

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE  
Faculté de génie  
Département de génie électrique et de génie informatique

SCANNER POUR TOMOGRAPHIE  
OPTIQUE DIFFUSE SANS CONTACT À  
CANAUX DE DÉTECTION DANS LE  
DOMAINE TEMPOREL À DEUX BANDES  
DE LONGUEUR D'ONDE POUR  
IMAGERIE INTRINSÈQUE ET PAR  
FLUORESCENCE SUR PETIT ANIMAL

Mémoire de maîtrise  
Spécialité : génie électrique

Eric Lapointe

Jury : Yves BÉRUBÉ-LAUZIÈRE (directeur)  
Réjean FONTAINE (rapporteur)  
Roger LECOMTE

Sherbrooke (Québec) Canada

janvier 2011

IV-2167



**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: 978-0-494-83717-7**

**Our file Notre référence**

**ISBN: 978-0-494-83717-7**

**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.

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

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

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

**Canada**

À ma famille et mes amis

# RÉSUMÉ

Ce mémoire décrit le développement opto-mécanique et électro-mécanique de la 2<sup>ème</sup> version du scanner *TomOptUS* pour tomographie optique diffuse (TOD). Ce scanner est destiné à l'imagerie moléculaire 3D de l'intérieur d'un petit animal. Les buts de la TOD sont : 1) d'obtenir la distribution spatiale des coefficients d'absorption ( $\mu_a$ ) et de diffusion ( $\mu_s$ ) dans les tissus biologiques (imagerie intrinsèque) et 2) de localiser des agents fluorescents injectés et suivre leur distribution spatiale (imagerie par fluorescence). La TOD sur petit animal est d'un grand intérêt en pharmacologie et en oncologie pour l'étiquetage de médicaments afin de suivre leur progression, pour suivre l'évolution d'une pathologie sous traitement sur un même individu, ou pour repérer des cellules cancéreuses par marquage des protéines membranaires qu'elles expriment. La diffusion de la lumière dans les tissus biologiques est le plus grand obstacle en TOD. Les mesures en régime continu ne permettent pas de distinguer les photons détectés selon le degré de diffusion qu'ils subissent. La diffusion mène à une perte d'information quant à la trajectoire suivie par les photons. La détection résolue en temps permet de garder une partie de cette information. Le scanner *TomOptUS* utilise un système ultra-rapide de comptage de photons corrélé en temps et des tubes photomultiplicateurs pour mesurer la distribution temporelle de pulses lumineux transmis et/ou rétrodiffusés dans le sujet à imager suite à l'illumination à l'aide d'impulsions laser ultra-brèves. La 2<sup>ème</sup> version du scanner est un système multicanal à géométrie annulaire sur 360° autour du sujet. Il est muni de 7 canaux de détection optique permettant l'acquisition simultanée de données tomographiques dans deux bandes de longueurs d'onde (intrinsèque et fluorescence). L'acquisition des données est automatisée par ordinateur. Ce scanner a l'avantage d'effectuer des mesures sans contact avec le sujet. Ceci facilite l'acquisition des données et permettra éventuellement de le combiner à d'autres modalités d'imagerie médicale sans contact (tomographie d'émission par positrons, tomodontométrie ou imagerie par résonance magnétique) pour réaliser des séances d'imagerie multimodales. Le scanner est aussi équipé d'un système de vision numérique stéréo à 2 caméras permettant de mesurer la surface externe du sujet en 3D. Les mesures tomographiques et de surface se font simultanément en utilisant le faisceau laser incident sur le sujet. On présente des résultats de localisation d'un nombre *a priori* inconnu d'inclusions fluorescentes ponctuelles dans une mire (ou fantôme) absorbante et diffusante. L'algorithme de localisation repose sur la mesure des temps d'arrivée des premiers photons à différentes positions angulaires autour du sujet. Ceci requière une résolution temporelle très élevée dans la détection des photons, une très grande synchronisation des différents canaux de détection et une grande stabilité dans la détection des signaux optiques. L'architecture du scanner ainsi qu'une méthode de calibration élaborée dans le cadre des présents travaux permettent d'atteindre de telles performances. On présente également des résultats préliminaires de l'effet d'un milieu hétérogène sur le temps de vol des photons.

**Mots-clés :** Scanner, tomographie optique diffuse, système multicanal, mesures optiques sans contact, imagerie médicale, fluorescence, tube photomultiplicateur, proche infrarouge, mesures optiques dans le domaine temporel, comptage de photons corrélé en temps



# REMERCIEMENTS

La personne que je tiens remercier en premier est sans aucun doute Yves Bérubé-Lauzière. Il a toujours eu mon respect en tant que superviseur, et au fil du temps, il a gagné mon amitié. Il adore son travail et est passionné par ses travaux de recherche. De plus, il trouve plaisir à transmettre ses connaissances aux autres, une qualité qui fait de lui un excellent directeur de recherche. Il m'a appris beaucoup et je ne regrette en rien de l'avoir choisi comme superviseur. J'ai grandement apprécié toute la confiance qu'il m'a accordée durant ces 2 années. Je me sentais supporté autant dans mon travail que dans l'aspect humain. Je n'hésiterai pas à demander son aide un jour si j'en ressens le besoin.

J'ai adoré mon passage dans le groupe *TomOptUS*. Il n'y a pas grand chose à dire de négatif. L'ambiance de travail était saine et agréable. Cela s'explique en partie parce qu'Yves a su mettre ensemble un excellent groupe de personnes. Certains d'entre eux sont même devenus des amis et il me fait de la peine de les quitter. Il y a Geoffroy "*Rock your Bodi*". On va certainement pêcher plus d'un poisson ensemble. Il ne faut pas lâcher. Aye Julien! Quand repart-on au GR20? Il ne faut pas que j'oublie Johanne dite "*The killer*", ma fidèle partenaire de chialage. Je n'en retiens que de bons souvenirs. Je pense aussi à Mathieu, celui qui ne manque jamais une pause café. En passant, un gros merci pour l'aide que tu m'as apporté sur *SolidWorks*. Par ailleurs, je me souviendrai toujours de la voie douce et apaisante de Zola. Il n'y a jamais rien de négatif pour elle. Pour David et Jorge, même si on se parlait peu, je suis tout de même content de vous avoir connus. En somme, une chance que vous étiez tous là, votre simple présence au labo m'a grandement motivé.

Je remercie aussi ma famille qui m'a supporté tout au long de mes études. Quand j'ai quitté la maison à 19 ans pour venir étudier à Sherbrooke, je n'étais pas conscient que la distance entre ma famille et moi serait aussi difficile. Malgré cela, j'ai toujours ressenti de leur part le support requis pour continuer d'avancer. Merci pour tout!



# TABLE DES MATIÈRES

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
1.1	Mise en contexte . . . . .	1
1.2	Objectif global du projet de recherche . . . . .	3
1.3	Contributions originales . . . . .	3
1.4	Plan du document . . . . .	3
<b>2</b>	<b>ÉTAT DE L'ART</b>	<b>5</b>
2.1	L'absorption et la diffusion . . . . .	5
2.2	La fluorescence . . . . .	7
2.3	Géométries de scanners . . . . .	9
2.3.1	Imagerie intrinsèque . . . . .	9
2.3.2	Imagerie par fluorescence . . . . .	9
2.3.3	L'excitation . . . . .	10
2.3.4	La détection . . . . .	10
2.4	Types de mesures en TOD . . . . .	11
2.4.1	Systèmes à régime continu . . . . .	12
2.4.2	Systèmes résolus en temps . . . . .	12
2.4.3	Mesures sans contact . . . . .	14
2.5	Systèmes de TOD existants . . . . .	15
2.5.1	Systèmes de <i>VisEn Medical</i> . . . . .	16
2.5.2	Système de <i>Cambridge Research &amp; Instrumentation, Inc. (CRI)</i> . . . . .	17
2.5.3	Système de <i>Advanced Research Technologies Inc. (ART)</i> . . . . .	18
2.5.4	Système de Wooseok Ko . . . . .	19
2.5.5	Système de Poulet . . . . .	20
2.5.6	Système de Ntziachristos . . . . .	21
2.5.7	Système de Carson . . . . .	22
2.5.8	Système de Sevick-Muraca . . . . .	23
2.5.9	Système de Da Silva . . . . .	23
2.6	Résumé . . . . .	25
<b>3</b>	<b>NOTIONS DE CONCEPTION OPTIQUE</b>	<b>27</b>
3.1	Critères de conception . . . . .	27
3.2	Les lentilles . . . . .	27
3.3	Les aberrations géométriques . . . . .	29
3.3.1	Aberration sphérique . . . . .	29
3.3.2	Aberration de coma . . . . .	30
3.3.3	Aberration d'astigmatisme . . . . .	30
3.3.4	Distorsion . . . . .	31
3.4	Aberration chromatique . . . . .	32
3.5	Les filtres . . . . .	32
3.5.1	Filtrage spectral . . . . .	32

3.5.2	Filtrage spatial . . . . .	33
3.5.3	Filtrage de polarisation . . . . .	33
3.6	Principe de symétrie . . . . .	34
3.7	Pouvoir de captation de la lumière . . . . .	34
3.8	Invariant de Lagrange . . . . .	35
3.9	Systèmes optiques considérés . . . . .	35
3.9.1	Système optique en conjugaison finie . . . . .	36
3.9.2	Systèmes afocaux . . . . .	38
3.10	Résumé . . . . .	38
<b>4</b>	<b>GÉNÉRATION ANTÉRIEURE DU SCANNER <i>TomOptUS</i></b>	<b>41</b>
4.1	Le scanner . . . . .	41
4.2	Canal de détection . . . . .	43
4.2.1	Aspects optiques . . . . .	43
4.2.2	Aspects mécaniques . . . . .	46
4.3	Système de vision 3D . . . . .	48
4.4	Contrôle du scanner par ordinateur . . . . .	48
4.5	Résumé . . . . .	50
<b>5</b>	<b>DÉFINITION DÉTAILLÉE ET OBJECTIFS DU PROJET</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>SECONDE GÉNÉRATION DU SCANNER <i>TomOptUS</i></b>	<b>57</b>
6.1	Introduction . . . . .	58
6.2	Design requirements/choices . . . . .	60
6.2.1	Non-contact measurements . . . . .	60
6.2.2	Time-domain measurements . . . . .	61
6.2.3	Multi-view data acquisition . . . . .	62
6.3	Instrument overview . . . . .	63
6.4	Hardware . . . . .	64
6.4.1	Electro-mechanics for multi-view data acquisition . . . . .	64
6.4.2	Coordinate systems and related nomenclature . . . . .	66
6.4.3	Electro-optics for time-domain measurements . . . . .	69
6.4.4	Opto-mechanics for non-contact detection . . . . .	70
6.4.5	3D outer surface shape metrology . . . . .	73
6.5	Software . . . . .	75
6.5.1	Graphical user interface . . . . .	75
6.5.2	Data acquisition and hardware control . . . . .	75
6.6	Calibration . . . . .	77
6.6.1	Phantoms . . . . .	78
6.6.2	Numerical constant fraction discrimination . . . . .	78
6.6.3	The calibration problem . . . . .	79
6.6.4	Calibration measurements . . . . .	80
6.6.5	Procedure and data processing . . . . .	81
6.6.6	Validation . . . . .	83
6.7	Results . . . . .	83

TABLE DES MATIÈRES	vii
6.7.1 Fluorescence localization . . . . .	84
6.7.2 Effects of an heterogeneous medium on EPATs . . . . .	86
6.8 Discussion and conclusions . . . . .	88
<b>7 CONCLUSION</b>	<b>91</b>
7.1 Sommaire . . . . .	91
7.2 Travaux futurs . . . . .	92
7.2.1 Mesures tomographiques . . . . .	92
7.2.2 Le scanner (en général) . . . . .	93
7.2.3 Canaux de détection optique . . . . .	93
<b>A Graphiques</b>	<b>95</b>
<b>B SCANNER À 3 CANAUX</b>	<b>97</b>
<b>LISTE DES RÉFÉRENCES</b>	<b>101</b>



# LISTE DES FIGURES

2.1	Trajectoire des photons dans un milieu biologique . . . . .	6
2.2	Coefficient d'absorption des principaux absorbants (chromophores) biologiques dans les tissus en fonction de la longueur d'onde . . . . .	7
2.3	Diagramme de Jablonski (Principe de la fluorescence) . . . . .	8
2.4	Illustration de géométries possibles de scanners de TOD en absorption . . .	10
2.5	Illustration de géométries possibles de scanners de TOD en fluorescence . .	11
2.6	Configurations typiques concernant l'excitation lumineuse . . . . .	12
2.7	Mesure dans le domaine fréquentiel . . . . .	13
2.8	Signal de la fluorescence pour des impulsions laser à 80 MHz . . . . .	14
2.9	Histogramme des temps d'arrivée de photons mesurés par le système de comptage de photons . . . . .	15
2.10	Système tomographique de <i>VisEn Medical - FMT 2500™LX</i> . . . . .	16
2.11	Image multimodale FMT-TDM . . . . .	17
2.12	Système d'imagerie de <i>CRI - Maestro 2</i> . . . . .	17
2.13	Images obtenues avec le système d'imagerie de CRI . . . . .	18
2.14	Système d'imagerie de <i>ART - Optix MX3</i> . . . . .	19
2.15	Schémas opto-mécanique du <i>Optix MX3</i> . . . . .	19
2.16	Système sans contact pour TOD en régime continu de Wooseok Ko. . . . .	20
2.17	Système avec contact de Poulet . . . . .	21
2.18	Système de Ntziachristos . . . . .	22
2.19	Système <i>ADI</i> en mode transillumination de Carson . . . . .	23
2.20	Système de tomographie optique en transillumination de Carson . . . . .	23
2.21	Système de tomographie optique en fluorescence de Carson . . . . .	24
2.22	Système de Sevick-Muraca . . . . .	24
2.23	Image multimodale TOD-TDM-TEP . . . . .	25
2.24	Système de Da Silva . . . . .	25
3.1	Les types de lentilles . . . . .	28
3.2	Doublet achromatique . . . . .	29
3.3	Tache d'airy . . . . .	29
3.4	Aberration sphérique . . . . .	30
3.5	Aberration de coma . . . . .	30
3.6	Aberration d'astigmatisme . . . . .	31
3.7	Aberration de distorsion . . . . .	31
3.8	Aberration chromatique . . . . .	32
3.9	Exemple de filtrage spatial . . . . .	34
3.10	Système optique illustrant le principe de symétrie . . . . .	34
3.11	Invariant de Lagrange . . . . .	36
3.12	Système à deux composantes travaillant en conjugaison finie . . . . .	37
3.13	Télescope de Kepler . . . . .	38
3.14	Télescope de Galilée . . . . .	39

4.1	Première version du scanner <i>TomOptUS</i> . . . . .	42
4.2	Première version du canal de détection optique - canal à une longueur d'onde . . . . .	44
4.3	Illumination relative de la 1 <sup>ière</sup> version du canal de détection optique . . . . .	45
4.4	Angle couvert par un canal de détection . . . . .	46
4.5	Angle couvert par un canal et nombre de canaux qu'il est possible de placer autour de l'objet en fonction de la longueur focale de la lentille . . . . .	47
4.6	Nombre de canaux possible pour la 2 <sup>ième</sup> version du scanner . . . . .	48
4.7	Dimensions typiques d'une souris . . . . .	48
4.8	Première version du système de vision 3D . . . . .	49
4.9	Première version de l'interface de contrôle du scanner. . . . .	49
6.1	System overview. . . . .	64
6.2	Mechanical design of the scanner which comprises 7 dual wavelength detection channels with 14 PMTs for DOT measurements and 2 cameras for measurements of the subject's surface in 3D. . . . .	65
6.3	Photographs of the scanner. . . . .	66
6.4	Side view of the scanner. . . . .	67
6.5	Top view of the scanner showing the different axes and angles related to coordinate systems. The $z$ axis, common to all coordinate systems, comes out of the page; $x_W$ and $y_W$ refer to the $x$ and $y$ axes of the world coordinate system (WCS). Angles $\phi_D$ (in red) and $\phi_S$ (green) refer to the angles of rotation of the detector turntable and subject coordinate systems relative to the WCS. . . . .	68
6.6	Optical path of the laser light before hitting the subject (not to scale - secondary reflections in the prism are not shown). . . . .	69
6.7	Optical layout of a dual-wavelength detection channel. For each optical path (laser excitation (green) and fluorescence (blue)) the lenses form a condenser pair with unit magnification. . . . .	71
6.8	Fraction of unvignetted rays vs spot diameter on subject. . . . .	72
6.9	Photographs of the 3D computer vision (CV) system. Left : In its simplest expression and with a validation shape as object. The validation shape (see inset) consists of precision machined spheres with known radii; it is used to validate 3D reconstruction (see below). Right : 3D CV system integrated into the scanner. . . . .	74
6.10	Left : Model of the validation shape. Right : Reconstructed validation shape with the 3D CV system. . . . .	76
6.11	Reconstruction of a mouse's torso. Left : Mouse belly. Right : Mouse back. . . . .	76
6.12	GUI of the scanner illustrating a case where 4 fluorescence and 6 excitation detection channels were used (green and red circles ON at the bottom left of the GUI. . . . .	77
6.13	Flow chart of data acquisition and associated hardware control. . . . .	78

