCP-PMTs), qui étaient jusqu'à récemment les meilleurs détecteurs en terme de résolution temporelle en TCSPC (≤ 30 ps). Il devrait également devenir possible de manufacturer les APDs selon les standards électroniques actuels dans un avenir rapproché. Ceci contribuera à réduire encore davantage leur prix et facilitera leur intégration aux systèmes complexes de détection multi-canaux, aspect essentiel en tomographie optique diffuse. Nous présentons ici, selon nos connaissances, les premiers résultats démontrant la viabilité des APDs pour procéder à des mesures en domaine temporel dans un contexte d'imagerie optique diffuse. Nos résultats expérimentaux démontrent que, malgré leur surface active beaucoup plus petite, les APDs offrent la possibilité d'obtenir des signaux comparables à ceux obtenus avec une PMT.

Ultra-fast time-correlated single photon counting avalanche photodiodes for time-domain non-contact fluorescence diffuse optical tomography

Vincent Robichaud, Éric Lapointe and Yves Bérubé-Lauzière

Laboratoire TomOptUS, Département de génie électrique et de génie informatique
Université de Sherbrooke, 2500 boul. Université, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada

ABSTRACT

Recent advances in the design and fabrication of avalanche photodiodes (APDs) and quenching circuits for time-correlated single photon counting (TCSPC) have made available detectors with timing resolutions comparable to microchannel plate photomultiplier tubes (MCP-PMTs). The latter, were until recently the best TCSPC detectors in terms of temporal resolution (≤ 30 ps). Comparable resolutions can now be obtained with TCSPC APDs at a much lower cost. It should also be possible to manufacture APDs with standard electronics fabrication processes in a near future. This will contribute to further decrease their price and ease their integration in complex multi-channel detection systems, as required in diffuse optical imaging (DOI) and tomography (DOT). We present, to our knowledge for the first time, results which demonstrate that, despite their small sensitive area, TCSPC APDs can be used in time-domain (TD) DOT and more generally in TD DOI. With appropriate optical design of the detection channel, our experiments show that it is possible to obtain comparable measurements with APDs as with PMTs.

Keywords: Diffuse Optical Tomography, Fluorescence, Time-Resolved Optical Measurements, Time-Domain, Time-Correlated Single Photon Counting, Avalanche Photodiodes, Photomultiplier Tubes, Non-Contact Measurements

1. INTRODUCTION

With the advent of multi-channel electronics capable of acquiring signals from several detectors simultaneously, time-correlated single photon counting (TCSPC) has gained popularity in diffuse optical tomography (DOT) based on time-domain (TD) measurements.^{1,2} DOT systems using TCSPC developed thus far exclusively use photomultiplier tubes (PMTs).^{1,3-8} With moderate cost PMTs (~ 5 k\$), temporal resolutions of 200ps can be achieved. Microchannel Plate PMTs (MCP-PMTs) were until recently the best detectors for TCSPC as regards temporal resolution (30ps), but are much more expensive (~ 25 k\$) and easy to damage. Recent progress in the

Correspondence should be sent to Vincent.Robichaud@USherbrooke.ca

Copyright 2007 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) This paper was published in Proceedings of SPIE Vol. SPIE 6796 - Photonics North 2007 Conference and is made available as an electronic reprint with permission of SPIE. One print or electronic copy may be made for personal use only. Systematic or multiple reproduction, distribution to multiple locations via electronic or other means, duplication of any material in this paper for a fee or for commercial purposes, or modification of the content of the paper are prohibited.

design and fabrication of ultra-fast avalanche photodiodes (APDs) for TCSPC has made available detectors with resolutions as high as for MCP-PMTs,⁹ but at about 1/5th of the price. APDs offer several advantages: they are much more compact than PMTs, can incorporate all the electronics and cooling on a single chip, do not require high voltage supplies, and are not damaged, even by ambient light levels. Apart from their temporal resolution, such APDs are also appealing for DOT in terms of cost (~5k\$ at present), which can be expected to decrease in future years as efforts are currently pursued to manufacture them with standard electronics fabrication processes.⁹ This is a definite asset for DOT systems where several detectors need to be used in parallel to acquire data all around the subject for tomographic reconstruction. We demonstrate the viability of APDs in time-domain (TD) DOT fluorescent measurements. We show that with proper optical design of the detection channel and a moderate increase in laser power (from 10mW to 40mW), photon count rates with an APD can be as high as with a standard PMT despite the APD's much smaller sensitive area, with the advantage of better temporal resolution and reduced dark counts. We present TCSPC fluorescence TD tomographic data we have acquired on diffusing and absorbing phantoms with an APD to support our approach. These are compared with measurements made under the same experimental conditions with a PMT (except for laser power). To our knowledge, this is the first time APDs are used in TD DOT, and particularly in non-contact TD fluorescence DOT. The results presented here will find application in a non-contact DOT scanner we are currently developing for small animal fluorescence molecular imaging.¹⁰

2. MATERIALS AND EXPERIMENTAL SETUP

2.1. Optical Setup

A schematic of the experimental setup is shown in Fig. 1. A Tsunami tunable femtosecond laser (Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA; wavelength set to 780nm, maximum output power = 750mW, rep. rate = 80MHz, pulse duration = 130fs FWHM) is used to excite a fluorescent inclusion located within a cylindrical diffusing medium (phantom). The laser power was attenuated by a neutral density absorptive filter before striking the

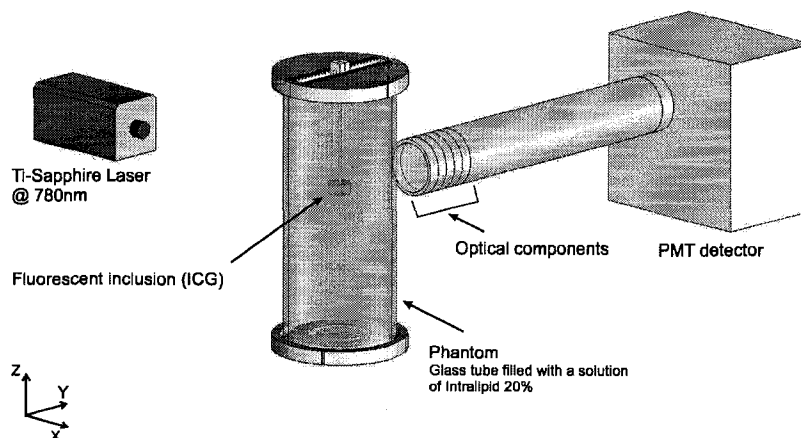


Figure 1. Schematic of the experimental setup showing the laser source, the phantom containing the fluorescent inclusion, the optical components (lens, attenuator, filters), and the detector (APD or PMT).

phantom. Detection is made with time-correlated single photon counting (TCSPC) electronics (SPC-134 module, Becker&Hickl GmbH, Berlin, Germany, not shown in Fig. 1). The detectors used are an APD TCSPC module from MPD (Micro Photon Devices, Bolzano, Italy, model PDM 50ct, 50 μ m diameter sensitive area) and a PMC-100-20 PMT module (Becker&Hickl GmbH) Both the APD and PMT modules are cooled for reducing dark noise.

2.2. Optical design considerations for the detection channel

The diffuse light emitted from the phantom is first collected by a plano-convex lens and then imaged onto the detector (APD or PMT) by a second lens (the focal lengths (f.l.) of these lenses are discussed below in more detail). The two lenses form a condenser pair, with the light rays between them being collimated. The ratio of the lenses' f.l.s determines the magnification factor of the pair. Between the two lenses, an optical attenuator is inserted to ensure that the photon flux is sufficiently small to prevent detection of multiple photons during each laser cycle (single photon counting limit⁴), and in the case of the PMT that the intensity of detected light does not saturate or damage the PMT. As we perform fluorescence measurements, interference filters (Omega Filters, Brattleboro, VT, USA) are also inserted between the lenses to filter out as much as possible the laser wavelength.