6.14	Left : Phantom made of a glass cylinder filled with an aqueous dilution of Intralipid (illustrated here with fluorescent inclusions embedded in it and used in some experiments, see the results section - Sect. 6.7.1). Right : Measurement configuration for determining the absolute offset of the reference channel (Sect. 6.6.5). . . . .	79
6.15	Left : Measured IRFs for arms of the detection channels $k = 7, \dots, 13$ pertaining to the excitation wavelength ( $\lambda_{ex} = 780$ nm) : raw data with maximum normalized to 1 shown in green. Raw data shifted to a common maximum centered at time zero solely to aid visual comparison of the IRFs shown in red. Right : Same as left, but for the fluorescence path ( $\lambda_{fl} = 830$ nm, $k = 0, \dots, 6$ ). . . . .	81
6.16	Left : In green, raw TPSFs for the laser excitation path (780 nm) acquired on the phantom with all channels making a measurement at the same angular position (here at $180^\circ$ is shown - reference channel in magenta). In red are the same TPSFs, but denoised, and with IRFs and delays removed using the calibration data (reference in blue). Right : Same as left, but for the fluorescence path (830 nm). . . . .	83
6.17	Uncorrected (red) and corrected (blue) EPATs for 3 tomographic projections acquired at 780 nm on the cylindrical phantom. . . . .	84
6.18	Left : Contributions to a measured EPAT for the light emitted by a fluorescent inclusion. Right : Oval on which the inclusion is to be found. . . . .	85
6.19	Left : Density map obtained from oval intersections showing the most probable locations (peaks) where inclusions are likely to be found. Right : Localization result for 3 inclusions. . . . .	86
6.20	Schematic (top view) of the heterogeneous medium consisting of two concentric glass tubes filled with different concentrations of aqueous dilutions of Intralipid (Outer tube : diameter = 50 mm, wall thickness = 1.5 mm, height = 12 cm. Inner tube : diameter = 25 mm, wall thickness = 1 mm, height = 12 cm). The larger glass tube is always filled with a 48 :1 (V/V) aqueous dilution of Intralipid. . . . .	87
6.21	EPATs at the laser wavelength : a) Without inner smaller glass tube (whole medium consists of a homogeneous 48 :1 (V/V) aqueous dilution of Intralipid). b) Inner glass tube filled with a 48 :1 (V/V) dilution of Intralipid. c) Inner glass tube filled with a 96 :1 (V/V) dilution (low concentration) of Intralipid. d) With inner small glass tube filled with air. e) Inner glass tube filled with a 12 :1 (V/V) dilution (high concentration) of Intralipid. . . . .	88
A.1	Caractéristiques du système optique de la 1 <sup>ière</sup> génération du scanner. . . . .	95
A.2	Caractéristiques du système optique de la 2 <sup>ème</sup> génération du scanner. . . . .	96



# LISTE DES TABLEAUX

3.1	Liste des spécifications à prendre en compte lors de la conception d'un système optique . . . . .	28
4.1	Effet de la longueur d'onde sur le système optique . . . . .	45
6.1	Localization result corresponding to Fig. 6.19. . . . .	86



# LISTE DES ACRONYMES

Acronyme	Définition
2D	Bidimensionnel
3D	Tridimensionnel
ADI	<i>Angular domain imaging</i> - Imagerie en domaine angulaire
APD	<i>Avalanche photodiode</i> - Photodiode à avalanche
CCD	<i>Charge-coupled device</i> - Capteur photographique
CFD	<i>Constant fraction discriminator</i> - Discriminateur à fraction constante
CW	<i>Continuous-wave</i> - Régime continu
FCLA	Filtre à cristaux liquides accordable
FD	<i>Frequency-domain</i> - Domaine fréquentiel
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> - Agence américaine des denrées alimentaires et des médicaments
FTPSF	<i>Fluorescence time point-spread function</i> - Réponse impulsionnelle temporelle pour la fluorescence
ICG	<i>Indocyanine green</i> - Vert d'indocyanine
IOD	Imagerie optique diffuse
IR	Infrarouge
IRF	<i>Instrument response function</i> - Fonction de réponse de l'instrument
IRM	Imagerie par résonance magnétique
MCP	<i>Microchannel plate</i> - Galette de microcanaux
MTF	<i>Modulation transfer function</i> - Fonction de modulation de transfert
NA	<i>Numerical aperture</i> - Ouverture numérique
NCFD	<i>Numerical constant fraction discriminator</i> - Discriminateur numérique à fraction constante
PIR	Proche infrarouge
PMT	<i>Photomultiplier tube</i> - Tube photomultiplicateur
RMS	<i>Root mean square</i> - Valeur efficace
TCSPC	<i>Time-correlated single photon counting</i> - Comptage de photons corrélé en temps
TD	<i>Time-domain</i> - Domaine temporel
TDM	Tomodensitométrie
TEM	Tomographie d'émission monophotonique
TEP	Tomographie d'émission par positrons
TOD	Tomographie optique diffuse
TODF	Tomographie optique diffuse par fluorescence
TPSF	<i>Time point-spread function</i> - Réponse impulsionnelle temporelle
TVF	Temps de vie de fluorescence
UV	Ultraviolet



# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

La première section de ce chapitre fait la mise en contexte du présent projet. On explique en quoi ce projet est intéressant et on énumère brièvement les domaines impliqués. La deuxième section présente la définition du projet de recherche et la troisième en décrit l'objectif principal. La quatrième section concerne l'apport original des présents travaux au groupe *TomOptUS*. Dans la dernière section, un plan du présent mémoire de maîtrise est donné pour bien visualiser sa structure.

### 1.1 Mise en contexte

Les travaux de recherche du groupe *TomOptUS* portent sur le développement d'un scanner optique pour imagerie moléculaire tridimensionnelle (3D) de petits animaux. Plus précisément, on parle de tomographie optique diffuse (TOD) par fluorescence (TODF) induite par laser. Le scanner *TomOptUS* est caractérisé par des mesures résolues en temps et sans contact avec le sujet (*i.e.* il n'y a pas de fibres optiques en contact avec l'animal pour diriger la lumière d'excitation dans le sujet et capter celle qui en ressort et on n'utilise pas de liquide adaptateur dans lequel l'animal est plongé). Les avantages d'une approche sans contact ont été clairement discutés par le groupe de Schulz [Schulz *et al.*, 2004].

La motivation derrière le scanner *TomOptUS* est d'utiliser de la lumière proche infrarouge (PIR) allant de 650 à 1000 nm et des techniques optiques pour visualiser de façon non-invasive et profondément (>1 cm) en 3D l'intérieur d'organismes vivants macroscopiques de manière semblable à la tomодensitométrie (TDM ou tomographie par rayons X), la tomographie d'émission par positrons (TEP) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). On obtiendra donc un moyen additionnel de diagnostic qui pourrait apporter beaucoup de bénéfices comme des informations fonctionnelles sur les tissus biologiques imagés. Parmi les applications les plus importantes de la TOD chez l'humain, on note l'imagerie des couches périphériques du cerveau [Selb *et al.*, 2006], l'imagerie de la prostate [Jiang *et al.*, 2008] et la mammographie laser [Wang *et al.*, 2010; Hawrysz et Sevick-Muraca, 2000]. Une autre application des plus importantes et intéressantes est l'imagerie moléculaire sur petit animal (p. ex. des souris) [Hall, 2006; Palmer *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2008]. Ceci de-

vrait notamment aider l'industrie pharmaceutique à développer et tester des médicaments plus efficacement et ce, plus rapidement tout en utilisant moins d'animaux.

Un grand nombre d'agents fluorescents fonctionnalisés ont été développés à ce jour pour la microscopie afin de marquer des processus et de réactions biomoléculaires [Ntziachristos, 2006]. La liste des marqueurs fluorescents continue de s'allonger avec l'apparition de nouveaux agents fluorescents organiques, inorganiques et les nano-particules biologiques [Rao *et al.*, 2007]. Ces récentes percées rendent la TODF particulièrement intéressante, car elles ouvrent la voie à l'utilisation de ces agents pour l'imagerie non-invasive sur animaux entiers. De plus, les agents fluorescents utilisés sont non-radioactifs contrairement à ceux utilisés en TEP, ce qui rend leur manipulation plus aisée (la TEP permet toutefois, à ce jour, une quantification inégalée de la concentration d'un agent marqueur). La TODF est une technique non-invasive d'imagerie permettant d'obtenir des propriétés optiques à l'intérieur d'un sujet (coefficient d'absorption  $\mu_a$ , coefficient de diffusion  $\mu_s$  et concentration d'un agent fluorescent) en prenant des mesures à l'extérieur de celui-ci. Par ailleurs, l'avènement des points quantiques pourrait augmenter encore davantage le potentiel d'utilisation de marqueurs fluorescents [Parak *et al.*, 2005]. En captant la lumière d'excitation laser ainsi que la lumière fluorescente, on peut donc faire de l'imagerie intrinsèque et de l'imagerie par fluorescence (voir section 2.3.1 et 2.3.2). À noter que même en imagerie par fluorescence, les mesures intrinsèques sont nécessaires pour les algorithmes de reconstruction tomographiques car elles permettent de reconstruire en 3D  $\mu_a$  et  $\mu_s$ .

Le grand défi rencontré en TOD est que la lumière PIR est fortement diffusée par les tissus biologiques. La probabilité de capter des photons n'ayant subi aucune déviation est en pratique nulle pour des épaisseurs de tissus au-delà de quelques millimètres qui sont d'intérêt ici (section 2.1). C'est tout le contraire pour la TDM qui exploite la trajectoire rectiligne des photons. La TOD ne peut donc pas utiliser les algorithmes de reconstruction développés pour la TDM (*p.ex.* ceux basés sur la transformée de Radon). Elle en nécessite donc des différents.

Brièvement, le scanner *TomOptUS* utilise un laser pulsé émettant des impulsions picosecondes (on peut aussi le configurer pour que ce soit des impulsions femtosecondes) dans le PIR. Le faisceau du laser est incident sur un milieu diffusant (petit animal) dans lequel on a préalablement injecté un agent fluorescent (tout ceci sera détaillé au chapitre 6). Lorsque l'agent fluorescent absorbe la lumière laser d'excitation, il réémet de la lumière à une longueur d'onde plus grande (section 2.2). Avec un système de détection optique sans contact, on capte la lumière fluorescente à plusieurs endroits autour du sujet. Avec

ce système et les algorithmes de localisation développés jusqu'à maintenant, il est possible de localiser jusqu'à 5 inclusions fluorescentes dans un cylindre [Pichette *et al.*, 2009].

Le présent travail est une suite des travaux de Vincent Robichaud (ancien étudiant à la maîtrise) qui a développé la 1<sup>ière</sup> génération du scanner *TomOptUS*. Cette dernière était encore loin d'être en mesure d'imager un petit animal vivant, principalement parce que le temps d'acquisition était trop long (5 à 10 h) étant donné l'utilisation d'un seul canal de détection optique. Aussi, ce canal permettait seulement des mesures dans une seule bande de longueur d'onde (qui avait été choisie pour l'imagerie par fluorescence).

## 1.2 Objectif global du projet de recherche

L'objectif de ce projet est le développement de la 2<sup>ième</sup> génération du scanner *TomOptUS*. Plus précisément, le projet porte principalement sur le développement optique et mécanique plus poussé du scanner qui permettra d'utiliser un plus grand nombre de détecteurs pouvant capter simultanément deux bandes de longueur d'onde (imagerie intrinsèque et par fluorescence). Les objectifs secondaires sont exposés au chapitre 5.

## 1.3 Contributions originales

Ce travail comporte une partie de conception optique afin, notamment, de miniaturiser les canaux de détection et d'augmenter le pouvoir de captation de la lumière par rapport à la 1<sup>ière</sup> version. Le groupe *TomOptUS* n'a pas beaucoup de connaissances en conception optique. Mon rôle sera entre autre d'apporter ces connaissances.

## 1.4 Plan du document

Au chapitre 2, on présente d'abord des notions de base sur la TOD et ensuite, on fait une revue des différents systèmes en TOD pour mieux comprendre et situer le scanner *TomOptUS* au sein de la communauté scientifique. Le chapitre 3 expose des notions de conception optique qui ont été nécessaires au présent projet étant donné qu'une partie importante de ce projet a trait aux canaux de détection optique. Le chapitre 4 fait la revue des qualités et défauts de la 1<sup>ière</sup> génération du scanner *TomOptUS* tel qu'il était au tout début de ce présent projet. À partir de cela, on définit de façon détaillée au chapitre 5 les objectifs poursuivis dans la réalisation de la 2<sup>ième</sup> génération du scanner *TomOptUS*. Le scanner ainsi réalisé est décrit au chapitre 6 sous forme d'un article qui a été soumis à

la revue *Review of Scientific Instruments*). Finalement, on conclut le présent ouvrage au chapitre 7. On y énumère notamment les avenues pour les travaux futurs concernant le scanner *TomOptUS*.

# CHAPITRE 2

## ÉTAT DE L'ART.

Ce projet de recherche porte sur la conception opto-mécanique d'un scanner à canaux de détection dans deux bandes de longueur d'onde pour TOD sans contact avec mesures dans le domaine temporel. Pour mieux comprendre le projet et son contexte, on décrit tout d'abord la physique derrière le phénomène d'absorption et de diffusion dans un milieu diffusant. On parle ensuite du principe de la fluorescence. On expose aussi les différentes géométries possibles de scanners en TOD pour mettre en valeur l'importance d'un système à configuration circulaire en rétrodiffusion/transillumination. On poursuit avec une description détaillée des différents types de mesures utilisées : en régime continu et résolu en temps. On discute aussi de l'importance des mesures sans contact. Finalement, on fait une revue des différentes techniques utilisées dans la communauté scientifique. On s'attarde surtout aux montages expérimentaux des différents groupes de recherche oeuvrant en TOD pour l'imagerie sur petit animal.

### 2.1 L'absorption et la diffusion

On peut classer la propagation des photons à travers les tissus biologiques selon trois types de trajectoires : balistique, serpentine et diffuse (Fig. 2.1). Le photon balistique ne subit pas de diffusion et sa trajectoire est une ligne droite. Le photon serpentine subit de la diffusion, mais sa trajectoire reste près de la trajectoire balistique. Quant au photon diffus, il subit plusieurs diffusions de façon aléatoire, et ce, dans toutes les directions, avant d'être détecté. Il est donc impossible d'en connaître la trajectoire exacte.

La détection résolue en temps permet de distinguer ces trois types de photons par fenêtrage temporel étant donné qu'ils arrivent à des temps différents ; les techniques utilisant de la lumière continue (*continuous wave - CW*) ne permettent pas une telle distinction et sont sujettes à un bruit de fond diffus important [Das *et al.*, 2003]. Dans les tissus biologiques, une impulsion laser verra typiquement sa largeur temporelle augmenter (dispersion temporelle) de l'ordre de 1 ns par centimètre parcouru. Des impulsions d'excitation dans le régime picoseconde sont en pratique assez courts temporellement pour les échelles de temps des phénomènes impliqués.

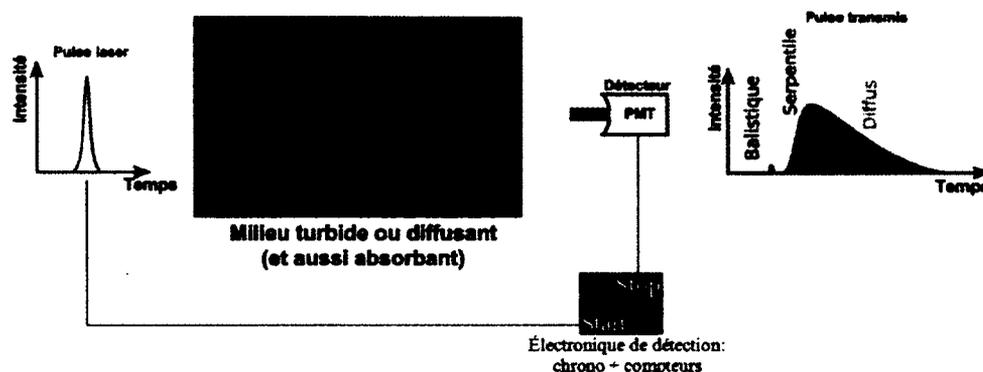


Figure 2.1 Trajectoire des photons dans un milieu biologique. La lumière est fortement diffusée par les tissus.

Pour s'affranchir de la diffusion qui réduit la résolution spatiale en imagerie optique, le plus intéressant serait d'exploiter les photons balistiques. Ceci permettrait d'utiliser les algorithmes de la tomographie par rayons X et la résolution spatiale serait élevée. Malheureusement, les photons balistiques sont trop peu nombreux et donc, perdus dans le bruit de l'appareillage<sup>1</sup>. Il faut donc composer avec la diffusion en imagerie optique. Pour ce qui est des photons diffus, ne connaissant pas leur trajectoire exacte, on en tire relativement peu d'information. Pour cette raison, beaucoup d'intérêt a été porté sur la détection des photons serpentiles étant donné qu'ils sont suffisamment nombreux pour être détectés et que leurs parcours dans le milieu sont les plus près de la ligne droite. Ceci dit, on ne connaît pas les trajectoires individuelles exactes empruntées par chacun de ces photons, celles-ci étant aléatoires. Il y a donc des limites en termes de résolution spatiale même avec les photons serpentiles. Une approche développée dans notre groupe, qui sera discutée dans le chapitre 6 pour la localisation d'agents fluorescents à l'intérieur d'un milieu diffusant/absorbant est d'utiliser les photons serpentiles. Nous avons d'ailleurs montré une relation de quasi-linéarité entre le temps d'arrivée des premiers photons et la profondeur d'une inclusion fluorescente [Bérubé-Lauzière et Robichaud, 2007], ce qui permet une localisation spatiale d'inclusions fluorescentes discrètes [Pichette *et al.*, 2009].

En imagerie des tissus biologiques, on travaille généralement dans le PIR dans la fenêtre dite "thérapeutique" allant de 650 nm à 1000 nm, car c'est dans cette plage que l'absorption des tissus est la moindre. La diffusion est l'obstacle le plus important en tomographie optique. La longueur de pénétration du PIR peut aller jusqu'à 10 cm dans les tissus mous (p. ex. comme dans les tissus adipeux du sein). Par comparaison, dans le visible, la lumière est presque totalement absorbée après seulement quelques millimètres. On peut

<sup>1</sup>Statistiquement le temps d'attente avant de pouvoir détecter un seul de ces photons serait de plusieurs années!

utiliser la source d'excitation en régime continu, modulé ou pulsé comme il sera discuté plus bas. L'atténuation à travers un milieu diffusant/absorbant est donnée par la formule de Beer-Lambert

$$I(x) = I_0 e^{-(\mu_a + \mu_s)x}, \quad (2.1)$$

où  $I_0$  représente l'intensité initiale,  $x$  est la position le long d'une direction dans le milieu,  $\mu_a$  et  $\mu_s$  sont les coefficients d'absorption et de diffusion [Wang et Wu, 2007]. L'absorption dans les tissus biologiques est principalement causée par l'hémoglobine, la mélanine et l'eau (Fig. 2.2).

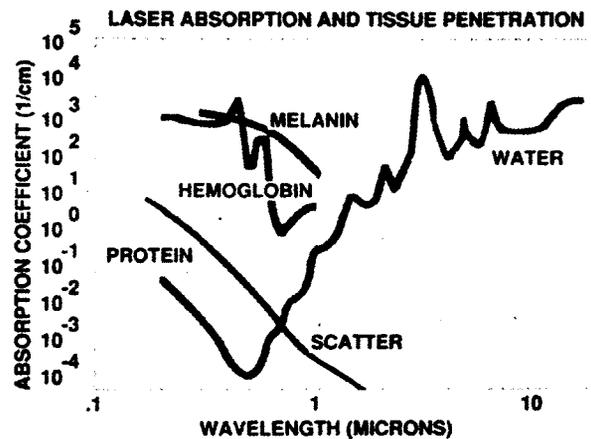


Figure 2.2 Coefficient d'absorption des principaux absorbants biologiques dans les tissus en fonction de la longueur d'onde (adapté de [Wang et Wu, 2007]).

## 2.2 La fluorescence

La fluorescence (Fig. 2.3) est la propriété que possèdent certaines particules (atomes et molécules) à absorber de la lumière à une longueur d'onde particulière et de réémettre l'énergie ainsi absorbée sous forme lumineuse à une autre longueur d'onde plus grande (décalage de Stokes; inévitable pour ne pas violer le principe de conservation de l'énergie) [Lakowicz, 2006]. Un photon incident sur la particule est absorbé avec une certaine probabilité (appelée rendement quantique - *quantum yield* - qui est l'efficacité à convertir un photon incident en un photon qui sera fluorescé). En cas d'absorption, un électron dans la particule passe dans un état excité. La fluorescence apparaît lorsqu'un électron qui se trouve dans un niveau d'énergie excité instable retourne à son état fondamental.

Cela se produit en deux étapes. La première est une transition non-radiative rapide et peu énergétique vers un état métastable. Ensuite, il y a une transition plus importante en énergie vers le niveau fondamental produisant un photon de fluorescence.

D'un point de vue temporel, par opposition au point de vue spectral qui vient d'être exposé, si on excite un échantillon contenant plusieurs particules fluorescentes avec une impulsion laser ultra-brève de longueur d'onde appropriée, l'échantillon émettra de la lumière dont l'intensité décroîtra de façon exponentielle avec le temps. Le temps moyen caractéristique de cette décroissance est appelé temps de vie de fluorescence (TVF). Il représente le temps moyen que la particule passe dans son état métastable avant de retourner à l'état fondamental. Typiquement, pour les fluorophores utilisés en imagerie optique, les temps de vie sont de l'ordre de la demi-nanoseconde à quelques nanosecondes. Le TVF peut dépendre de paramètres biochimiques environnant au fluorophore, dont p.ex. du pH, de l'oxygénation, de la concentration de glucose, *etc* [Cubeddu *et al.*, 2002; Lakowicz, 2006]. Cette dépendance a le potentiel d'éventuellement permettre d'évaluer quantitativement la concentration d'analytes et de détecter la présence de tissus malins *in vivo*. Cette possibilité est déjà exploitée à petite échelle spatiale en microscopie [Van Munster et Gadella, 2005; Suhling *et al.*, 2007].

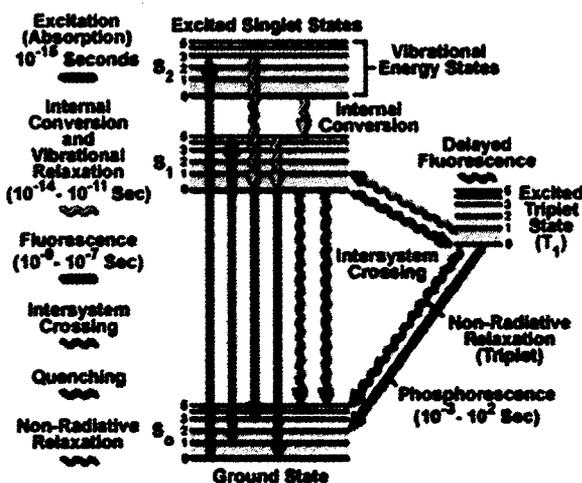


Figure 2.3 Diagramme de Jablonski (Principe de la fluorescence) [Olympus, 2010a].

Un fluorophore communément utilisé en imagerie biomédicale optique dû à son faible coût est l'*indocyanine green (ICG)*, aussi appelé *cardio-green*. L'*ICG* est un composé approuvé pour des applications chez l'humain par la *Food and Drug Administration (FDA)* des États-Unis. C'est ce fluorophore que l'on utilise dans nos expériences. Cependant, sa photodégradation rapide, sa dégradation thermique et sa faible solubilité dans l'eau limite son

utilisation en imagerie. Pour améliorer l'efficacité de cet agent de contraste certains le dopent avec des lipides (nanoparticules) [Navarro *et al.*, 2009]. L'*ICG* a un pic d'absorption maximale à 780 nm et un pic d'émission maximale à 830 nm.

## 2.3 Géométries de scanners

Il existe plusieurs configurations de sources/détecteurs possibles pour l'imagerie intrinsèque en absorption et en diffusion (*i.e.* pas d'utilisation d'agents fluorescents) et l'imagerie par fluorescence (voir les articles de revue [Pogue *et al.*, 1999; Leblond *et al.*, 2009]).

### 2.3.1 Imagerie intrinsèque

L'imagerie intrinsèque permet d'obtenir la distribution spatiale des coefficients d'absorption et de diffusion dans les tissus biologiques. Pour ce type d'imagerie, on doit capter la lumière d'excitation. On retrouve donc des configurations qui utilisent : 1) la rétrodiffusion (sources et détecteurs du même côté), 2) la transillumination (sources d'un côté et détecteurs de l'autre) et 3) la rétrodiffusion/transillumination (Fig. 2.4). Il est possible d'implanter ces configurations de façon linéaire (où le module (ou bloc) sources/détecteurs est translaté linéairement devant le milieu) ou circulaire (où le bloc sources/détecteurs tourne autour du milieu).

En mode rétrodiffusion, l'information des photons ayant traversé les tissus est perdue tandis qu'en mode transillumination on perd l'information des photons rétrodiffusés. Dans un cas comme dans l'autre, on obtient un faible rapport signal sur bruit (*signal to noise ratio* - *SNR*) si l'inclusion est située près de la surface opposée des détecteurs où loin de la source d'excitation.

### 2.3.2 Imagerie par fluorescence

En imagerie par fluorescence faisant usage d'un traceur fluorescent (Fig. 2.5), ce sont les mêmes enjeux que dans l'imagerie par absorption et diffusion qui se présentent. Lorsque l'agent fluorescent absorbe la lumière d'excitation, il agit par la suite comme une source secondaire émettant de façon uniforme dans toutes les directions. Il devient donc important de capter cette lumière tout autour du milieu pour la localisation de fluorescence.

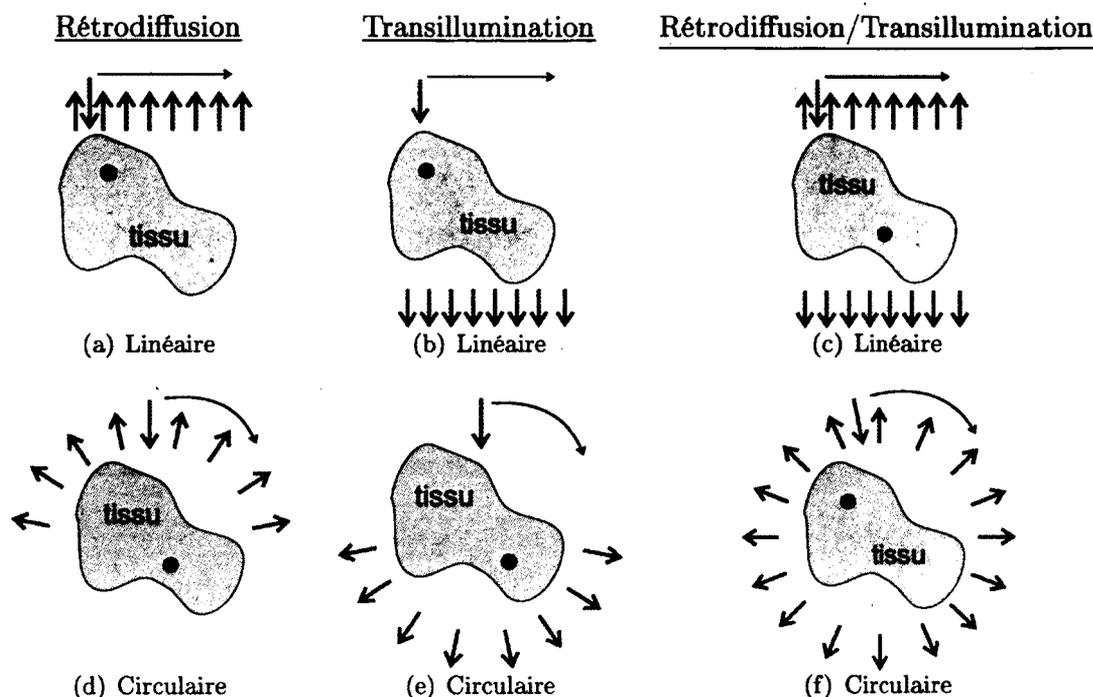


Figure 2.4 Illustration de géométries possibles de scanners avec une inclusion qui pourrait représenter la présence de tissus malins (adapté de *Pogue et al.* [Pogue et al., 1999]). La source d'excitation est représentée par les flèches entrant dans le milieu tandis que la position des détecteurs est représentée par les flèches sortant du milieu (adapté de [Robichaud, 2007]).

### 2.3.3 L'excitation

Pour un système à géométrie annulaire, il y a plusieurs façons d'illuminer le sujet sous plusieurs angles (Fig. 2.6) : on peut faire tourner une source autour de l'objet, on peut aussi faire tourner l'objet sur lui-même et, finalement, il y a aussi la possibilité d'utiliser plusieurs sources fixes activées à tour de rôle. L'excitation lumineuse est généralement produite par un ou des laser(s). Les diodes lasers ou les lasers Ti :Sapphire sont très populaires.

### 2.3.4 La détection

La détection, tout comme l'excitation, peut être effectuée sous différentes configurations. Il y en a deux typiques : 1) plusieurs détecteurs individuels disposés autour de l'objet formant un anneau ou 2) un bloc-détecteur (*i.e.* un regroupement de détecteurs recouvrant seulement une partie de l'objet) que l'on bouge. Dans le cas du bloc-détecteur, on doit le faire tourner pour avoir des mesures sur 360° autour de l'objet, contrairement à

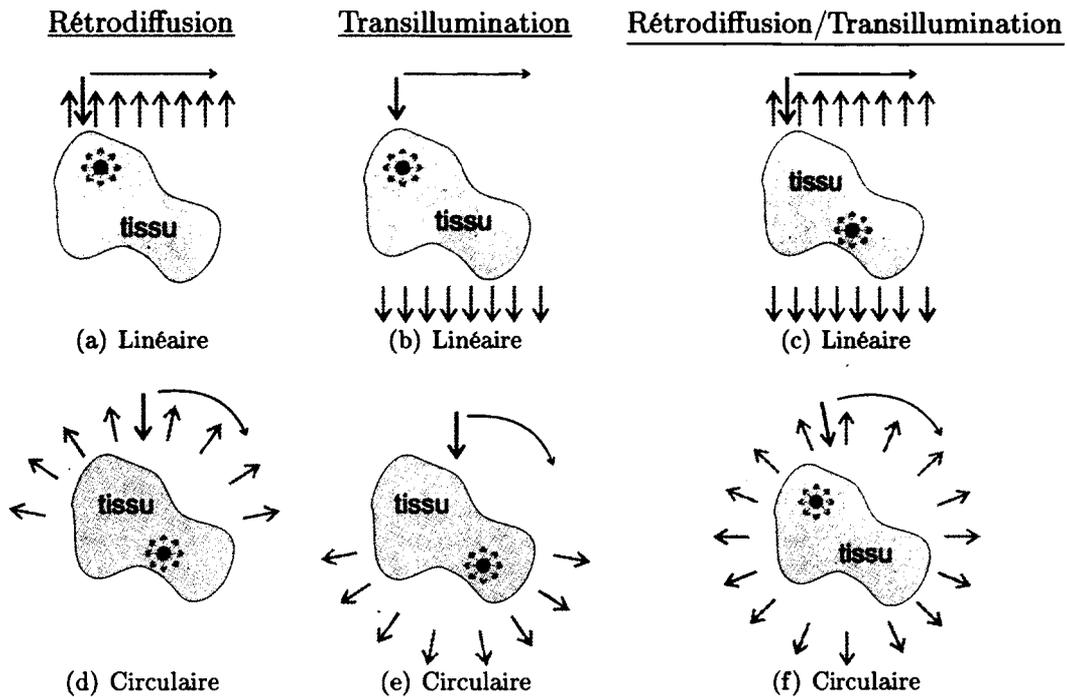


Figure 2.5 Reprise de la Fig. 2.4 représentant cette fois-ci une inclusion fluorescente (adapté de [Robichaud, 2007]).

la configuration en anneau. Cependant, cela entraîne un temps d'acquisition plus long. Les détecteurs peuvent être des tubes photomultiplicateurs (*photomultiplier tube - PMT*), des photodiodes, des photodiodes à avalanche (*avalanche photodiode - APD*), des caméras *CCD* (*charge-coupled-device*) ou encore des caméras à balayage ultra-rapide (*streak camera*). Le choix du détecteur dépend du type de mesure effectuée qui sera maintenant discuté.

## 2.4 Types de mesures en TOD

Il y a plusieurs approches de mesures en TOD. Chacune de ces approches a des avantages et des inconvénients que ce soit au niveau de la résolution spatiale, la sensibilité, les coûts (en composantes et en développement), *etc*. Dans ce qui suit, on traitera des systèmes à régime continu et des systèmes résolus en temps et de l'importance des mesures sans contact avec le sujet à imager.

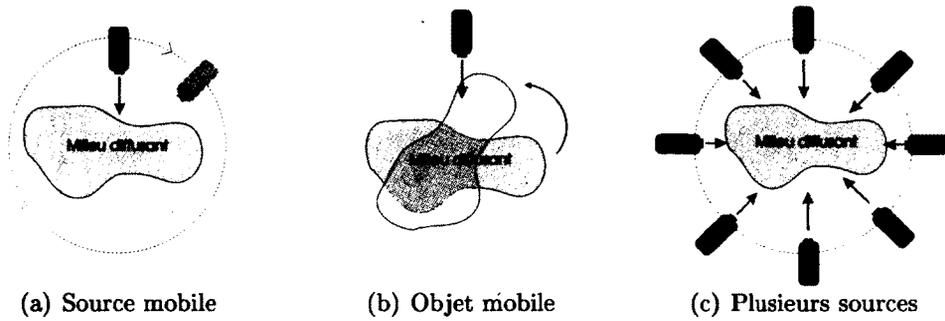


Figure 2.6 Configurations typiques concernant l'excitation lumineuse [Robichaud, 2007].