As mentioned above, APDs have much smaller sensitive areas than PMTs. For both the APD and PMT we used, the first lens had a f.l. of 25.4mm. For the APD (active diameter $\phi = 50\mu$ m), the second lens is aspheric with f.l. = 4.6mm. This gives a magnification factor of 0.18 and a collection spot of diameter $\phi = 0.28$ mm on the phantom. Because of mechanical space constraints, we could neither use a larger f.l. for the first lens nor a smaller f.l. for the second lens to get a smaller magnification (this would have given a larger collection spot on the phantom). For the PMT (photocathode area $\phi = 10$ mm), the second lens is plano-convex with f.l. = 200mm, which gives a collection spot $\phi = 1.27$ mm on the phantom. With this configuration, we use the whole light sensitive area of our PMT, which is not optimal in terms of temporal resolution.¹ However, this ensures not wearing out the photocathode on a localized portion, as well as a uniform design across PMTs in the eventuality that multiple PMTs will be used in a complete DOT scanner. As will be seen below in our experimental results, the fact that the size of the collection spot is smaller for the APD is compensated for by its larger quantum efficiency. Another fact worth noting is that the detection channel using an APD was more involved to align because of the APD smaller sensitive area. For this reason, we had to mount the APD module on two perpendicular translation stages to align it with the optical axis of the detection channel. This was not needed with the PMT.

2.3. Phantom

We used a phantom to simulate tissue optical properties. It consisted of a 5cm outer diameter glass tube (wall thickness = 1.5mm, length = 12cm) filled with a 48:1 (V/V) aqueous dilution of Intralipid® 20% (Baxter). This suspension liquid yields a scattering coefficient $\mu'_s = 5\text{cm}^{-1}$.¹¹ In this scattering solution, we inserted a fluorescent inclusion made with a glass tube (O.D. = 4mm, wall thickness = 0.5mm, length = 1cm, capped at both ends) filled with indocyanine green (ICG) (Fisher Scientific), a NIR fluorophore (absorption peak @ 780nm, emission peak @ 830nm, fluorescence lifetime $\tau = 520$ ps typical), at a concentration of 10 μ mol/ ℓ . The inclusion was attached at one end with a very thin nylon wire to allow us to fix it at a constant height along the z (vertical) axis while being able to move it in the x - y plane (horizontal), see Fig.1.

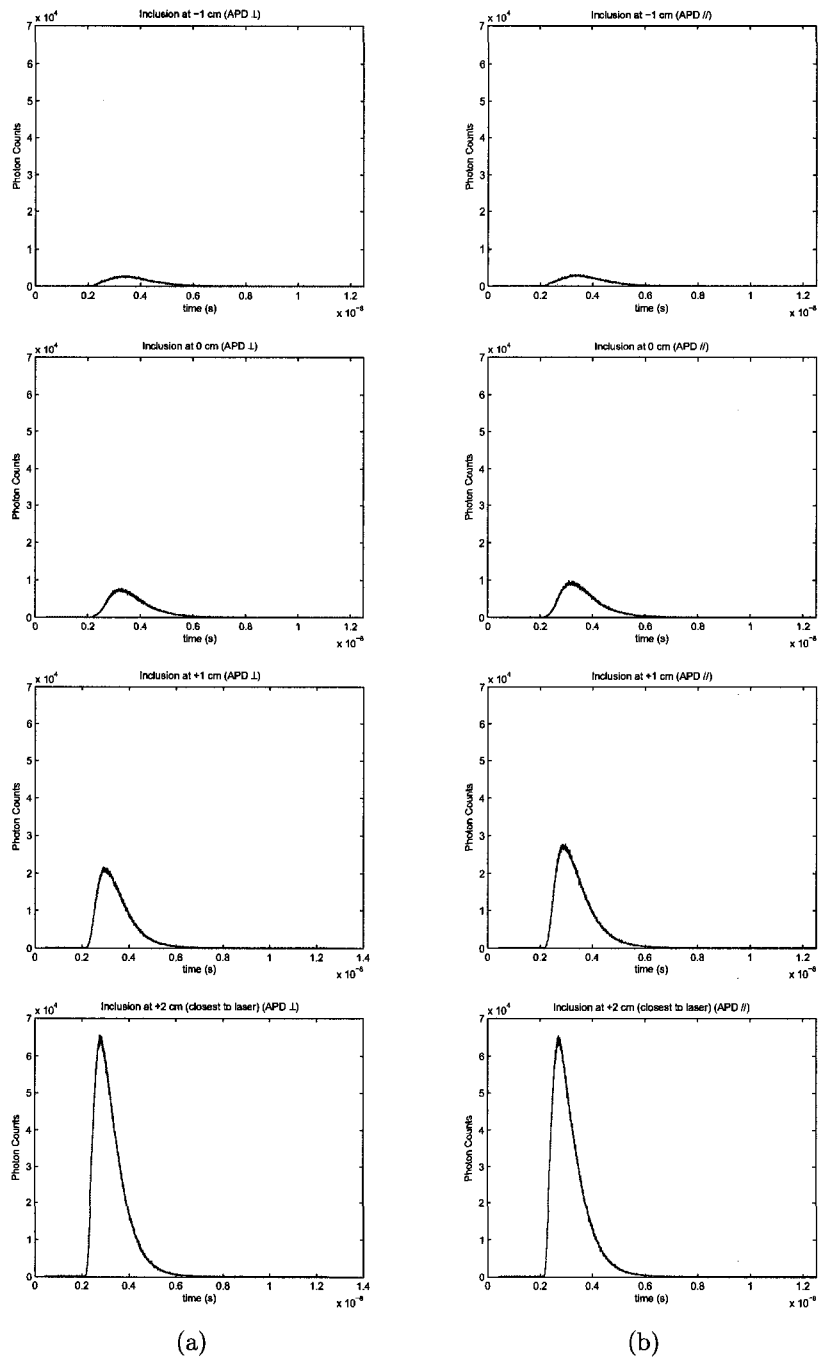


Figure 2. FTPSFs measured with the APD. (a) Perpendicular measurements. (b) Parallel measurements. See Fig. 3 for the meaning of perpendicular and parallel measurements.

3. FLUORESCENCE TIME POINT-SPREAD FUNCTIONS MEASUREMENTS

Fig. 2 shows a series of fluorescence time point-spread functions (FTPSFs) measured with our TCSPC electronics and the APD. An FTPSF is a distribution of the arrival times at a detector of photons emitted by the fluorescent

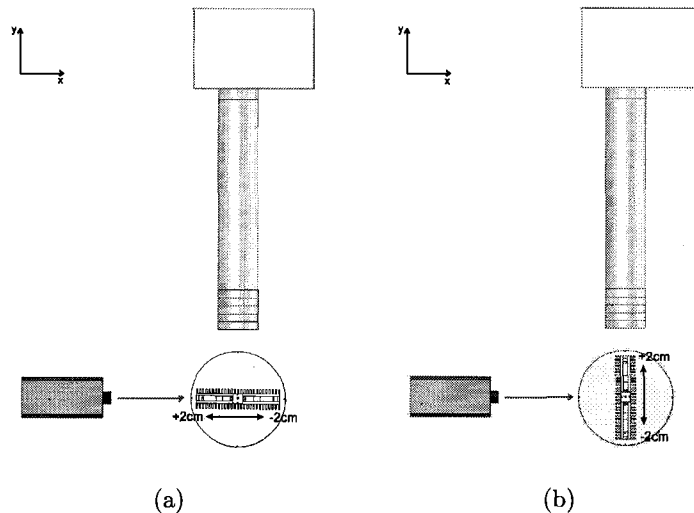


Figure 3. Top view of the setup. (a) Measurements taken by displacing the inclusion parallel to the laser beam axis. (b) Measurements taken by displacing the inclusion perpendicular to the laser beam axis.

inclusion after excitation by a short laser pulse. The FTPSF includes the effects of diffusion on both the laser and fluoresced light pulses along with the intrinsic fluorescence lifetime decay characteristics of the fluorophore used. In the measurements presented in Fig. 2, the fluorescent inclusion was displaced from -2cm to +2cm parallel and perpendicular to the laser beam axis in the scattering solution as indicated in Fig. 3. The displacement increment of the inclusion was 2mm.