### 2.4.1 Systèmes à régime continu

Les mesures *CW* consistent à mesurer l'atténuation de la lumière d'excitation et/ou de la fluorescence transmise et/ou rétrodiffusée suite à l'illumination du sujet à l'aide d'une source lumineuse continue. Le système *CW* est le plus simple et le moins dispendieux à réaliser comparé aux autres systèmes en TOD. La source d'excitation généralement utilisée est une diode laser et la détection se fait à l'aide de photodiodes [Schmitz *et al.*, 2002] ou d'une caméra *CCD* refroidie et très sensible [Schulz *et al.*, 2005].

Les mesures en intensité seulement et à une seule longueur d'onde ne permettent pas de distinguer l'effet d'absorption de la diffusion [Arridge et Lionheart, 1998]. Pour remédier à ce problème, on doit sonder l'objet à plusieurs longueurs d'ondes. Les principales applications des systèmes *CW* portent sur l'étude des modifications hémodynamiques et d'oxygénation des tissus superficiels ainsi que l'étude des régions du cortex cérébral [Gibson *et al.*, 2005]. Les mesures résolues en temps ont *a priori* des avantages par rapport aux mesures *CW* lorsque 1) le TVF est court et 2) le milieu est peu absorbant, mais 3) très diffusant [Ducros *et al.*, 2008].

### 2.4.2 Systèmes résolus en temps

Deux approches sont possibles pour réaliser des mesures résolues en temps : directement dans le domaine temporel (*time-domain* - *TD*) ou dans le domaine fréquentiel (*frequency-domain* - *FD*). Ces deux approches sont reliées par la *transformée de Fourier*.

#### Mesures dans le domaine fréquentiel

Dans le domaine fréquentiel, on illumine le sujet à imager avec une source lumineuse modulée en intensité dans la gamme des radiofréquences. La lumière qui ressort de l'objet

(que ce soit de la lumière à la longueur d'onde d'excitation, ou de la fluorescence) est à la même fréquence de modulation, mais avec une amplitude différente et un changement dans sa phase (dans le cas de la lumière à la même longueur d'onde que l'excitation ce changement de phase dépend des propriétés optiques du milieu alors que pour la fluorescence, cela dépend du TVF) (Fig. 2.7). La mesure consiste donc à obtenir l'atténuation en amplitude et le changement de phase et ce, à l'aide d'un détecteur rapide et un oscillateur de radiofréquence.

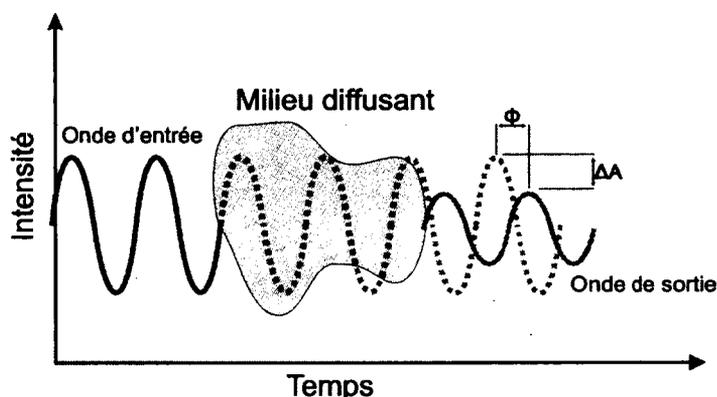


Figure 2.7 Mesure dans le domaine fréquentiel [Robichaud, 2007].

Habituellement, la source lumineuse utilisée est une diode laser dont l'intensité est modulée par un oscillateur générant un signal radiofréquence. Dépendamment de la sensibilité désirée, on peut utiliser des *PMTs*, des photodiodes [Hielscher *et al.*, 2002] ou encore des caméras *CCD* à gain modulé [Roy *et al.*, 2005] comme détecteurs.

#### Mesures dans le domaine temporel

Dans ce type de mesures, on reconstruit directement la distribution temporelle (*time point-spread function* - *TPSF*) des photons ayant voyagé à travers du milieu diffusant. Cette courbe peut être mesurée par une caméra à balayage ultra-rapide (*streak camera*), ou par comptage de photons corrélé en temps (*time-correlated single photon counting* - *TCSPC*). Cette dernière technique détecte un à un les photons pour reconstruire de façon statistique leur distribution temporelle pour un phénomène optique dépendant du temps [Becker, 2010 (4th Ed.)]. La fluorescence est un bon exemple pour expliquer le *TCSPC*.

Considérons un agent fluorescent excité par un train d'impulsions lasers (Fig. 2.8 a)). En principe, avec un détecteur suffisamment rapide, on pourrait mesurer un signal de fluorescence décroissant pour chaque impulsion laser (*i.e.* dans chaque période)(Fig. 2.8 b). De tels détecteurs existent (*streak cameras* avec des résolutions pouvant atteindre 300 fs), mais ils sont très dispendieux et fragiles [Zint *et al.*, 2003]. En *TCSPC*, on capte

plutôt, pour chaque impulsion laser d'excitation, un seul photon (Fig. 2.8 c)<sup>2</sup>, dont le temps d'arrivée suite à l'impulsion est aléatoire, mais doit néanmoins suivre la distribution de probabilité du phénomène physique observé (p.ex. une décroissance exponentielle dans le cas de la fluorescence). Le temps d'arrivée de chacun des photons suivant son impulsion laser respective est comptabilisé dans un histogramme enregistré dans une mémoire, en additionnant '1' à la case mémoire correspondant à un petit intervalle de temps (*time bin*) dans lequel est inclus le temps d'arrivée mesuré. Le laboratoire *TomOptUS* a utilisé jusqu'à présent deux types de détecteurs pour capter les photons : des *PMTs* et des *APDs* en mode Geiger [Bérubé-Lauzière et Robichaud, 2007].

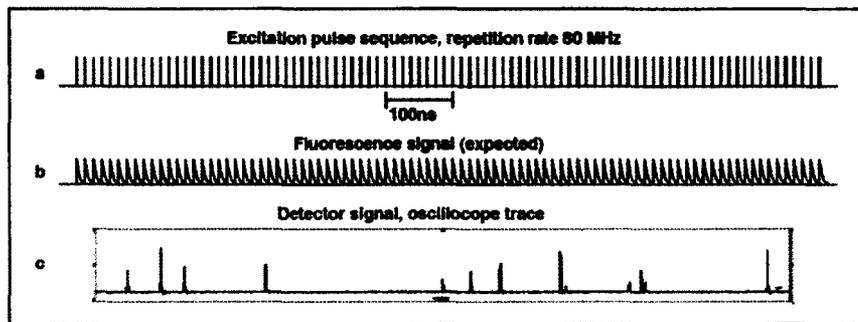


Figure 2.8 Signal de la fluorescence pour des impulsions lasers à 80 MHz [Becker, 2010 (4th Ed.).

Après un nombre suffisant de cycles lasers, on aura accumulé assez de photons pour reconstruire de façon statistiquement fiable la courbe de distribution des temps d'arrivée des photons (Fig. 2.9) appelée *time point-spread function (TPSF)* de façon générale et *fluorescence TPSF (FTPSF)* dans le cas particulier de la fluorescence.

### 2.4.3 Mesures sans contact

La majorité des systèmes en TOD utilisent des mesures avec contact. On parle ici de fibres optiques ou d'usage d'un fluide adaptateur. L'utilisation de fibres optiques n'est pas commode, car un nombre limité de fibres peut être placé sur le sujet à imager entraînant

<sup>2</sup>En réalité, pour des raisons techniques (temps morts dans l'électronique de *TCSPC*), moins de 1 photon est détecté par impulsion laser, typiquement 1/100, ce qui signifie qu'il faut en moyenne 100 impulsions laser pour détecter un photon [Becker, 2010 (4th Ed.). La raison de si faibles rapports de comptage est pour s'assurer que la probabilité de détecter 2 photons pendant une période laser soit négligeable. Ceci est nécessaire dû aux temps morts dans l'électronique qui a besoin d'un certain temps pour traiter la détection d'un photon. Ainsi, si un second photon arrive pendant ce temps mort, l'électronique ne le verra jamais. Ceci introduirait un biais dans la courbe temporelle mesurée ; elle serait déformée vers les temps plus courts. Toutefois, aux fins de l'explication, il est plus simple de considérer qu'on a 1 photon par impulsion laser et ensuite de discuter des technicalités comme il a été fait ici.

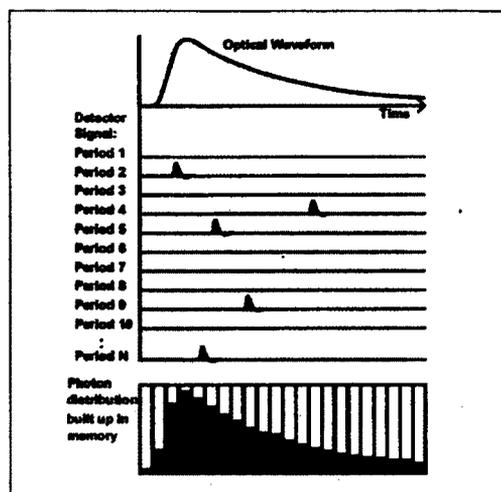


Figure 2.9 La *TPSF* est un histogramme des temps d'arrivée de photons mesurés par le système de comptage de photons [Becker, 2010 (4th Ed.)].

ainsi une insuffisance de signal capté. Aussi, il est difficile d'accéder à des géométries complexes. Il est aussi difficile de coupler les tissus avec les optodes. La fabrication de fibres optiques est difficile et donc dispendieuse. Par ailleurs, c'est inconfortable pour le patient à imager. L'utilisation d'un fluide adaptateur dans lequel on immerge l'animal introduit davantage d'absorption et de diffusion inutile. Cela dégrade le *SNR* et la résolution. Quant à elle, la méthode sans contact facilite la prise de mesure et pourrait s'intégrer avec d'autres modalités d'imagerie sans contact comme la TDM, TEP et l'IRM [Gibson *et al.*, 2005].

## 2.5 Systèmes de TOD existants

Pour mieux situer les présents travaux, il est opportun de présenter une revue des systèmes développés en TOD par différents groupes. Une telle revue a déjà été faite par Vincent Robichaud qui a fait sa maîtrise au sein de notre groupe [Robichaud, 2007]. On ne répétera pas pas ici sa revue, mais plutôt, on décrira les nouveaux systèmes qui ont été développés, ou les améliorations qui ont été apportées aux systèmes existants. Rasmussen *et al.* énumère dans un tableau les différents groupes de recherche faisant de la TOD sur petits animaux [Rasmussen *et al.*, 2006]. Beaucoup utilisent des mesures en régime continu et peu en font dans le domaine fréquentiel ou temporel. Pogue *et al.* font une revue très détaillée des systèmes, des méthodes et des applications de la TOD par fluorescence [Leblond *et al.*, 2009].

### 2.5.1 Systèmes de *VisEn Medical*

La plus récente version du système tomographique pour petit animal de *VisEn Medical* est le *FMT 2500™LX* (Fig. 2.10). Ce système est sans contact et fait des mesures *CW* en transillumination utilisant une caméra *CCD* refroidie. Quatre diodes lasers émettant à 635 nm, 670 nm, 745 nm et 790 nm servant à illuminer le sujet. La sélection en longueur d'onde captée par la caméra *CCD* se fait à l'aide d'une roulette contenant plusieurs filtres optiques. Une carte d'absorption et de fluorescence est obtenue à partir de 10 000 à 100 000 positions de sources/détecteurs.

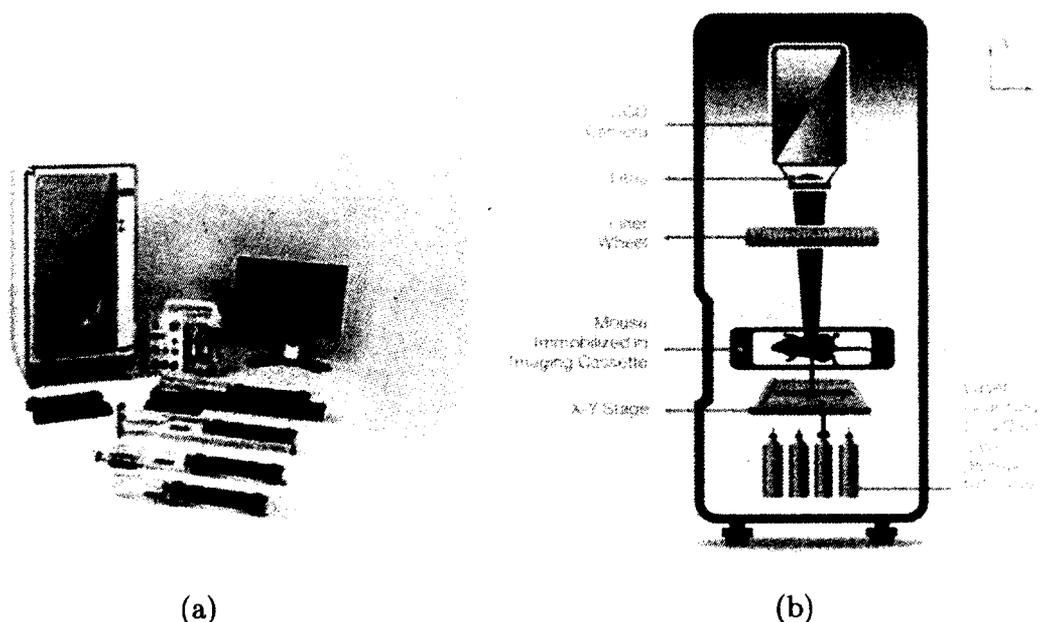


Figure 2.10 a) Système tomographique de *VisEn Medical* - *FMT 2500™LX*. b) Schémas de l'intérieur du système [ *VisEn Medical*, 2010].

*VisEn Medical* vise beaucoup sur l'imagerie multimodale. À cet effet, la souris est anesthésiée et placée dans une cassette pouvant s'adapter à d'autres modalités d'imagerie (TDM, TEP, IRM ou tomographie d'émission monophotonique - TEM). Il est donc possible d'avoir des images anatomiques et fonctionnelles dans un même ensemble de données (Fig. 2.11). De plus, la cassette contenant la souris est montée sur un plateau de rotation permettant ainsi plusieurs projections angulaires. Le fait d'avoir plusieurs lasers et une roulette contenant plusieurs filtres donne la possibilité d'imager plusieurs fluorophores.



Figure 2.11 Image multimodale FMT-TDM ; Quantification de la vascularisation tumorale et l'activité cathepsine en cancer du poumon [Weissleder et Pittet, 2008].

### 2.5.2 Système de *Cambridge Research & Instrumentation, Inc (CRI)*

*Cambridge Research & Instrumentation, Inc. (CRI)* vient tout juste de sortir le *Maestro Dynamic* (Fig. 2.12). La caractéristique supplémentaire comparativement à la version antérieure, le *Maestro 2*, est qu'il permet d'acquérir en fonction du temps des images de réactifs fluorescents et d'anticorps marqués fournissant ainsi des données quantitatives sur la biodistribution temporelle des marqueurs fluorescents (Fig. 2.13). C'est un système d'imagerie *CW* planaire en transillumination utilisant une caméra *CCD* refroidie. La distribution de fluorescence est donc en 2D et est ensuite superposée à une image de l'animal.

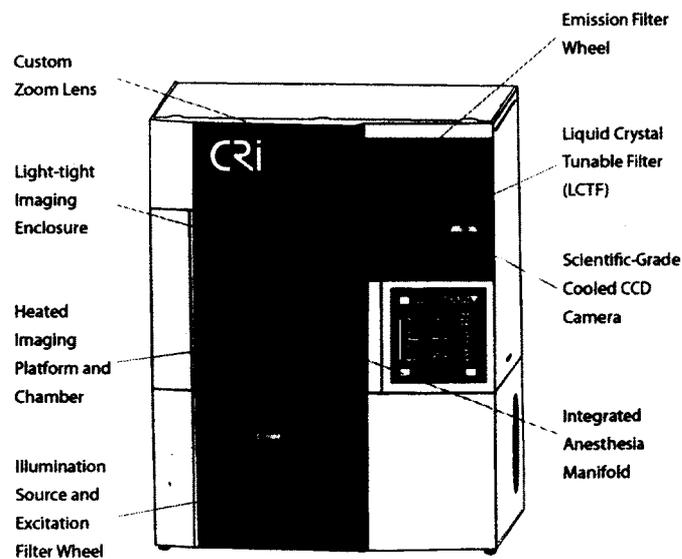


Figure 2.12 Schéma opto-mécanique du *Maestro 2* vue de l'intérieur [*Cambridge Research & Instrumentation, 2010*].

Dans ce système, il y a un filtre à cristaux liquides accordable (FCLA) pour sélectionner la longueur d'onde de détection désirée. Un FCLA typique est construit à partir d'un empilement de cristaux liquides biréfringents et de polariseurs linéaires. La région spectrale du FCLA dépend du choix des polariseurs, des revêtements optiques, et les caractéristiques des cristaux liquides [Olympus, 2010b].