For comparison, Fig. 4 presents the same measurements as above, but made with the PMT. APD FTPSFs always have a steeper rising edge and a shorter tail. This is due to the higher temporal resolution of the APD (40ps) compared to that of the PMT (180ps). To better appreciate this, Fig.5 shows two FTPSFs on a log scale, one for the APD and the other for the PMT.

Further comparison of Figs. 2 and 4 shows that the photon counts (which is equivalent to the photon count rate) in the APD FTPSFs can be made similar to those of the PMT. This is due to our selection of lens focal lengths discussed earlier in Sect. 2.2. The laser power incident on the phantom was 40mW for measurements with the APD, whereas it was 10mW for the PMT. This proves that APDs can be as efficient as PMTs in DOT measurements, provided an appropriate selection of optical components is made. Note that the spot seen on the phantom was smaller for the APD ($\phi = 0.28\text{mm}$) compared to the PMT ($\phi = 1.27\text{mm}$). Thus with more sophisticated optical design, the efficiency of the detection channel could be even larger with the APD despite its smaller photosensitive area. The reason for this lies in part in the quantum efficiency of APDs (here around 14% @830nm) compared to that of PMTs (2% for the PMT we have used, which is typical for PMTs).

4. DATA PROCESSING

The goal of fluorescence diffuse optical tomography is to locate fluorescent inclusions in a diffusing medium. In our group, we are developing a localization technique using information from early photons time-of-flight (TOF).¹² Towards that end, we need to assign these photons a stable arrival time. For this, we resort to a

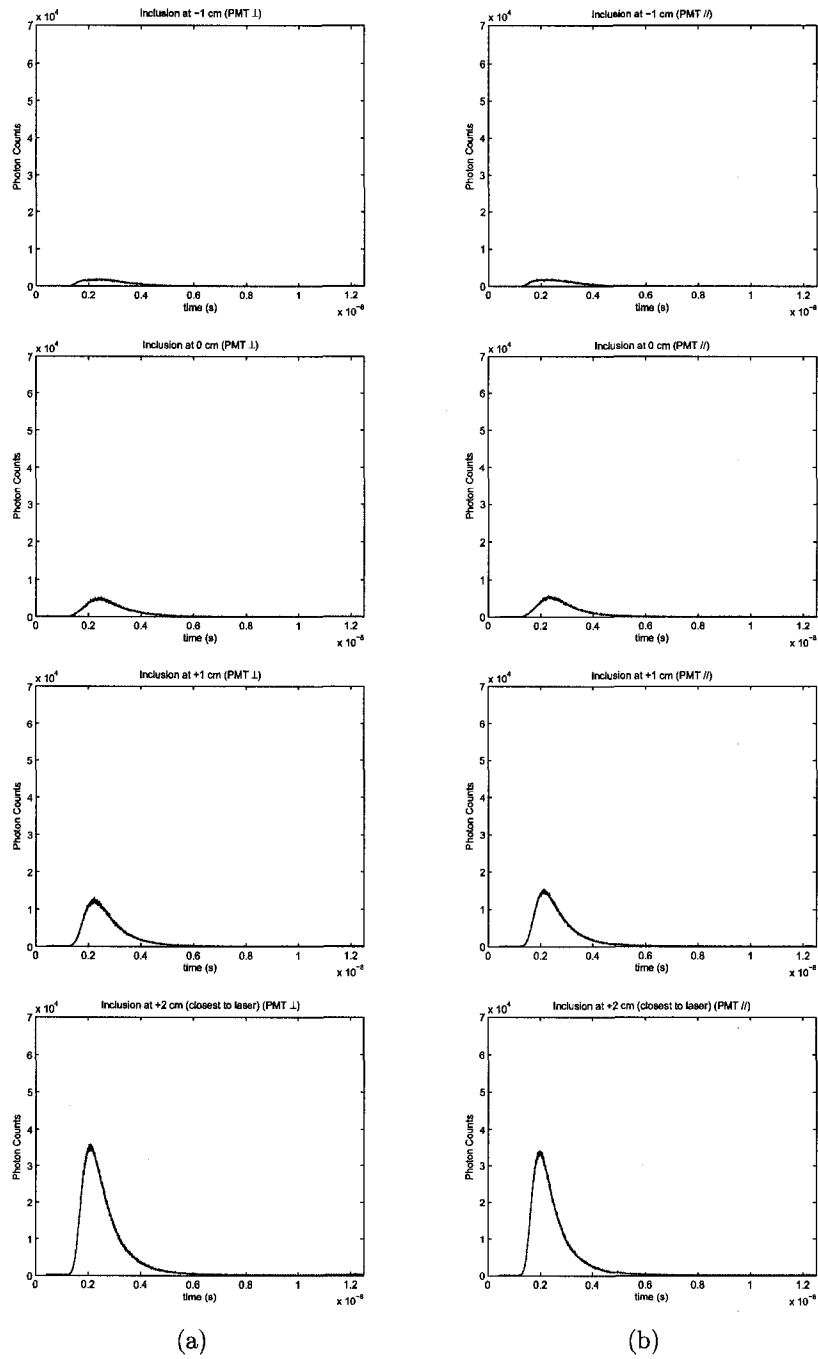


Figure 4. FTPSFs measured with the PMT. (a) Perpendicular measurements. (b) Parallel measurements.

numerical constant fraction discriminator (NCFD) technique we have described earlier.¹³ Fig. 6 summarizes the steps. The NCFD is designed to trigger on a certain optimum fraction of the height of a fluorescence time point-

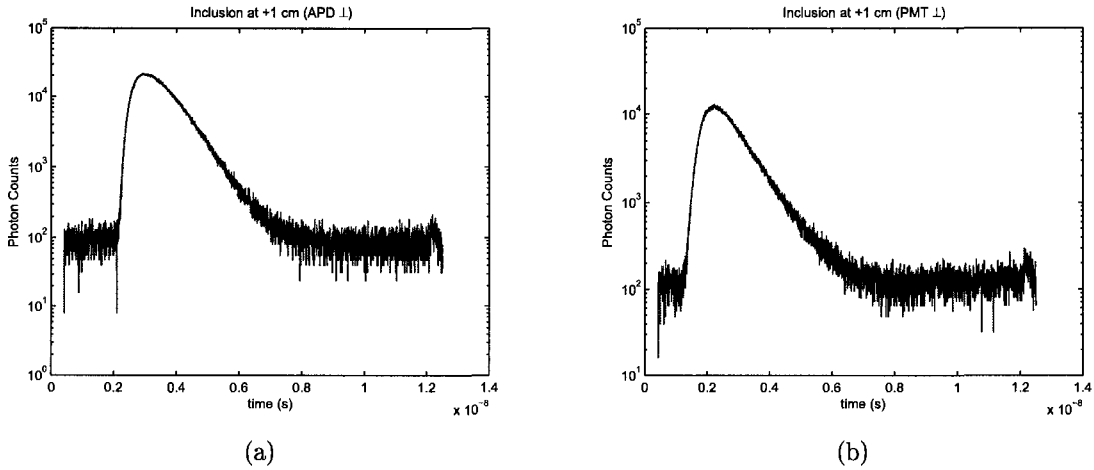


Figure 5. Comparison of FTPSFs measured with the APD (a) and PMT (b) on a semi-log scale. The rising edge of the APD FTPSF is steeper and its tail is shorter than for the PMT. The delay between the two FTPSFs is due to different propagation delays in the electronics of both detectors (amplifiers) and in the signal transduction process from light to electrical signal.

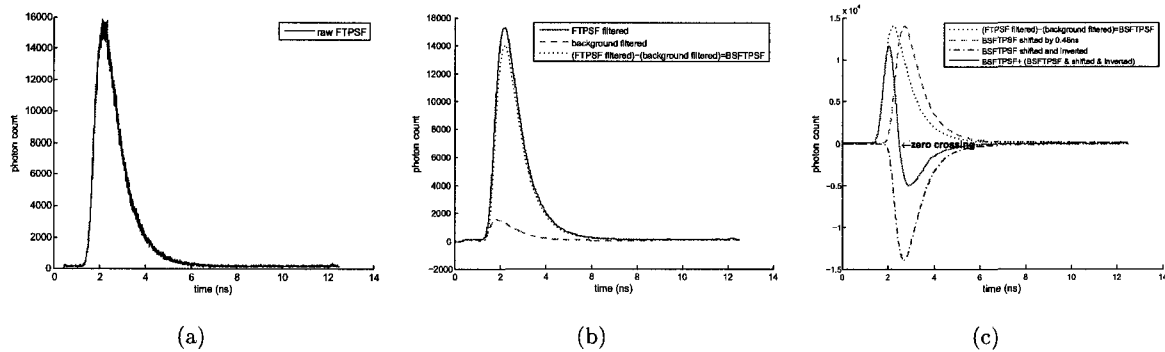


Figure 6. Steps to achieve our NCFD. (a) Raw data (FTPSF). Each FTPSF and the background measurement are first smoothed (here a digital Butterworth low-pass filter of order 2 and cutoff frequency at $3GHz$). The smoothed background is then subtracted from the smoothed FTPSF. This is called the background subtracted filtered FTPSF (BSFTPSF) and is shown in (b). The BSFTPSF is then delayed, inverted and attenuated by a fraction η of the original amplitude[†]. This is next added to the BSFTPSF. The bipolar signal obtained (c) is finally analyzed to find its zero crossing.

spread function (FTPSF). It results in a bipolar signal with a zero crossing independent of the pulse amplitude. The zero crossing corresponds to the arrival time we assign to the early fluoresced photons.

Fig. 7 shows graphs of early photons arrival times determined with our NCFD technique as a function of the inclusion position for perpendicular and parallel displacements. Results for both APD and PMT measurements are given. As can be seen, the relationship between position and arrival time is almost linear (the region where the curve flattens for positions below approximately $-1.2cm$ contains data that should be discarded; at those points, the detector receives insufficient fluorescence signal from the inclusion for the data to be reliable¹³).

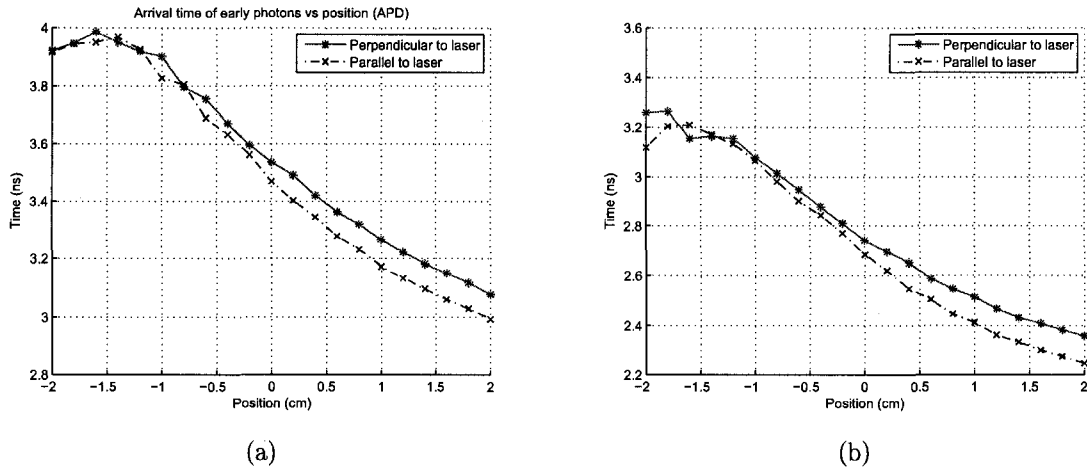


Figure 7. Relationship between the position of the fluorescent inclusion and the arrival time of early fluoresced photons as determined with the NCFD technique. (a) APD measurements. (b) PMT measurements presented in earlier work.¹³

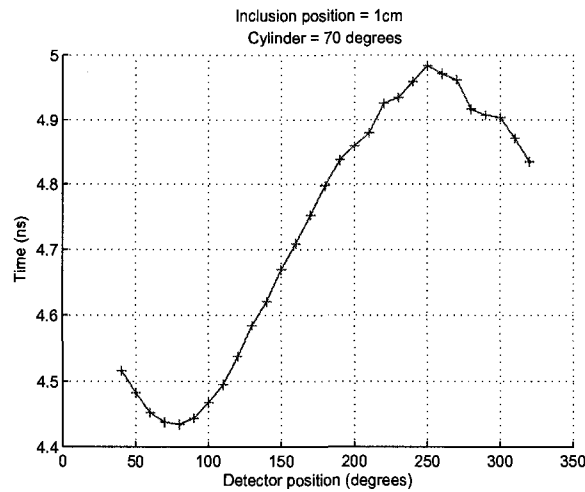


Figure 8. Early photon arrival times determined via NCFD in terms of the angular position of the APD as it is rotated around the phantom from 40 to 320°. Angles are measured counterclockwise with respect to the laser beam, the laser beam itself being at 0°. The fluorescent inclusion was located at a radial position of 1cm from the center of the phantom at an angle of 70° with respect to the laser beam.

5. FLUORESCENCE DOT MEASUREMENTS

As a final result, Fig. 8 shows a graph of early photon arrival times determined via NCFD in terms of the angular position of the APD as it is rotated around the phantom from 40 to 320° (mechanical constraints prevent detection between -40° (= 320°) and +40°). Angles are measured counterclockwise with respect to the laser beam, the laser beam itself being at 0°. The fluorescent inclusion in those measurements was located at a radial position of 1cm from the center of the phantom at an angle of 70° with respect to the laser beam. The smallest arrival

times occur for detector positions around 70° , as it should be, since this is where the inclusion is closest to the detector. The largest arrival times are at the opposite around 250° . The use of such measurements for localizing a fluorescent inclusion in a scattering medium is the subject of another paper.¹²

6. CONCLUSIONS AND FUTURE WORK

This work has focused on the use of TCSPC APDs to perform measurements for time-resolved diffuse optical imaging (TR DOI). A general belief is that APDs have too small a sensitive area for DOT purposes.¹ Our experimental results clearly show, to the contrary, that they provide data comparable to that obtained with PMTs provided the optical detection channel is appropriately designed. The higher quantum efficiency of APDs also plays a key role in this respect. Recall that our design was so that the collection spots on the phantom were of comparable sizes for the APD and PMT used for comparison. In the case of the APD we used a magnification < 1 , which means reducing the size of the spot on the phantom as it is imaged by the condenser onto the APD, whereas for the PMT we enlarged the size of the spot (magnification > 1).