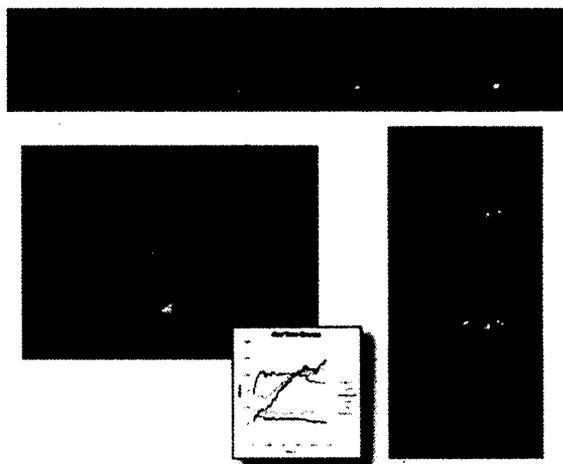


Figure 2.13 Série chronologique d'images montrant la distribution des anticorps IgG marqués en fluorescence après injection dans une souris [Cambridge Research & Instrumentation, 2010].

### 2.5.3 Système de *Advanced Research Technologies Inc. (ART)*

L'appareil *eXplore Optix* de la compagnie *Advanced Research Technologies (ART)*, St-Laurent, Qc, Canada) a été le premier appareil d'imagerie pour petit animal commercialisé utilisant des mesures dans le domaine temporel. En septembre 2009, *ART* a lancé la nouvelle génération de son système d'imagerie moléculaire, le *Optix MX3* (Fig. 2.14), au *World Molecular Imaging Congress 2009*. Les nouvelles fonctionnalités qui ont été ajoutées sont la capacité d'obtenir l'image des protéines fluorescentes rouges et des points quantiques.

De plus, l'ajout de 4 sources d'excitations pulsées permet l'imagerie de plusieurs fluorophores (Fig. 2.15). Les longueurs d'onde disponibles sont : 470 nm, 635 nm, 665 nm, 735 nm et 785 nm. Le détecteur utilisé est un *PMT* couplé à un système *TCSPC*. Par ailleurs, une caméra et un générateur de ligne laser sont insérés dans le système pour obtenir la topographie 3D de la souris. Le plateau de translation en 3D permet de déplacer le point d'illumination et de captation. L'appareil est sans contact avec l'animal et utilise la confi-

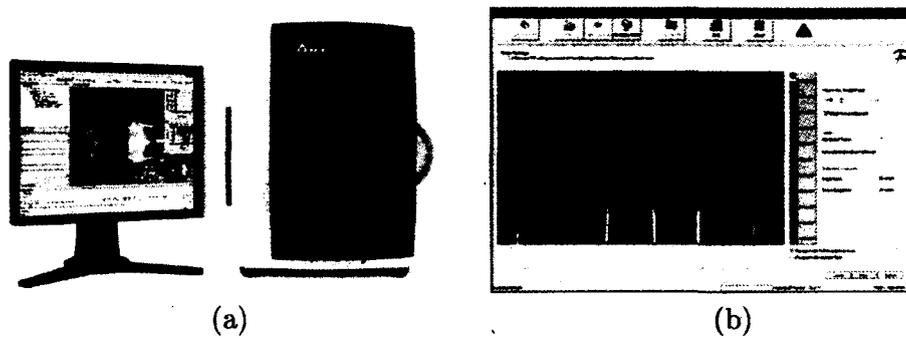


Figure 2.14 a) Système d'imagerie *Optix MX3* de ART. b) Images obtenues avec ce système [Advanced Research Technologies, 2010].

guration rétrodiffusion en mode linéaire. En fait, aucune projection angulaire n'est faite. Ce système est donc limité dans sa capacité à imagier en profondeur.

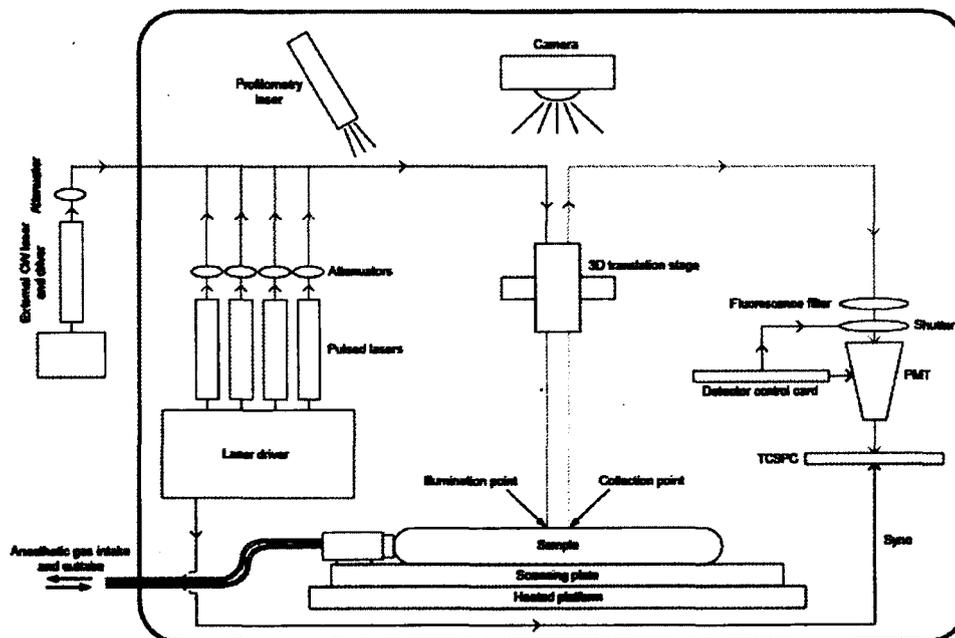


Figure 2.15 Schémas opto-mécanique du *Optix MX3* [Advanced Research Technologies, 2010].

#### 2.5.4 Système de Wooseok Ko

Le groupe de Wooseok Ko propose un système TOD non-invasif et sans contact pour imagier les vaisseaux sanguins avec une illumination *CW* dans le PIR [Ko *et al.*, 2007]. Un système TOD peut mesurer la distribution d'hémoglobine à l'intérieur des tissus en

mesurant la lumière PIR qui en ressort. C'est à l'aide de cette distribution en hémoglobine qu'il est possible de quantifier la grosseur et la densité des vaisseaux sanguins.

Le système comprend deux caméras *CCD* et deux systèmes de lentilles pour capter la lumière (Figure 2.16). La source d'excitation est une diode laser montée sur un moteur de rotation pour balayer le sujet à imager qui est placé à la focale du système optique. Une mire<sup>3</sup> faite de paraffine (coefficient de diffusion avoisinant celui des tissus humains) comprenant un tube cylindrique à l'intérieur contenant de l'Intralipide et de l'encre de Chine noir comme agent absorbant est utilisée pour valider le fonctionnement du système.

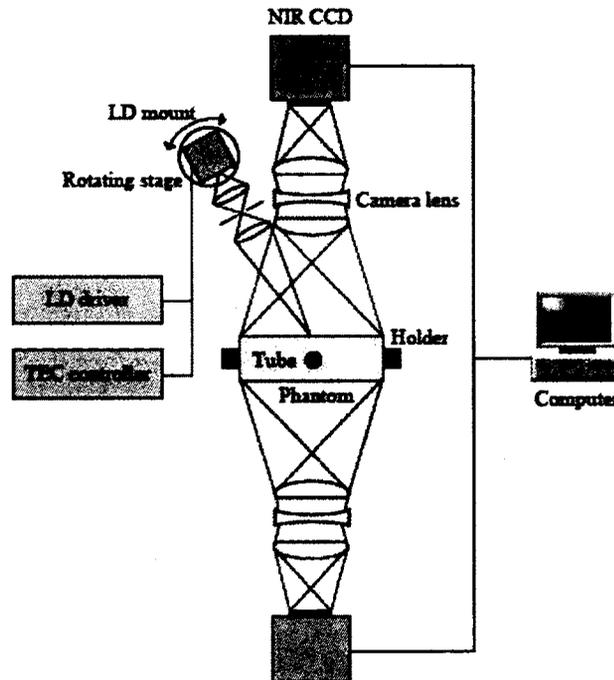


Figure 2.16 Système sans contact pour TOD en régime continu [Ko *et al.*, 2007].

### 2.5.5 Système de Poulet

Poulet et Montcel utilisent des fibres optiques pour diriger les impulsions lasers vers le sujet tandis que d'autres fibres optiques sont utilisées pour capter la lumière réémise par la fluorescence [Poulet et Montcel, 2006]. L'illumination du sujet se fait avec un système multicanal de diodes lasers émettant des impulsions picosecondes (de l'ordre de 50 ps). Ce système laser peut s'opérer en mode synchronisé ou en mode séquentiel.

<sup>3</sup>Une mire est un objet test synthétique mimant les propriétés optiques des tissus biologiques. Dans la littérature en anglais, le terme équivalent communément utilisé est "phantom".

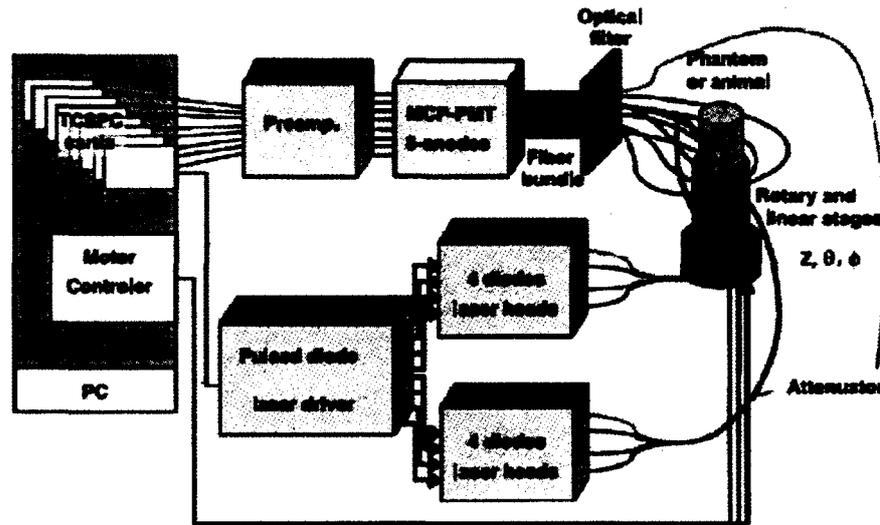


Figure 2.17 Système avec contact de Poulet [Poulet et Montcel, 2006]

Il y a 4 longueurs d'ondes disponibles : 690 nm, 785 nm, 830 nm et 870 nm. La détection se fait avec 8 PMTs. Les fibres optiques (pour l'émission et la détection) sont connectées sur deux tables tournantes pouvant tourner autour de l'animal. Avant de placer l'animal dans le scanner, les coordonnées de sa surface externe sont calculées via une technique holographique.

### 2.5.6 Système de Ntziachristos

Le groupe de Ntziachristos (*Massachusetts General Hospital - MGH - et Harvard*) a présenté un système (Fig. 2.18) en décembre 2008 utilisant les premiers photons transmis à travers l'animal pour s'affranchir de l'effet de la diffusion dans les tissus biologiques [Niedre *et al.*, 2008]. Pour ce faire, l'intensité des premiers photons est captée avec une caméra CCD à crénelage temporel ultra-rapide (*time-gated intensified CCD*) (LaVision, Picostar). L'imageur est synchronisé avec un laser femtoseconde (MaiTai, Spectra-Physics - opération : 732 nm, 100 fs, 80 MHz) et chaque image est prise pendant une porte temporelle après un délai fixe suivant l'impulsion laser. La sélection spectrale de la lumière laser (intrinsèque) et de lumière fluorescente est réalisée en utilisant un filtre interférentiel passe-bande de 10 nm centré à 740 nm (Andover) et un filtre passe-haut ayant un seuil à 770 nm (Andover) respectivement.

Le faisceau laser est translaté sur le sujet à l'aide d'une paire de miroirs dans un galvanomètre. La précision sur la position laser est de 30  $\mu\text{m}$ . La souris est placée dans un cylindre

de verre contenant un fluide adaptateur et sur un plateau de rotation pouvant tourner sur 360° .

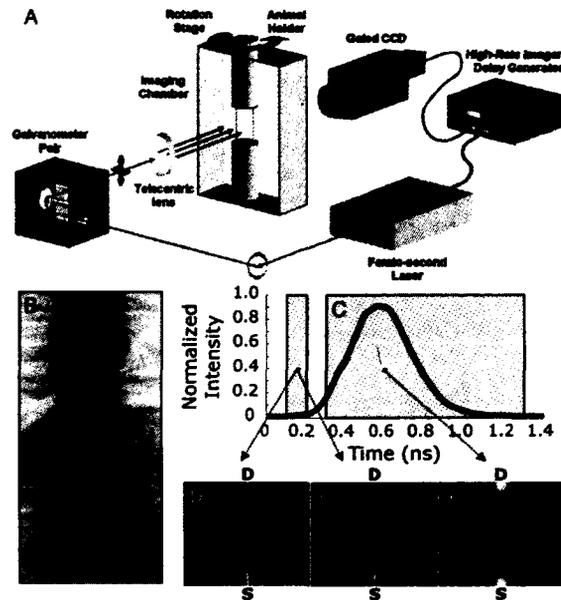


Figure 2.18 Système de Ntziachristos [Niedre *et al.*, 2008].

### 2.5.7 Système de Carson

Le groupe de Carson (Simon Fraser University, Colombie-Britannique, Canada) propose un système mesurant l'atténuation d'un agent absorbant en mode transillumination et un système mesurant la lumière émise par un agent fluorescent. Ces systèmes pourraient être utilisés dans un scanner en tomographie optique sur des tissus biologiques pour des mesures simultanées d'absorption et de fluorescence.

La méthode est d'utiliser un collimateur optique pour améliorer la qualité d'images en acceptant seulement les photons balistiques et serpentiles. La méthode de collimation, aussi dénotée par imagerie en domaine angulaire (*angular domain imaging - ADI*) est montrée à la Fig. 2.19. Le rapport de la longueur ( $L$ ) sur la largeur ( $w$ ) doit être assez grand pour réduire l'angle d'acceptance des photons. Le prisme est utilisé seulement pour des tests préliminaires pour estimer le bruit de fond afin d'améliorer la qualité de l'image.

Le système mesurant l'absorption en mode transillumination est représenté à la Fig. 2.20. Le faisceau laser (diode laser, Thorlabs Inc. - opération : 808 nm) a une divergence angulaire dans les deux axes. Cette divergence est corrigée à l'aide d'un système de collimation

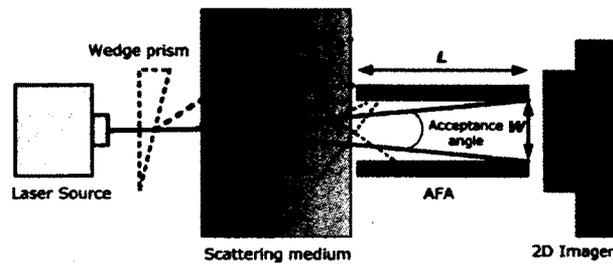


Figure 2.19 Système *ADI* en mode transillumination [Vasefi *et al.*, 2009].

à lentilles cylindriques. Le faisceau frappe le milieu diffusant avec un diamètre d'environ 1.3 cm. Le milieu diffusant peut tourner sur 360°.

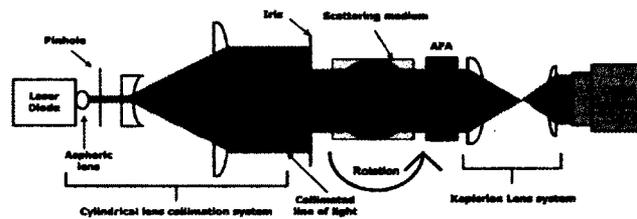


Figure 2.20 Système de tomographie optique en transillumination [Vasefi *et al.*, 2009].

Le système mesurant la fluorescence est représenté à la Fig. 2.21. Le principe de fonctionnement est pratiquement le même que le système précédent. Ici, un laser pulsé (PicoTA, PicoQuant - opération : 780 nm, 100 ps) et une caméra *CCD* (LaVision, Picostar) sont utilisés. De plus, l'utilisation de filtres est nécessaire pour bloquer la lumière laser.

### 2.5.8 Système de Sevick-Muraca

Le groupe de Joshi *et al.* a développé un système d'imagerie multimodale (Fig. 2.22). Ce système permet des mesures de TEP et/ou de TDM [Joshi *et al.*, 2008] ainsi que de l'imagerie optique en domaine fréquentiel utilisant une caméra *CCD* intensifiée. Plusieurs projections peuvent être prises en tournant la caméra *CCD* et la source PIR. L'animal est placé dans un lit pouvant se déplacer du système TDM/TEP au système d'imagerie optique. La Fig. 2.23 montre une image obtenue avec le système.

### 2.5.9 Système de Da Silva

Le groupe de Da Silva *et al.* a développé un système bimodal (Fig. 2.24) permettant l'acquisition de signaux fluorescents et de rayons X. Ce système permet d'obtenir des informations anatomiques et fonctionnelles *in vivo* simultanément. Une image anatomique

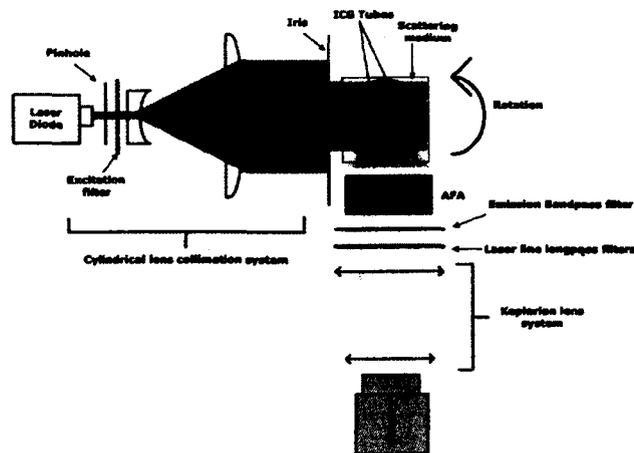


Figure 2.21 Système de tomographie optique en fluorescence [Vasefi *et al.*, 2009].

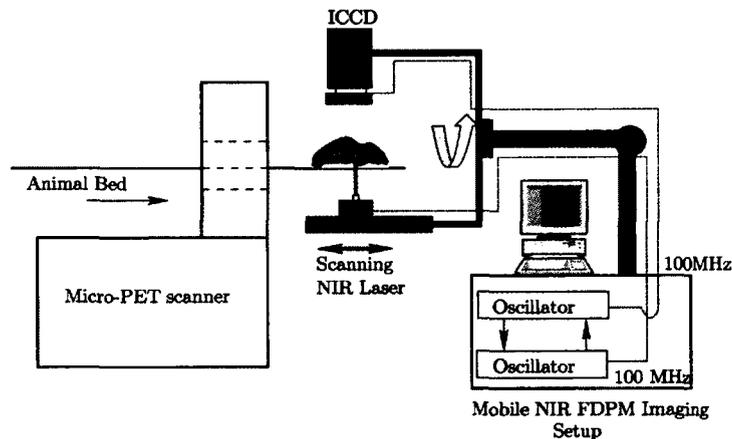


Figure 2.22 Système de Sevic-Muraca [Joshi *et al.*, 2008].

permet d'améliorer les reconstitutions des paramètres extraits à partir de mesures optiques, tels que la biodistribution des fluorophores, et de diminuer le temps de calcul en introduisant des contraintes spatiales [Da Silva *et al.*, 2009].

L'acquisition de signaux fluorescents se fait avec un laser (krypton, 753 nm) en mode *CW* couplé à une caméra *CCD*. L'animal est placé dans un cylindre contenant un fluide adaptateur. Ce cylindre est posé sur un plateau de rotation permettant plusieurs projections angulaires. Le générateur et le détecteur de rayons X sont placés perpendiculairement au système optique en fluorescence.

Le déplacement du cylindre pendant sa rotation et la déformation introduite par le système optique ont été mesurés et pris en compte pour la reconstruction. Pour ce faire, deux



Figure 2.23 Image multimodale TOD-TDM-TEP [Joshi *et al.*, 2008].

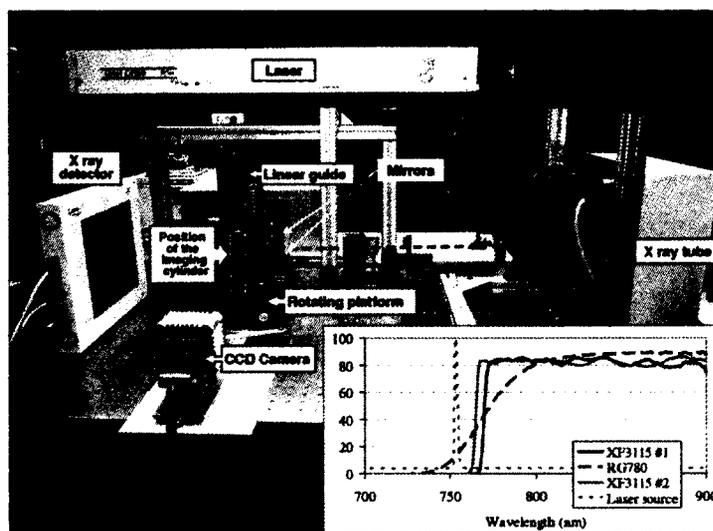


Figure 2.24 Système de Da Silva [Da Silva *et al.*, 2009].

techniques de calibration ont été exposées : optique et géométrique. La calibration optique consiste à déterminer la fonction de transfert entre un point lu sur la surface sensible de la caméra *CCD* et un point sur la surface du cylindre. La calibration géométrique caractérise les défauts du cylindre pendant qu'il tourne.

## 2.6 Résumé

De plus en plus de gens s'intéressent à l'imagerie multimodale [ *VisEn Medical*, 2010; Joshi *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2009] pour pouvoir fusionner des images anatomiques et

fonctionnelles. Les systèmes sans contact s'adapteront plus facilement à l'imagerie multimodale.

Pour notre système, on a choisi un système de détection par comptage de photons corrélés en temps et sans contact avec le sujet à imager. Aussi, on veut un système pouvant faire de l'imagerie intrinsèque et de l'imagerie par fluorescence simultanément. Ne sachant pas *a priori* où se trouve l'inclusion (absorbante ou fluorescente) dans le milieu, il appert donc qu'un système exploitant la lumière transmise et la lumière rétrodiffusée permettra d'obtenir un *SNR* plus élevé ce qui se traduira par la possibilité de sonder plus profondément les tissus tout en gagnant au niveau de la résolution spatiale des images pouvant être obtenues avec le scanner [Pogue *et al.*, 1999].

En général, les différents groupes de recherche ne discutent pas de façon détaillée la conception optique de leurs montages. Les travaux revus à la section 2.5 en sont des exemples. Ils se contentent de dire qu'ils ont utilisé une lentille mais pas laquelle exactement ou de faire un dessin qui n'est pas à l'échelle. On pourrait même se demander si le choix des composantes optiques utilisées est idéal et justifié. Trop peu de groupes modélisent (à l'aide d'un logiciel de conception optique) le trajet optique allant de la source à l'animal et de l'animal au détecteur. Dans ce qui suit, nous donnons quelques notions de conception optique nécessaires à la réalisation de la 2<sup>ième</sup> version du scanner *TomOpUS* (sujet de ce mémoire).

# CHAPITRE 3

## NOTIONS DE CONCEPTION OPTIQUE

De nos jours, les systèmes optiques sont conçus à l'aide de logiciels puissants dont les plus connus sont : *Code V*, *ZEMAX* et *OSLO*. De tels logiciels calculent des tracés exacts de rayons permettant ainsi de concevoir des systèmes de meilleure qualité, et ce, plus rapidement. Ce chapitre a pour objectif d'établir quelques notions de base en conception optique qui ont été utilisés dans la réalisation de la 2<sup>ième</sup> version du scanner *TomOptUS* faisant l'objet du présent mémoire.

### 3.1 Critères de conception

Le tableau 3.1 énumère les critères à prendre en compte lors de la conception d'un système optique. Pour une bonne conception, il faut premièrement, déterminer les paramètres du système ainsi que le système de lentilles. Un schéma global peut faire l'affaire. Deuxièmement, il faut choisir les puissances des éléments optiques, les matériaux, les épaisseurs et les espacements des éléments constituant le système, *etc*. Ces caractéristiques permettront de contrôler les aberrations, la distance focale effective, les distances de travail, le champ de vue, le diamètre des composantes, *etc*. Troisièmement, il faut ajuster les formes des éléments dans le but de corriger les aberrations principales (section 3.3). La dernière étape consiste en la réduction des aberrations à des niveaux acceptables.

### 3.2 Les lentilles

Il existe deux grandes classes de lentilles : les **lentilles convergentes** et les **lentilles divergentes**. De ces deux classes, on en distingue 6 types (Fig. 3.1) et elles sont composées de verre ou d'un matériau organique dont l'indice de réfraction est différent de celui du milieu dans lequel elles sont plongées.

Les lentilles à surface sphérique sont les plus simples à fabriquer et les moins dispendieuses comparativement aux lentilles à surface asphérique. Cependant, cela donne plus de difficulté aux concepteurs optiques, car elles donnent lieu à de multiples aberrations. Le choix de lentilles en stock des différentes compagnies se limite généralement à des lentilles plano-convexes et biconvexes (probablement équiconvexe). On peut considérer qu'une len-

Tableau 3.1 Liste des spécifications à prendre en compte lors de la conception d'un système optique (adapté de [Fischer *et al.*, 2008]).

Paramètres du système	Système de lentilles	Environnement
Distance objet	Nombre d'éléments	Température limite d'opération
Distance image	Verre vs plastique	Température limite hors fonction
Distance totale objet-image	Surfaces asphériques	Vibration
Longueur focale	Diffraction	Choc
Ouverture numérique	Revêtement	Condensation
Diamètre pupille d'entrée		Humidité
Longueur d'onde	<b>Senseur</b>	
Champ de vue	Type de capteur	
Grandissement	Diagonal	<b>Illumination</b>
Zoom	Nombre de pixel (horizontal)	Types de sources
Forme et dimension image	Nombre de pixel (vertical)	Puissance
	Pas de perçage (horizontal)	
<b>Performance optique</b>	Pas de perçage (vertical)	<b>Radiométrie - Source</b>
Transmission	Fréquence de Nyquist	Illumination relative
Illumination relative (Vignettage)		Méthode d'illumination
Énergie encerclée	<b>Emballage</b>	Images fantômes
Fonction de transfert de modulation	Distance total objet-image	
Distorsion	Location/dimension des pupilles d'entrée/sortie	<b>Radiométrie - image</b>
Courbure de champ	Longueur focale arrière	Transmission
	Diamètre maximum	Illumination relative
	Longueur maximum	Atténuation lumière parasite
	Poids	

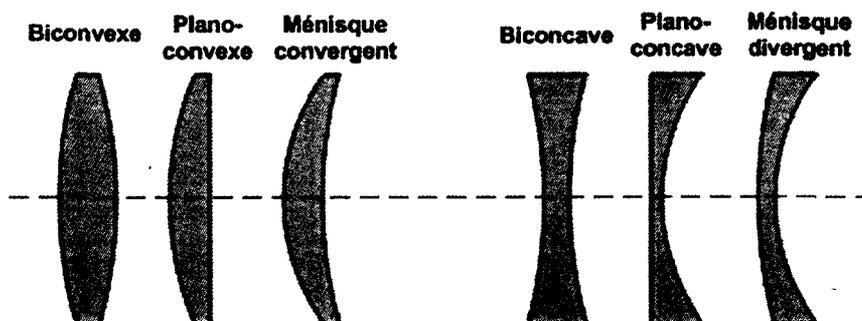


Figure 3.1 Les types de lentilles.

tille est plano-convexe si le rayon de courbure d'une des surfaces est beaucoup plus élevé que l'autre.

La **lentille achromatique** (ou doublet achromatique) sert à corriger l'aberration chromatique (changement de la longueur focale avec la longueur d'onde - section 3.4) d'un système optique (Fig. 3.2). Il s'agit d'une lentille composite formée d'une lentille positive avec un grand coefficient de dispersion collée ( $R_2 = R_3$ ) à une lentille négative ayant un petit coefficient de dispersion ; ceci permet d'annuler la dispersion chromatique d'un matériau avec celle de l'autre. Les lentilles achromatiques sont dispendieuses et difficiles à produire.

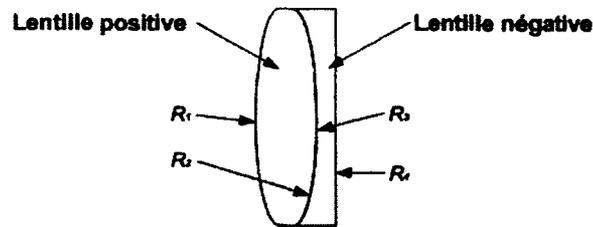


Figure 3.2 Doublet achromatique.

### 3.3 Les aberrations géométriques

Tout système optique contient des défauts (aberrations). On parle d'aberration sphérique, de coma, d'astigmatisme, de distorsion, d'aberration chromatique, *etc*. Le livre de Warren J. Smith, un classique en conception optique, les explique très bien [Smith, 2008f]. Le but d'une conception optique est de minimiser les aberrations en fonction du type d'application du système. Par exemple, les microscopes et les télescopes sont habituellement corrigés pour satisfaire le critère de Rayleigh sur la diffraction, du moins sur l'axe optique. Les lentilles photographiques par contre n'approchent pas ce niveau de correction [Smith, 2008g]. S'il n'y a pas d'aberrations géométriques, on dit que le système est limité par la diffraction. Alors, l'image d'un point source provenant de l'infini formera une image appelée tache d'Airy.



Figure 3.3 Tache d'Airy [LaFrenière, 2010].

#### 3.3.1 Aberration sphérique

L'aberration sphérique est une variation de focus avec l'ouverture du système optique (Fig. 3.4). Pour une ouverture et une longueur focale données d'un système à une seule lentille, la quantité d'aberration sphérique est en fonction de la courbure des surfaces de cette lentille, et de la position et la forme de l'objet. Aussi, plus la puissance (réciproque de la longueur focale) d'une lentille est élevée, plus elle introduira d'aberrations dans le système. Il est possible de réduire l'aberration sphérique jusqu'à un facteur 5 en remplaçant une lentille à haute puissance par deux lentilles à faible puissance, souvent à surfaces

asphériques. Dans le cas d'une seule lentille à surfaces sphériques, c'est la plano-convexe qui est idéale pour focaliser de la lumière venant de l'infini. L'aberration sphérique est minimale lorsque la partie courbée est du côté duquel la lumière arrive de l'infini (rayons parallèles) [Smith, 2008a].

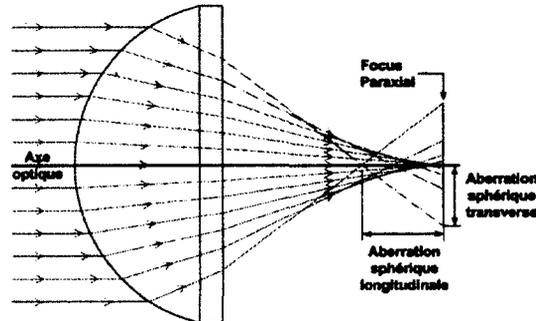


Figure 3.4 Aberration sphérique - Les rayons de plus en plus loin de l'axe optique sont focalisés de plus en plus près de la lentille.

### 3.3.2 Aberration de coma

L'aberration de coma est une variation du grandissement (rapport entre la dimension de l'image  $H'$  et de l'objet  $H$ ) avec l'ouverture de la lentille (Fig. 3.5). La quantité de coma dans un système optique varie avec la forme des lentilles ainsi qu'avec les diaphragmes limitant la quantité de lumière formant l'image [Smith, 2008f].

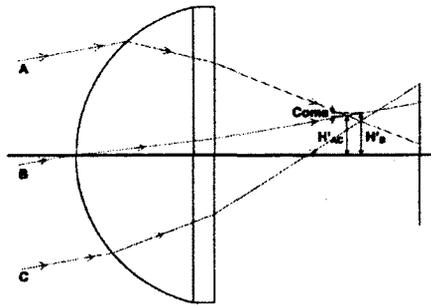


Figure 3.5 Aberration de coma - Les rayons des régions extrêmes de la lentille (A et C) focalisent à différentes hauteurs que les rayons passant par le centre (B) de la lentille.

### 3.3.3 Aberration d'astigmatisme

Le plan tangential correspond à tous les plans contenant l'axe optique du système. Le plan sagittal est perpendiculaire au plan tangential. L'astigmatisme se produit lorsque

les images selon ces deux plans ne coïncident pas (Fig. 3.6). Normalement, il n'y a pas d'astigmatisme (et de coma) sur l'image d'un point provenant de l'axe optique. Plus on s'éloigne de l'axe, plus il y a d'astigmatisme. La quantité d'astigmatisme d'une lentille est en fonction de la puissance et de la forme de la lentille ainsi que sa distance avec l'ouverture limitant la quantité de lumière entrant dans la lentille.

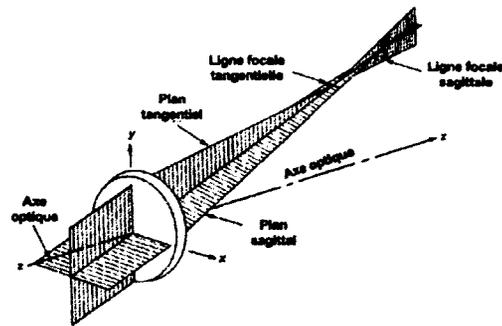


Figure 3.6 Aberration d'astigmatisme - Dans le cas d'une lentille simple, la quantité d'astigmatisme est égale au carré de la hauteur de l'image divisée par la longueur focale (adapté de [Smith, 2008f]).

### 3.3.4 Distorsion

La distorsion est le déplacement de l'image par rapport à sa position paraxiale (Fig. 3.7). Habituellement, la quantité de distorsion augmente avec le carré de la grandeur de l'image. La Fig. 3.7 représente l'image d'un objet carré ayant de la distorsion. L'image de gauche représente de la distorsion positive (coins imagés à l'extérieur de l'image non-distordue) et l'image de droite de la distorsion négative (coins imagés à l'intérieur de l'image non-distordue).