7. ACKNOWLEDGMENTS

Support from Spectra-Physics, Boston Electronics and Becker&Hickl in a Canada Foundation for Innovation (CFI) On-going New Opportunities Fund is gratefully acknowledged. This CFI grant has allowed the purchase of the the major equipments used in this work. We also thank support from Micro Photon Devices (MPD) and OptoElectronic Components (OEC), in particular Nick Bertone. Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (Discovery Grant and Research Tools and Instruments Grant) and the Université de Sherbrooke (Fonds de démarrage) has also made this research possible.

REFERENCES

1. W. Becker, *The bh TCSPC Handbook*, Becker&Hickl GmbH, Available for download at www.becker-hickl.com, Berlin, Germany, 2005 (1st Ed.).
2. W. Becker, *Advanced time-correlated single photon counting techniques*, Springer, 2005 (1st Ed.).
3. V. Ntziachristos, X. Ma, and B. Chance, "Time-correlated single photon counting imager for simultaneous magnetic resonance and near-infrared mammography," *Review of Scientific Instruments* **69**(12), pp. 4221 – 4233, 1998.
4. F. Schmidt, M. Fry, E. Hillman, J. Hebden, and D. Delpy, "A 32-channel time-resolved instrument for medical optical tomography," *Review of Scientific Instruments* **71**(1), pp. 256–265, 2000.
5. B. Montcel and P. Poulet, "An instrument for small-animal imaging using time-resolved diffuse and fluorescence optical methods," *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **569**(2 SPEC ISS), pp. 551 – 556, 2006.
6. A. Hagen, O. Steinkellner, D. Grosenick, M. Moller, R. Ziegler, T. Nielsen, K. Lauritsen, R. Macdonald, and H. Rinneberg, "Development of a multi-channel time-domain fluorescence mammograph," *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE* **6434**, p. 64340, 2007.
7. W. Becker, A. Bergmann, A. Gibson, N. Everdell, D. Jennions, M. Schweiger, S. Arridge, and J. C. Hebden, "Multi-dimensional time-correlated single photon counting applied to diffuse optical tomography," *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE* **5693**, pp. 34–42, 2005.

8. R. Cubeddu, G. Biscotti, A. Pifferi, P. Taroni, A. Torricelli, M. Ferrari, and V. Quaresima, "8-channel time-resolved tissue oximeter for functional muscle studies," *Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering* **4955**(1), pp. 424 – 30, 2003.
9. S. Cova, M. Ghioni, F. Zappa, I. Rech, and A. Gulinatti, "A view on progress of silicon single photon avalanche diodes and quenching circuits," *Proceedings of SPIE* **6372**, pp. 63720I–1, 2006.
10. Y. Bérubé-Lauzière and V. Robichaud, "Time-of-flight non-contact fluorescence diffuse optical tomography with numerical constant fraction discrimination," in *Invited Oral Presentation at Diffuse Optical Imaging in Tissue, European Conferences on Biomedical Optics, Munich, Germany*, **6629**(Paper 6629-34), 2007.
11. J. Ripoll, M. Nieto-Vesperinas, R. Weissleder, and V. Ntziachristos, "Fast analytical approximation for arbitrary geometries in diffuse optical tomography," *Optics Letters* **27**(7), pp. 527–529, 2002.
12. V. Robichaud and Y. Bérubé-Lauzière, "A spherical wavefront intersection algorithm for time-of-flight non-contact diffuse optical tomography of fluorescent inclusions in thick turbid media," in *Photonics North '07, Biophotonics session, 4-7 June 2007, Ottawa, Canada*, 2007.
13. Y. Bérubé-Lauzière and V. Robichaud, "Time-resolved fluorescence measurements for diffuse optical tomography using ultrafast time-correlated single photon counting," in *Advanced Photon Counting Techniques, SPIE Optics East*, W. Becker, ed., *Proceedings of SPIE* **6372**(Paper 6372-6), pp. 637206–1 – 637206–8, 2006.

QUATRIÈME PARTIE

Conclusion

Conclusion

En première partie de ce mémoire, une introduction au domaine de la tomographie optique diffuse a été présentée. Des aspects plus techniques ont été également abordés comme la fluorescence, les géométries de scanners, l'excitation, la détection, les types de mesures ainsi que l'aspect sans contact. Ces notions sont nécessaires et leur compréhension a permis une revue judicieuse des différents systèmes actuels pour petits animaux. Il en ressort, suite à cette revue, que :

- Aucun système ne combine des mesures en rétrodiffusion/transillumination
- La majorité des systèmes sans contact utilisent uniquement des mesures CW
- L'utilisation des premiers photons pour la reconstruction des images est une avenue encore peu exploitée

Les deux premiers objectifs des présents travaux de maîtrise couvrent les points suivants :

1. Développer un prototype de scanner :
 - Sans contact
 - Permettant des prises de mesures tout le tour de l'animal
 - Exploitant des mesures résolues en temps
2. Développement d'algorithmes de localisation 3D de la fluorescence basés sur le temps d'arrivée des premiers photons

Un troisième objectif ne découlant peut-être pas des conclusions précédentes, mais constituant un point très important des présents travaux est l'intégration d'un nouveau type de détecteur en TOD, soit la photodiode avalanche en mode « geiger » (G-APD). La pertinence de cet objectif vient du fait que comparativement aux PMTs, les G-APDs ne sont pas endommagées par les niveaux de lumière ambiante, sont de dimensions beaucoup plus petites et procurent une meilleure résolution temporelle (< 50 ps comparativement à environ 200 ps pour une PMT d'un prix équivalent). Des comparaisons entre des mesures provenant respectivement d'une PMT et d'une G-APD ont fait le sujet du chapitre 9. Les

résultats montrent qu'avec une configuration optique appropriée, il est possible d'obtenir des mesures comparables. On note également une meilleure définition dans le front montant du signal due à sa meilleure résolution temporelle. Des localisations d'inclusion faites avec des mesures provenant d'une G-APD prouvent également la validité de ce type de détecteur pour l'imagerie optique en milieu diffusant.

Au niveau de la conception d'un prototype de scanner, les objectifs visés ont été atteints. Une architecture sans contact, permettant des mesures sur tout le tour de l'objet a été réalisée. Des mesures résolues en temps par une technique ultra rapide de comptage de photons corrélé en temps est utilisée. Par une rotation de l'objet, il est possible d'effectuer des mesures sur de multiples projections. La simulation d'un anneau de détecteurs par une rotation d'un seul canal de détection est employée pour l'instant. Une intégration éventuelle de 16 canaux est prévue afin d'accélérer l'acquisition.