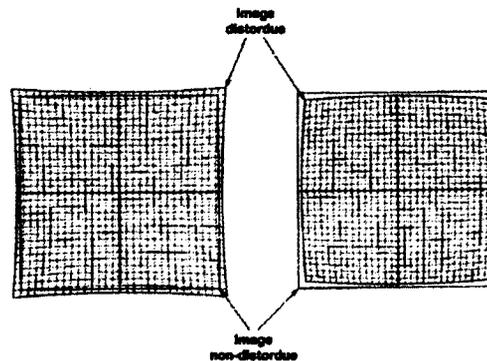


Figure 3.7 Aberration de distorsion. (adapté de [Smith, 2008f]).

## 3.4 Aberration chromatique

L'**aberration chromatique axiale** est la variation longitudinal du focus en fonction de la longueur d'onde (Fig. 3.8). Cela est causé par la variation de l'indice de réfraction du verre en fonction de la longueur d'onde. De façon générale, l'indice de réfraction est plus grand pour les petites longueurs d'onde que pour les grandes longueurs d'onde. La **couleur latérale** est la différence de grandissement entre des images formées à des longueurs d'onde différentes.

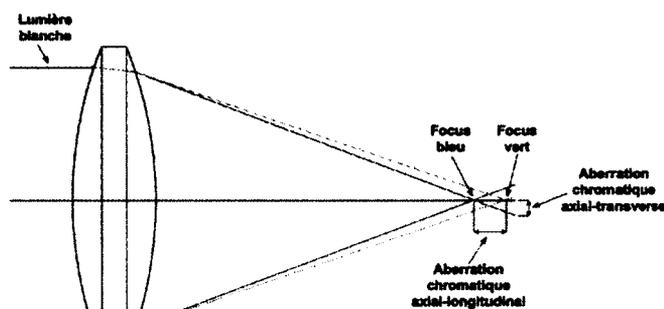


Figure 3.8 Aberration chromatique.

## 3.5 Les filtres

En optique, un filtre sert à transmettre ou non la lumière selon ses caractéristiques. Il y a trois types de filtrage : 1) le filtrage spectral, 2) le filtrage spatial et 3) le filtrage de polarisation.

### 3.5.1 Filtrage spectral

Il existe différents types de filtres permettant d'atténuer l'intensité lumineuse en fonction de la longueur d'onde.

**Les filtres en verre coloré** utilisent l'absorption sélective et ont généralement une large bande passante en longueur d'onde, allant de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres. Ces filtres ne sont donc pas très sélectifs. De plus, ils ne transmettent pas nécessairement la lumière dans une seule bande ; de nombreuses autres longueurs d'onde peuvent être transmises. Les filtres en verre coloré peuvent être utilisés pour le classement, l'atténuation de la lumière et la sélection spectrale d'une source large bande.

**Les filtres interférentiels** travaillent soit en réflexion et/ou en transmission et sont très sélectifs comparativement aux filtres en verre coloré. Ils permettent généralement de sélectionner une partie beaucoup plus fine du spectre lumineux. Cependant, ils sont beaucoup plus dispendieux et difficiles à produire. On obtient un filtre interférentiel par dépôt sous vide de plusieurs couches minces de différents matériaux sur une lame de verre. Des interférences constructives et destructives sont produites par ces couches pour laisser passer ou non la lumière. À noter qu'un filtre dichroïque placé à  $45^\circ$  dans un faisceau collimé, comme il sera vu plus tard, n'introduit pas d'astigmatisme [Smith, 2008d].

**Les filtres à densité neutre** sont des filtres par absorption ou réflexion qui, dans un cas idéal, atténuent également la lumière indépendamment de la longueur d'onde ; ce sont des filtres spectralement plats. On utilise ces filtres pour atténuer la lumière trop intense pour des appareils de mesure (p.ex. l'atténuation d'un faisceau laser). Les filtres à densité neutre par réflexion font usage d'un revêtement métallique partiellement réfléchissant pour atténuer la lumière, alors que ceux par absorption, des verres atténuants sont utilisés.

**Les filtres anti-caloriques** (*hot et cold mirrors*) permettent de diminuer le transfert thermique de certaines sources lumineuses vers des instruments contenant des composantes optiques fragiles qui ne doivent pas trop chauffer. Ces filtres transmettent généralement le visible et l'ultraviolet (UV) proche et bloquent ou réfléchissent l'infrarouge (chaleur). Dans ce cas on parle de *hot mirror* ("miroir chaud"). Dans le cas où l'effet est inverse, *i.e.* visible et UV réfléchi et IR transmis, on parle de *cold mirror*. Ces types de filtres sont généralement aussi fabriqués par dépôt de couches minces.

### 3.5.2 Filtrage spatial

Le filtrage spatial permet de sélectionner la partie spatiale (la forme de l'image) de la lumière contrairement au filtrage temporel qui sélectionne les fréquences temporelles. Par exemple, les rayons provenant de l'infini avec différents angles vont presque tous converger vers un même plan, mais pas vers un même point (Fig. 3.9). On peut donc placer un filtre dans ce plan pour bloquer les rayons indésirables. Un filtre spatial peut être une fente, un diaphragme, un fil, un point, *etc.*

### 3.5.3 Filtrage de polarisation

Le filtrage de polarisation permet de sélectionner une polarisation particulière de la lumière. Il en y a deux type : par absorption et par séparation de faisceau.

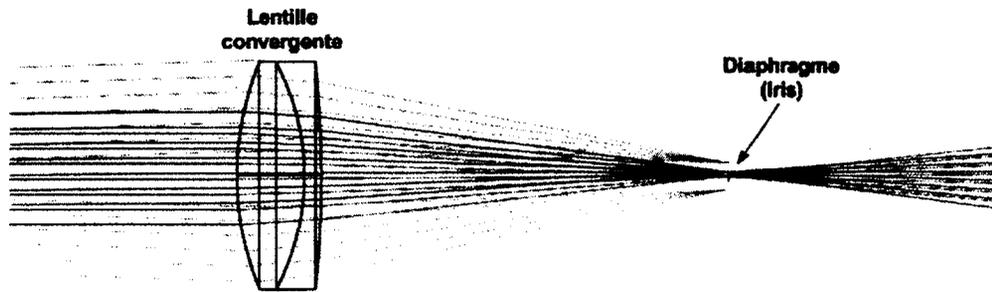


Figure 3.9 Exemple de filtrage spatial.

### 3.6 Principe de symétrie

La symétrie dans un système optique (on parle ici de l'aspect mécanique du système ; *i.e.* la position, les rayons de courbure et les matériaux des composantes optiques) va automatiquement éliminer le coma, la distorsion et la couleur latérale [Smith, 2008e]. Pour obtenir une symétrie parfaite, le système doit absolument avoir un grandissement unitaire. Cependant, le principe de symétrie est aussi utile pour des systèmes en conjugaison infinie (*i.e.* objet provenant de l'infini), car le coma, la couleur latérale et la distorsion vont être considérablement réduits. Cela est aussi vrai pour un système presque symétrique.

Pour un système travaillant en conjugaison finie, la meilleure configuration est d'avoir deux composantes convexes qui se font face (Fig. 3.10) (à condition d'avoir un petit champ de vue) [Smith, 1997]. De cette manière, chaque moitié du système travaille dans sa configuration de conception (*i.e.* l'objet provenant de l'infini). De plus, si le grandissement n'est pas unitaire, on peut utiliser des longueurs focales différentes.

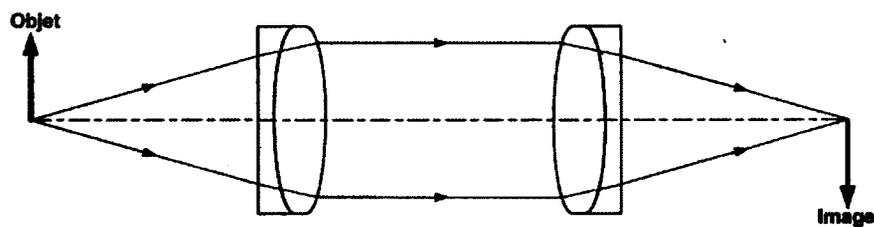


Figure 3.10 Système optique symétrique - Pour un grandissement unitaire, la lumière est collimée entre les deux composantes.

### 3.7 Pouvoir de captation de la lumière

Une caractéristique souvent utilisée pour décrire le pouvoir de captation d'un système optique est l'ouverture numérique (*numerical aperture - NA*) donnée par

$$NA = n \sin(U), \quad (3.1)$$

où  $n$  est l'indice de réfraction du milieu d'observation et  $U$  est l'angle entre l'axe optique et le rayon lumineux avec le plus grand angle entrant dans le système optique. Ce qu'il faut retenir est que plus l'objet est loin du système optique, moins de lumière entre dans le système.

### 3.8 Invariant de Lagrange

Une quantité importante dans la conception de tout instrument optique est l'invariant de Lagrange (aussi appelé invariant optique). Il peut s'exprimer comme le produit de la taille d'une image par la divergence de la lumière la produisant. L'équation de l'invariant de Lagrange est donnée par (voir Fig. 3.11 pour la définition des paramètres)

$$hnu = h'n'u'. \quad (3.2)$$

N'importe où le long d'un système optique sans troncation du faisceau de lumière, cette quantité demeurera constante. Cet invariant fixe en quelque sorte les limites à l'intérieur desquelles un concepteur optique peut optimiser son système. En effet, si par exemple on cueille selon un certain angle solide la lumière venant d'un objet d'une taille donnée, alors si on veut capter cette lumière avec un détecteur d'une taille donnée, il faudra que ce soit fait avec un angle solide bien déterminé par l'invariant optique. En pratique, il n'est pas toujours facile de réaliser un système optique pour lequel l'invariant optique restera constant, car les rayons extrémaux sont souvent tronqués par des ouvertures de tailles finies (p.ex. une lentille, nécessairement de taille finie, fixée dans sa monture). Lorsque le résultat d'une conception permet de conserver (ou de s'approcher de) la valeur fixée par l'invariant optique, le concepteur a fait un bon travail. Cet invariant a été utilisé dans la conception de la seconde génération du scanner *TomOptUS*.

### 3.9 Systèmes optiques considérés

En conception optique, il est préférable de commencer le travail avec un système déjà existant ayant des caractéristiques proches de celles voulues que l'on optimise par la suite selon les spécifications requises. Le système optique que *TomOptUS* a choisi pour le scanner est à conjugaison finie (chapitre 6). Aussi, les télescopes de Galilée et de Kepler ont été

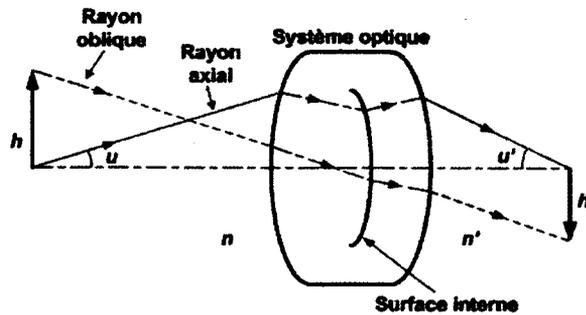


Figure 3.11 Invariant de Lagrange - Le rayon oblique et le rayon axial sont utilisés pour définir l'invariant de Lagrange (Adapté de [Smith, 2008c]).

considérés, car dans certaines configurations leur profondeur de champ est infinie. Cela est nécessaire, car le petit animal n'a pas une forme régulière (*i.e.* le système optique pour la détection n'est pas toujours à la même distance de l'animal). Dans cette section, on expose donc quelques concepts de conception de ces systèmes.

### 3.9.1 Système optique en conjugaison finie

La Fig. 3.12 illustre l'allure générale d'un système en conjugaison finie à deux composantes. Il y a deux types de problèmes qui se présentent en conception optique. Premièrement, si dans la spécification on connaît le grandissement ( $m$ ), la position des deux composantes ( $s$  et  $s'$ ) et la distance objet-image ( $T$ ) tout en négligeant l'espacement entre les plans principaux, on peut alors calculer les longueurs focales des lentilles  $f_A$  et  $f_B$  avec les formules suivantes

$$\phi_A = \frac{1}{f_A} = \frac{ms - md - s'}{msd}, \quad (3.3)$$

$$\phi_B = \frac{1}{f_B} = \frac{d - ms + s'}{ds'}. \quad (3.4)$$

Si on place l'objet à la distance focale ( $s = f_A$ ) de la composante A (Fig. 3.12), les rayons seront collimés (*i.e.* parallèles) à la sortie (note : l'espace  $d$  entre les deux composantes n'est pas critique). Alors, l'image se formera à la distance focale ( $s = f_B$ ) de la composante B. Dans cette situation et à partir des équations ci-dessus, il est facile de montrer que le grandissement est donné par

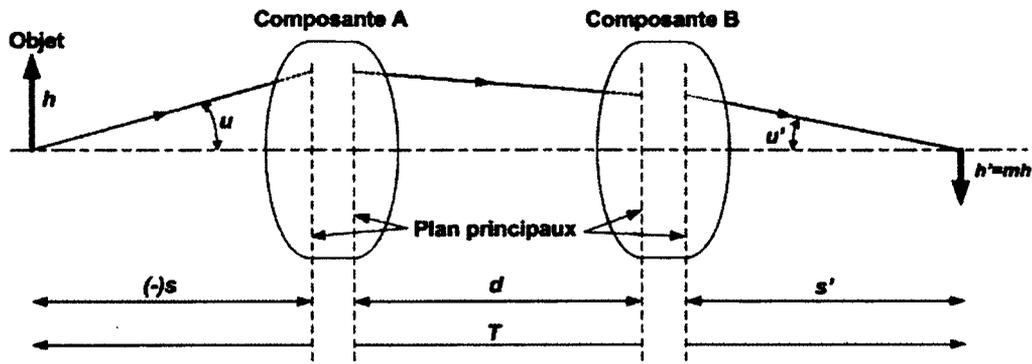


Figure 3.12 Système à deux composantes travaillant à conjugaison finie (adapté de [Smith, 2008b]).

$$m = \frac{-f_B}{f_A}. \quad (3.5)$$

Le deuxième cas consiste au problème inverse. C'est-à-dire que l'on veut calculer les distances  $s$ ,  $s'$  connaissant  $f_A$ ,  $f_B$ ,  $m$  et  $T$  (Fig. 3.12). On peut alors utiliser les formules suivantes

$$s = \frac{(m-1)d + T}{(m-1) - md\phi_A}, \quad (3.6)$$

$$s' = T + s - d. \quad (3.7)$$

Les équations ci-dessus peuvent être utilisées pour résoudre tous les problèmes impliquant des systèmes à deux composantes. Il faut comprendre que ces équations ne servent pas à faire des tracés exacts de rayons, car ce sont des équations basées sur l'approximation paraxiale (*i.e.* rayons près de l'axe optique) où on a posé  $\sin\theta \approx \theta$  pour  $\theta$  petit ( $<10^\circ$ ). Il est à noter qu'un changement de signe ( $\pm$ ) du grandissement ( $m$ ) peut donner lieu à deux systèmes complètement différents comme résultat. L'un des systèmes aura son image inversée tandis que l'autre aura son image droite, mais l'un de ces systèmes pourrait être beaucoup plus performant pour une certaine application [Smith, 2008b].

### 3.9.2 Systèmes afocaux

Dans un système afocal, l'image d'un objet provenant de l'infini est aussi formée à l'infini. Un système afocal peut servir à changer la distance focale et/ou le champ de vue d'un système optique en l'insérant là où la lumière est collimée. Les télescopes sont de bons exemples de systèmes afocaux. Bien qu'il existe différentes configurations possibles, il y a en deux types principaux utilisant des lentilles : le télescope de Kepler et le télescope de Galilée.

#### Télescope de Kepler

Ce type de télescope est composé de deux lentilles convergentes dont les points focaux coïncident en un même point (Fig. 3.13). En fait l'image de la première lentille devient l'objet de la deuxième lentille. Un avantage du télescope de Kepler est qu'il est possible de placer un filtre spatial là où se forme l'image interne. Cela aura pour effet de sélectionner les angles d'entrée. Donc, si on a un filtre spatial suffisamment petit (*i.e.* un point discret), il serait théoriquement possible de capter seulement les rayons parallèles à l'axe optique, obtenant ainsi une profondeur de champ infini. Par contre, on ne captera que peu de lumière.

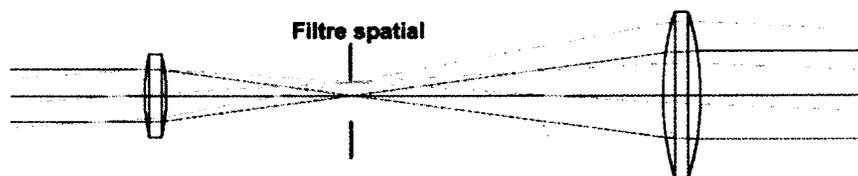


Figure 3.13 Télescope de Kepler.

#### Télescope de Galilée

Ce type de télescope est constitué d'une lentille convergente et d'une lentille divergente dont les points focaux coïncident, à la différence du télescope de Kepler, où l'image interne de la première lentille n'est jamais formée (Fig. 3.14). En fait, elle forme un objet virtuel pour la deuxième lentille. Le télescope de Galilée est idéal pour élargir un faisceau laser, car il n'y a pas de focus. Si on voudrait utiliser ce télescope à notre application, il faudrait ajouter une lentille convergente pour permettre l'ajout d'un filtre spatial.