Concernant les algorithmes de localisation, la mise au point d'une approche par temps de vol a été démontrée. Cette technique s'appuie sur des mesures résolues en temps de la distribution des temps de vols des photons fluorescents suite à une excitation laser ultra brève. Par la méthode du NCFD développée, une extraction des temps d'arrivée est faite sur chaque courbe (FTPSF) provenant de différentes positions de détection. L'acquisition est également faite sur plusieurs projections tomographiques afin de maximiser l'information recueillie par un certain degré de redondance menant à une meilleure qualité de la localisation. Une procédure se divisant en deux étapes a été établie. Tout d'abord, de multiples balayages de l'axe vertical sont effectués pour déterminer dans quelle tranche horizontale se trouve l'inclusion. Ensuite de multiples projections tomographiques sont réalisées autour de cette tranche pour déterminer la position 2D de l'inclusion dans ce plan. Les résultats obtenus valident bien l'algorithme développé et prouvent du même coup qu'il est possible d'obtenir de l'information de profondeur par une analyse du temps d'arrivée des premiers photons. Il serait maintenant intéressant de complexifier le tout en considérant plus d'une inclusion fluorescente et vérifier s'il serait possible d'adapter l'algorithme développé. Un aspect qui mérite également qu'on lui porte attention est la mise au point d'une technique permettant de quantifier l'erreur de notre système. Actuellement, la

façon dont l'inclusion est tenue dans le milieu diffusant n'est pas parfaite et en aucun cas il est possible de déterminer sa position absolue dans l'espace. Il est donc impossible pour le moment de calculer une erreur quant aux résultats obtenus. Cependant, les résultats obtenus révèlent une localisation très près de la position dite « théorique » démontrant qu'il s'agit d'une technique très prometteuse. Il s'agit de plus d'une approche novatrice et unique dans la littérature développée dans le cadre des travaux présentés.

CINQUIÈME PARTIE

Annexes

Annexe A. Schéma bloc de l'algorithme de localisation 2D

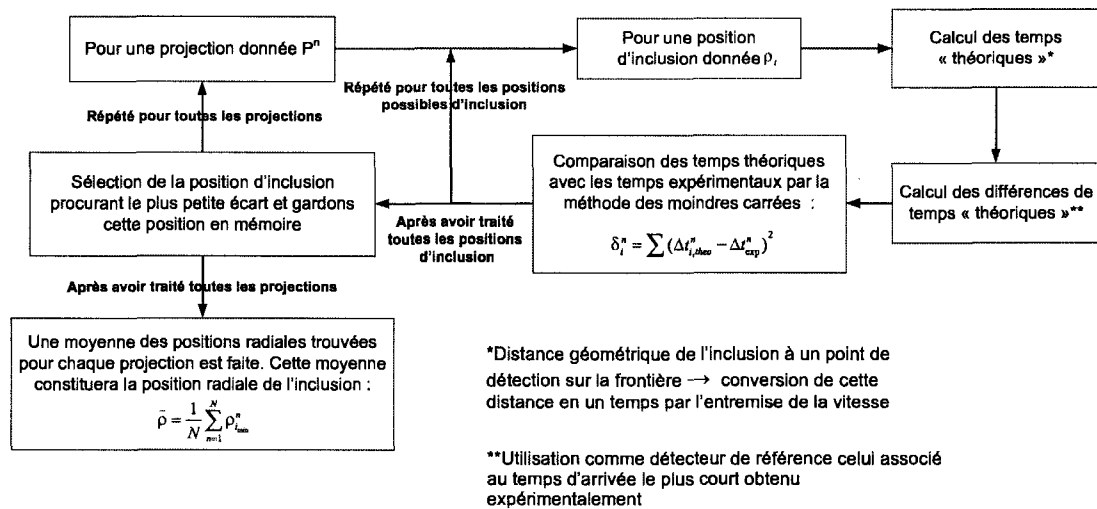


Figure A.1 Schéma bloc de l'algorithme de localisation 2D (*i.e.* à l'intérieur de la tranche) présenté au chapitre 7.

Annexe B. Détermination de la tranche verticale basée sur le temps d'arrivée

Le chapitre 8 présente une technique de localisation de la tranche verticale basée sur une analyse en intensité. Suite à sa publication, une nouvelle approche exploitant le temps d'arrivée des premiers photons a été mise au point. Tout comme la technique présentée au chapitre 8, il y a balayage de l'axe vertical pour 8 positions différentes de l'objet. Pour chacun des balayages, la hauteur à laquelle le temps d'arrivée est le plus court est retenue et une moyenne est effectuée. Il s'agit d'une moyenne pondérée en intensité afin de mettre plus d'ampleur aux données provenant de forts signaux. Cette moyenne sera considérée comme étant la hauteur où se trouve l'inclusion fluorescente. La figure B.1 montre deux exemples de détermination de la tranche verticale obtenus avec cette nouvelle approche.

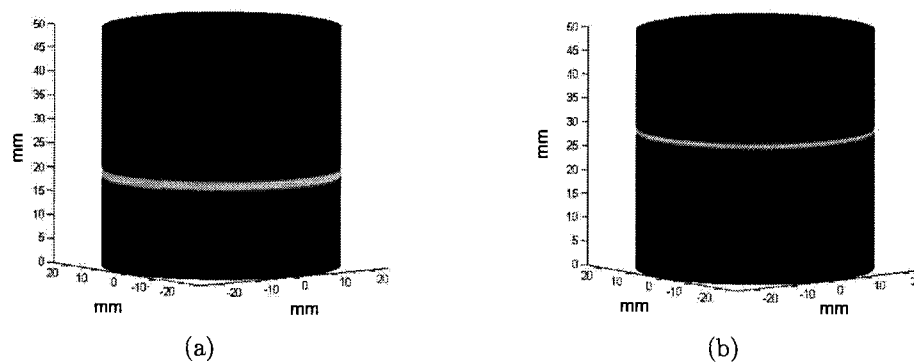


Figure B.1 Détermination de la tranche verticale en utilisant le temps d'arrivée des premiers photons (a) Position verticale « théorique » de l'inclusion était de 20 *mm* et la position obtenue est de 19 *mm*. (b) Position verticale « théorique » de l'inclusion était de 30 *mm* et la position obtenue est de 29 *mm*.

BIBLIOGRAPHIE

- ART Advanced Research Technologies Inc. (January 2004). *Pre-clinical optical molecular imager*, ART Advanced Research Technologies Inc., 2300 Alfred-Nobel Blvd., Saint-Laurent, QC, Canada, H4S 2A4.
- BECKER, W. (2005 (1st Ed.)). *Advanced time-correlated single photon counting techniques*. Springer.
- BECKER, W., BERGMANN, A., GIBSON, A., EVERDELL, N., JENNIONS, D., SCHWEIGER, M., ARRIDGE, S., HEBDEN, J. C. (2005). *Multi-dimensional time-correlated single photon counting applied to diffuse optical tomography*. volume 5693, pages 34–42.
- BENARON, D., HINTZ, S., VILLRINGER, A., BOAS, D., KLEINSCHMIDT, A., FRAHM, J., HIRTH, C., OBRIG, H., VAN HOUTEN, J., KERMIT, E., CHEONG, W., STEVENSON, D. (2000). *Noninvasive functional imaging of human brain using light*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, volume 20, numéro 3, pages 469–477.
- BENARON, D., STEVENSON, D. (1994). *Resolution of near infrared time-of-flight brain oxygenation imaging*. Adv. Exp. Med. Biol., volume 345, pages 609–617.
- BÉRUBÉ-LAUZIÈRE, Y., ROBICHAUD, V. (2006). *Time-resolved fluorescence measurements for diffuse optical tomography using ultrafast time-correlated single photon counting*. Advanced Photon Counting Techniques, SPIE Optics East, BECKER, W., éditeur, Proceedings of SPIE, volume 6372, pages 637206–1 – 637206–8.
- CAI, W., DAS, B., LIU, F., ZEVALLOS, M., LAX, M., ALFANO, R. (1996). *Time-resolved optical diffusion tomographic image reconstruction in highly scattering turbid media*. Applied Physical Sciences, volume 93, pages 13561–13564.
- Caliper Life Sciences Inc. (2007). *IVIS® Imaging System 3D Series*, Caliper Life Sciences Inc., 68 Elm Street, Hopkinton, MA 01748-1668 (<http://www.caliperls.com/products/optical-imaging/ivis-3d.htm>).
- Carestream Health (2007). <http://www.carestreamhealth.com/en/us/en/health/s2/products/invivofamily.jhtml.htm>, Carestream Health.
- CHANCE, B., COPE, M., GRATTON, E., RAMANUJAM, N., TROMBERG, B. (1998). *Phase measurement of light absorption and scatter in human tissue*. Review of Scientific Instruments, volume 69, numéro 10, pages 3457–3481.
- CHANCE, B., KAUFMANN, K. (February 1995). *Quantitative and qualitative in vivo tissue examination using time resolved spectroscopy*.
- COLAK, S., VAN DER MARK, M., HOOFT, G., HOOGENRAAD, J., VAN DER LINDEN, E., KUIJPERS, F. (1999). *Clinical optical tomography and nir spectroscopy for breast cancer detection*. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, volume 5, numéro 4, pages 1143–1158.
- COLAK, S. B., PAPAIOANNOU, D. G., 'T HOOFT, G. W., VAN DER MARK, M. B., SCHOMBERG, H., PAASSCHENS, J. C. J., MELISSEN, J. B. M., VAN ASTEN,

- N. A. A. J. (1997). *Tomographic image reconstruction from optical projections in light-diffusing media*. Applied Optics, volume 36, numéro 1, pages 180–213.
- CRI (2007). <http://www.cri-inc.com/products/maestro2.asp>, CRI.
- CUBEDDU, R., COMELLI, D., D'ANDREA, C., TARONI, P., VALENTINI, G. (2002). *Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine*. Applied Optics, volume 35, pages 61–76.
- DANEN, R. M., WANG, Y., LI, X., THAYER, W., YODH, A. (1988). *Regional imager for low-resolution functional imaging of the brain with diffusing near-infrared light*. Photochemistry and Photobiology, volume 67, numéro 1, pages 33–40.
- EDA, H., ODA, I., ITO, Y., WADA, Y., OIKAWA, Y., TSUNAZAWA, Y., TAKADA, M., TSUCHIYA, Y., YAMASHITA, Y., ODA, M., SASSAROLI, A., YAMADA, Y., TAMURA, M. (1999). *Multichannel time-resolved optical tomographic imaging system*. Review of Scientific Instruments, volume 70, numéro 9, pages 3595–3602.
- FRANCESCHINI, M., JOSEPH, D., HUPPERT, T., DIAMOND, S., BOAS, D. (Sept. 2006). *Diffuse optical imaging of the whole head*. Journal of Biomedical Optics, volume 11, numéro 5, pages 54007 – 1.
- FRANCESCHINI, M., MOESTA, K., FANTINI, S., GAIDA, G., GRATTON, E., JESS, H., MANTULIN, W., SEEBER, M., SCHLAG, P., KASCHKE, M. (1997). *Frequency-domain techniques enhance optical mammography : Initial clinical results*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., volume 94, pages 6468–6473.
- FRANCESCHINI, M., TORONOV, V., FILIACI, M., GRATTON, E., FANTINI, S. (2000). *On-line optical imaging of the human brain with 160-ms temporal resolution*. Optics Express, volume 6, numéro 3, pages 49–57.
- GALLANT, P., BELENKOV, A., MA, G., LESAGE, F., WANG, Y., HALL, D., MCINTOSH, L. (2004). *A quantitative time-domain optical imager for small animals in vivo fluorescence studies*. OSA Biomedical Optics Topical Meeting, Miami Beach, USA.
- GIBSON, A., HEBDEN, J., ARRIDGE, S. (2005). *Recent advances in diffuse optical imaging*. Physics in Medicine and Biology, volume 50, pages 1–43.
- GODAVARTY, A., SEVICK-MURACA, E., EPPSTEIN, M. (2005). *Three-dimensional fluorescence lifetime tomography*. Medical Physics, volume 32, numéro 4, pages 992–1000.
- HAWRYSZ, D., SEVICK-MURACA, E. (2000). *Developments toward diagnostic breast cancer imaging using near-infrared optical measurements and fluorescent contrast agents*. Neoplasia, volume 2, numéro 5, pages 388–417.
- HEBDEN, J., ARRIDGE, S., DELPY, D. (1997). *Optical imaging in medicine : I. experimental techniques*. Physics in Medicine and Biology, volume 42, pages 825–840.
- HERVE, L., DA SILVA, A., BOUTET, J., FRASSATI, A., DINTEN, J., PELTIE, P., RIZO, P. (2006). *Non contact fluorescence optical tomography by means of numerical and analytical approaches*. European Conference on Molecular Imaging Technology.
- HERVE, L., KOENIG, A., DA SILVA, A., BERGER, M., BOUTET, J., PELTIE, P., RIZO, P., DINTEN, J. (2007). *Algorithm for in vivo cw fluorescence diffuse optical*

- tomography taking into account optical heterogeneities of biological tissues and the shape of the animal*. IEEE International Symposium on Biomedical Imaging, volume 12, numéro 15, pages 812 – 815.
- HIELSCHER, A. (2005). *Optical tomographic imaging of small animals*. Current Opinion in Biotechnology, volume 16, numéro 1, pages 79–88.
- HIELSCHER, A. H., KLOSE, A. D., HANSON, K. M. (1999). *Gradient-based iterative image reconstruction scheme for time-resolved optical tomography*. IEEE Trans. Med. Imaging, volume 18, numéro 3, pages 262–271.
- HILLMAN, E., HEBDEN, J., SCHWEIGER, M., DEGHANI, H., SCHMIDT, F., DELPY, D., ARRIDGE, S. (2001). *Time resolved optical tomography of the human forearm*. Physics in Medicine and Biology, volume 46, numéro 4, pages 1117–1130.
- HINTZ, S., BENARON, D., VAN HOUTEN, J., DUCKWORTH, J., LIU, F., SPILMAN, S., STEVENSON, D., CHEONG, W. (1998). *Stationary headband for clinical time-of-flight optical imaging at the bedside*. Photochemistry and Photobiology, volume 6, numéro 8, pages 361–369.
- KUMAR, A. T., RAYMOND, S. B., BOVERMAN, G., BOAS, D. A., BACSKAI, B. J. (2006). *Time resolved fluorescence tomography of turbid media based on lifetime contrast*. Optics Express, volume 14, numéro 25, pages 12255–12270.
- KUMAR, A. T. N., RAYMOND, S. B., BACSKAI, B. J., BOAS, D. A. (2008). *Comparison of frequency-domain and time-domain fluorescence lifetime tomography*. Optics Letters, volume 33, numéro 5, pages 470–472.
- LAKOWICZ, J. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Plenum Pub Corp, 2 édition.
- LASSER, T., NTZIACHRISTOS, V. (2007). *Optimization of 360° projection fluorescence molecular tomography*. Medical Image Analysis, volume 11, numéro 4, pages 389–399.
- LASSER, T., SOUBRET, A., RIPOLL, J., NTZIACHRISTOS, V. (2008). *Surface reconstruction for free-space 360° fluorescence molecular tomography and the effects of animal motion*. IEEE Transactions on Medical Imaging, volume 27, numéro 2, pages 188 – 194.
- LONG, W., BÉRUBÉ-LAUZIÈRE, Y., HALL, D., MCINTOSH, L. *Method and apparatus for time resolved optical imaging of biological tissues as part of animals*.
- MILSTEIN, A., OH, S., BOUMAN, C., WEBB, K., STOTT, J., BOAS, D., MILLANE, R. (2006). *Hidden pictures*. SPIE oemagazine, pages 26–28.
- MONTCEL, B., CHABRIER, R., POULET, P. (2005). *A time-resolved, multi-wavelength, fluorescence, diffuse optical tomography system for small animal imaging*. Proceedings of SPIE-OSA, volume 5859.
- NTZIACHRISTOS, V., SCHELLENBERGER, E., RIPOLL, J., YESSAYAN, D., GRAVES, E., BOGDANOV, A., JOSEPHSON, L., WEISSLEDER, R. (2004). *Visualization of antitumor treatment by means of fluorescence molecular tomography with an annexin v-cy5.5 conjugate*. PNAS, volume 101, numéro 33, pages 12294–12299.

- NTZIACHRISTOS, V., WEISSLEDER, R. (2001). *Experimental three-dimensional fluorescence reconstruction of diffuse media by use of a normalized born approximation*. Optics Letters, volume 26, numéro 12, pages 893–895.
- PATTERSON, M. S., CHANCE, B., WILSON, B. C. (1989). *Time resolved reflectance and transmittance for the noninvasive measurement of tissue optical properties*. Applied Optics, volume 28, pages 2331–2336.
- POGUE, B., MCBRIDE, T., OSTERBERG, U., PAULSEN, K. (1999). *Comparison of imaging geometries for diffuse optical tomography of tissue*. Optics Express, volume 4, numéro 8, pages 270–286.
- POGUE, B., TESTORF, M., MCBRIDE, T., OSTERBERG, U., PAULSEN, K. (1997). *Instrumentation and design of a frequency domain diffuse optical tomography imager for breast cancer detection*. Optics Express, volume 1, numéro 13, pages 391–403.
- RIPOLL, J., NIETO-VESPERINAS, M., WEISSLEDER, R., NTZIACHRISTOS, V. (2002). *Fast analytical approximation for arbitrary geometries in diffuse optical tomography*. Optics Letters, volume 27, numéro 7, pages 527–529.
- RIPOLL, J., SCHULZ, R., NTZIACHRISTOS, V. (2003). *Free-space propagation of diffuse light : Theory and experiments*. Physical Review Letters, volume 91, numéro 10, pages 1–4.
- ROBICHAUD, V., BÉRUBÉ-LAUZIÈRE, Y. (2007a). *A spherical wavefront intersection algorithm for time-of-flight non-contact diffuse optical tomography of fluorescent inclusions in thick turbid media*. Photonics North '07, Biophotonics session, 4-7 June 2007, Ottawa, Canada.
- ROBICHAUD, V., BÉRUBÉ-LAUZIÈRE, Y. (2007b). *Time-of-flight 3d localization of fluorescent inclusions in thick turbid media with ultra-fast tcsps and electronics*. Advanced Photon Counting Techniques, SPIE Optics East, volume 6771.
- ROBICHAUD, V., LAPOINTE, É., BÉRUBÉ-LAUZIÈRE, Y. (2007). *Ultra-fast time-correlated single photon counting avalanche photodiodes for time-domain non-contact fluorescence diffuse optical tomography*. Photonics North '07, Biophotonics session, 4-7 June 2007, Ottawa, Canada, volume 6796.
- SCHMIDT, F., FRY, M., HILLMAN, E., HEBDEN, J., DELPY, D. (2000). *A 32-channel time-resolved instrument for medical optical tomography*. Review of Scientific Instruments, volume 71, numéro 1, pages 256–265.
- SCHMITZ, C., LOCKER, M., LASKER, J., HIELSCHER, A., BARBOUR, R. (2002). *Instrumentation for fast functional optical tomography*. Review of Scientific Instruments, volume 73, numéro 2, pages 429–439.
- SCHULZ, R., ECHNER, G., RÜHLE, H., STROH, W., VIERLING, J., VOGT, T., PETER, J., SEMMLER, W. (2005). *Development of a fully rotational non-contact fluorescence tomographer for small animals*. IEEE Nuclear Science Symposium, volume 4, pages 2391–2393.
- SCHULZ, R., RIPOLL, J., NTZIACHRISTOS, V. (2003). *Noncontact optical tomography of turbid media*. Optics Letters, volume 28, numéro 18, pages 1701–1703.
- SCHULZ, R., RIPOLL, J., NTZIACHRISTOS, V. (2004). *Experimental fluorescence tomography of tissues with noncontact measurements*. IEEE Transactions on Medical Imaging, volume 23, numéro 4, pages 492–500.

- SEVICK-MURACA, E., HOUSTON, J., GURFINKEL, M. (2002). *Fluorescence-enhanced, near infrared diagnostic imaging with contrast agents*. Current Opinion in Chemical Biology, volume 6, numéro 5, pages 642–650.
- SIEGEL, A., MAROTA, J., BOAS, D. (1999). *Design and evaluation of a continuous-wave diffuse optical tomography system*. Optics Express, volume 4, numéro 8, pages 287–298.
- SOLOVIEV, V. Y., TAHIR, K. B., MCGINTY, J., ELSON, D. S., NEIL, M. A. A., FRENCH, P. M. W., R., A. S. (2007). *Fluorescence lifetime imaging by using time-gated data acquisition*. Applied Optics, volume 46, numéro 30, pages 7384–7391.
- SVANBERG, S. (2004). *Atomic and molecular spectroscopy : Basic aspects and practical applications*. Springer.
- TURNER, G., ZACHARAKIS, G., SOUBRET, A., RIPOLL, J., NTZIACHRISTOS, V. (2005). *Complete-angle projection diffuse optical tomography by use of early photons*. Optics Letters, volume 30, numéro 4, pages 409–411.
- VisEn Medical (2007). [http : //www.visenmedical.com/products/quantitative_tomography_systems/fmt_2500_system/introduction/index.htm](http://www.visenmedical.com/products/quantitative_tomography_systems/fmt_2500_system/introduction/index.htm), VisEn Medical.
- WALKER, J., WILSON, K., éditeurs (2005). *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Cambridge University Press.
- WALKER, S., FANTINI, S., GRATTON, E. (1997). *Image reconstruction by back-projection from frequency-domain optical measurements in highly scattering media*. Applied Optics, volume 36, numéro 1, pages 170–174.
- WEISSLEDER, R., NTZIACHRISTOS, V. (2003). *Shedding light onto live molecular targets*. Nature Medicine, volume 9, numéro 1, pages 123–128.
- WU, J., PERELMAN, L., DASARI, R., FELD, M. (1997). *Fluorescence tomographic imaging in turbid media using early-arriving photons and laplace transforms*. PNAS Medical Sciences, volume 94, numéro 16, pages 8783–8788.
- WU, J., WANG, Y., PERELMAN, L., ITZKAN, I., DASARI, R., FELD, M. (1995). *Time-resolved multichannel imaging of fluorescent objects embedded in turbid media*. Optics Letters, volume 20, numéro 5, pages 489–491.
- YALAVARTHY, P. K., DEHGhani, H., POGUE, B. W., PAULSEN, K. D. (2006). *Critical computational aspects of near infrared circular tomographic imaging : Analysis of measurement number, mesh resolution and reconstruction basis*. Optics Express, volume 14, numéro 13, pages 6113–6127.
- ZACHARAKIS, G., RIPOLL, J., WEISSLEDER, R., NTZIACHRISTOS, V. (2005). *Fluorescent protein tomography scanner for small animal imaging*. IEEE transactions on medical imaging, volume 24, numéro 7, pages 878–885.