## 3.10 Résumé

Dans le présent chapitre, on a vu l'essentiel des notions de conception optique qui seront utiles par la suite. Parmi les trois systèmes optiques qu'on vient de présenter, le système

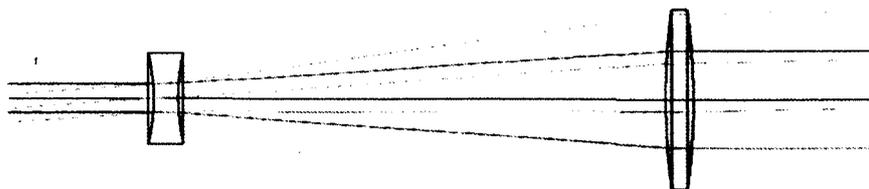


Figure 3.14 Télescope de Galilée.

à conjugaison finie est le système permettant de capter le plus de signal. En fait, les ouvertures numériques du télescope de Kepler et de Galilée tendent vers zéro dans le cas où on veut réduire le plus possible l'angle d'entrée. Nous avons testé rapidement le télescope de Kepler en laboratoire, mais sans succès. Les systèmes afocaux devront être étudiés plus en profondeur à cause de leur grande profondeur de champ.

Dans le prochain chapitre, il sera question de la première génération du scanner développée au sein du groupe *TomOptUS* et plus particulièrement du système optique à conjugaison finie réalisé en laboratoire. Nous avons arrêté notre choix sur des lentilles et des filtres disponibles commercialement. Même si ce sont des lentilles ayant quelques défauts, on a tout de même choisi des composantes maximisant la qualité du système optique.



# CHAPITRE 4

## GÉNÉRATION ANTÉRIEURE DU SCANNER *TomOptUS*

Précédemment aux présents travaux, le groupe *TomOptUS* avait réalisé une 1<sup>ière</sup> version d'un scanner *TOD sans contact en domaine temporel* pour *imagerie par fluorescence sur petit animal*. L'objectif de ce chapitre est de donner une description détaillée de ce scanner dans le but de mieux cerner les améliorations nécessaires à la 2<sup>ème</sup> version qui fait l'objet du présent mémoire. Plus précisément, on révisera le scanner en général, l'opto-mécanique du canal de détection, le système de vision 3D et le logiciel de contrôle. Cette revue permettra de relever les points qui ont servi à définir le cadre du présent travail.

### 4.1 Le scanner

La Fig. 4.1 donne un schéma de la première version du scanner *TomOptUS*. Pour faire une mesure tomographique complète sur un sujet, il faut capter les photons qui en ressortent à plusieurs positions autour de celui-ci. Le scanner comporte 3 degrés de liberté. Un premier degré de liberté est la rotation du canal de détection autour du sujet sur 360° via un plateau de rotation motorisé. Un second est la rotation indépendante de l'objet autour de lui-même sur 360°, aussi à l'aide d'un plateau de rotation motorisé. Ainsi, au lieu de faire tourner le point d'incidence du laser autour du sujet, ce qui serait possible avec un anneau (*gantry*), mais difficile étant donné la taille du laser utilisé; il est beaucoup plus facile de faire tourner le sujet et de maintenir le laser fixe étant donné qu'il s'agit d'un petit animal. Finalement, un piston de translation permet de déplacer l'objet selon l'axe *z* (axe vertical).

Ce montage n'a qu'un seul canal de détection utilisant une *PMT* comme détecteur. Avoir un seul canal a comme avantage qu'il n'y a pas de décalage temporel dû à l'instrumentation entre les mesures prises à différentes positions autour du sujet. Cependant, le temps d'acquisition est très long (on parle de plusieurs heures)<sup>1</sup>, car il faut tourner le canal entre chaque mesure. Il est donc souhaitable d'ajouter des canaux pour l'acquisition simultanée

---

<sup>1</sup>P.ex. l'acquisition de mesures tomographiques à tous les 10 degrés pour le détecteur pour des points d'injection laser séparés de 10 degrés sur des tranches séparées de 5 mm sur une hauteur de 8 cm peut prendre plus de 10h avec cette configuration.

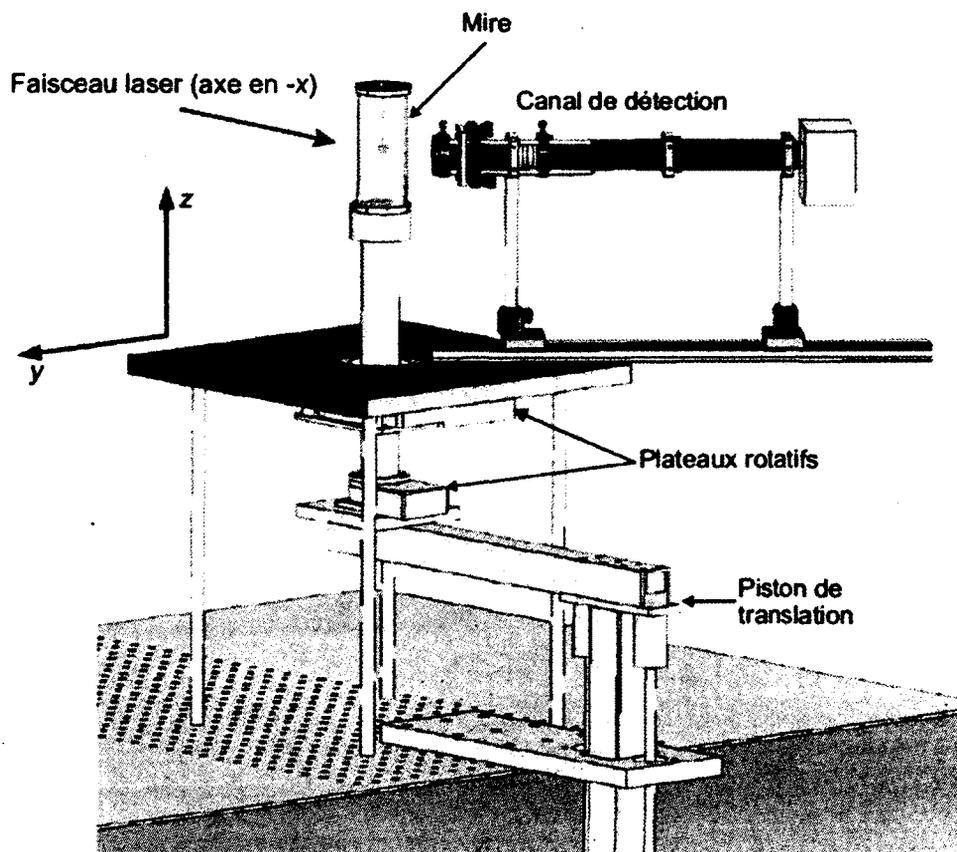


Figure 4.1 Première version du scanner *TomOptUS* (adapté de [Robichaud, 2007]).

de données tomographiques autour du sujet afin de réduire les temps d'acquisition à des niveaux acceptables pour des expériences sur animaux.

Un problème dans ce système, moins apparent sur la Fig. 4.1, et dû à sa conception mécanique, est que les axes de rotation/translation du sujet et de rotation du détecteur ne coïncident pas exactement. Ceci n'est pas souhaitable et rend difficile de mettre en correspondance la position du détecteur avec la position du sujet. Une cause de ce décalage vient du bras de levier entre l'axe du piston de translation et l'axe du sujet. Également, la plaque circulaire sur laquelle est fixé le canal ne contraint pas suffisamment l'axe de rotation/translation du sujet, car le trou qui permet le passage de cet axe est trop grand. Pour remédier à cela, il faudrait que le trou soit ajusté de façon plus serrée (*slide fit*) afin que les deux soit alignés à haute précision. Un effet de cela est que le détecteur ne tourne pas à une distance constante de l'axe de rotation du sujet lorsqu'il est déplacé.

Par ailleurs, la plaque circulaire sur laquelle est fixé le canal de détection est de trop petit diamètre, ce qui nécessite de d'abord fixer le canal sur une poutre qui dépasse largement la plaque circulaire. Cela entraîne un problème de flexion de la poutre ainsi que des désalignements possibles du canal de détection qui peut ne pas être selon une direction radiale du disque. Pour éviter cela, il serait préférable que le disque soit élargi et que les canaux puissent y être fixés en totalité pour ne pas avoir à utiliser de poutre.

À la lumière de ce qui vient d'être présenté concernant la 1<sup>ière</sup> version du scanner, une partie du présent projet sera : 1) d'ajouter plusieurs canaux de détection, 2) de corriger le désalignement des axes de rotation/translation du sujet et de rotation du détecteur et 3) de concevoir une nouvelle plaque circulaire sur laquelle seront fixés les canaux de détection. Ces changements apportés au scanner nécessitent l'intégration d'un nouveau plateau de rotation plus puissant, en remplacement de l'ancien qui n'est pas assez fort, permettant de supporter le poids de la nouvelle plaque circulaire et des canaux de détection.

## 4.2 Canal de détection

Dans cette section, il est question des aspects optiques et mécaniques du canal de détection.

### 4.2.1 Aspects optiques

L'optique du canal de détection doit capter le plus efficacement possible les photons provenant de la surface d'un sujet (petit animal) sur la surface sensible d'un détecteur (*PMT*) dans le but de les compter. On n'a donc pas besoin d'un système optique complexe avec une extrême capacité imageante (on veut compter des photons et non faire une photographie). Donc, on peut se permettre certaines aberrations telles le coma l'astigmatisme. Par contre, il faut porter beaucoup d'attention à l'aberration sphérique et chromatique, car on voudrait être capable d'imager plusieurs fluorophores sans changer les composantes du système optique. En principe, on voudrait détecter la lumière issue d'un élément de surface sur le sujet à imager. Il y a cependant un compromis à faire car si l'élément de surface est trop petit, on ne captera pas assez de lumière. Un élément de surface de 1 mm de diamètre semble un bon compromis comme point de départ.

Le système optique de la version antérieure du canal de détection est à conjugaison finie avec deux composantes (Fig. 4.2) principales qui sont les lentilles. Plusieurs caractéristiques de ce système sont données en annexe A (Fig. A.1) comme la distance entre les composantes, les rayons de courbures, les matériaux utilisés, *etc* . Le choix des longueurs

focales des deux lentilles plano-convexes donne lieu à un grandissement d'environ 8, et ce pour remplir la surface sensible de la *PMT* de 8 mm. Avec des filtres placés entre les deux lentilles, on bloque la lumière laser à 780 nm pour ne garder que la lumière fluorescente à 830 nm.

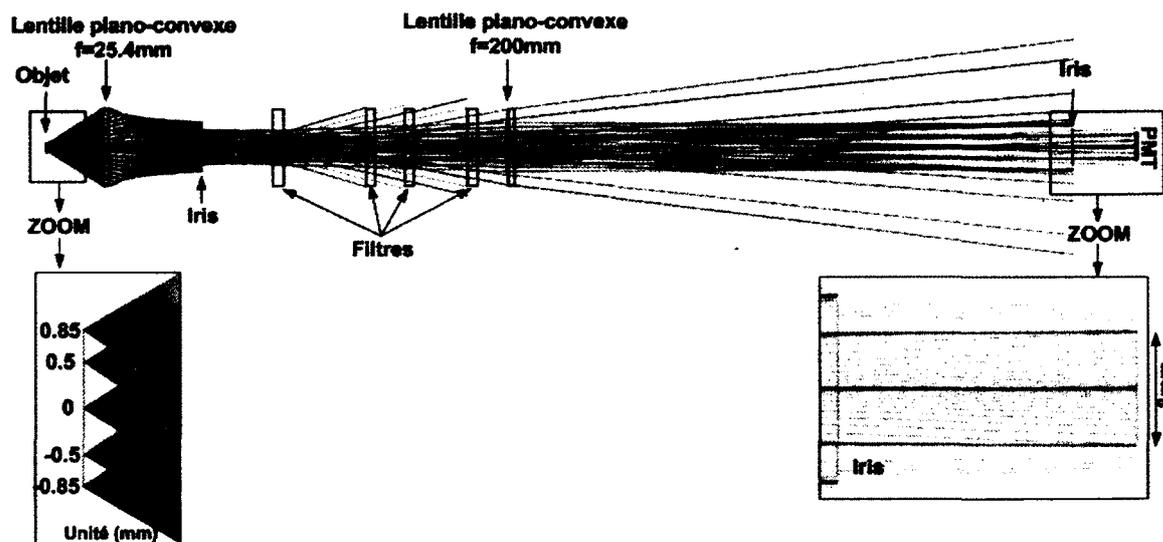


Figure 4.2 Première version du canal de détection optique - canal à une longueur d'onde.

La Fig. 4.3 illustre l'illumination relative sur la surface sensible du *PMT* vs diamètre du point observé sur le sujet en fonction de la distance entre le sujet et la première lentille (graphe obtenu avec *ZEMAX*). Les 6 courbes sont pour des distances sujet/lentille allant de 13 mm à 23 mm (*i.e.* 1 cm en tout), la distance nominale (*i.e.* au point focal théorique) étant de 17.86 mm. On remarque que plus on s'éloigne du point focal, plus le diamètre du point vu sur le sujet augmente. Pour la plage de distance sujet/lentille [15 mm, 19 mm], le diamètre du point sur le sujet est de moins de 2 mm. Par contre, en dehors de cette plage, le diamètre du point sur le sujet devient trop grand pour notre application. Les courbes ont été tracées avec la plus haute densité de rayons que le logiciel permettait. On remarque que les courbes ne sont pas très lisses lorsque l'objet est à 13 mm et 23 mm de la première lentille. La cause est que trop peu de rayons frappent la surface sensible du *PMT*.

Les lentilles à l'intérieur du canal (Thorlabs Inc., USA) sont faites de verre N-BK7. Le tableau 4.2 montre le changement de la distance focale des deux lentilles en fonction de la longueur d'onde. Les valeurs ont été calculées avec *ZEMAX*. Comme on peut le voir, en absolu (ce qui est d'intérêt ici car les lentilles sont fixées mécaniquement) l'effet est plus

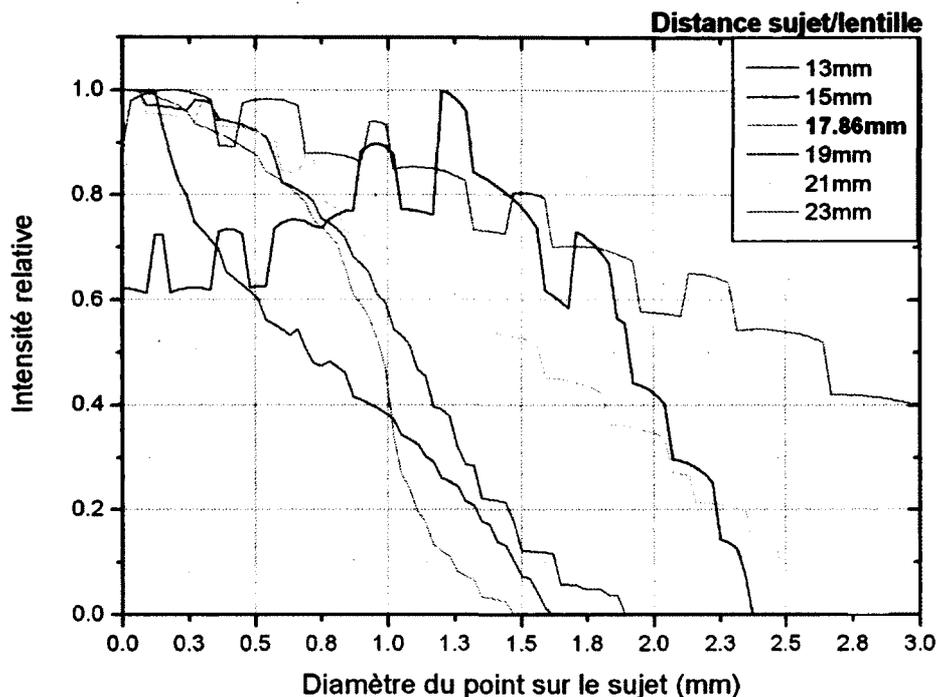


Figure 4.3 Illumination relative sur la surface sensible du détecteur en fonction du diamètre du point observé sur le sujet de la 1<sup>ière</sup> version du canal de détection. La distance 17.87 mm correspond à la longueur focale pour la longueur d'onde 830 nm (fluorescence).

marqué avec la lentille de focale 200 mm où il y a un écart de 3,446 mm entre des rayons à 600 nm et 1000 nm.

Tableau 4.1 Effet de la longueur d'onde sur le système optique. Distance focale arrière de deux lentilles en fonction de la longueur d'onde.

Lentille	Longueur d'onde	600 nm	700 nm	800 nm	900 nm	1000 nm	Écart (mm)
LA1951-B (f = 25.4 mm)		17.592	17.735	17.837	17.918	17.986	0.394
LA1708-B (f = 200 mm)		197.684	198.937	199.833	200.536	201.13	3.446

Comme on vient de le voir, la première version du canal de détection permet la captation d'une seule longueur d'onde. Donc, un autre objectif de ce projet de maîtrise est de concevoir un nouveau canal de détection permettant la captation de la lumière d'excitation et la fluorescence simultanément tout en améliorant la profondeur de champ. Il faut aussi rendre l'optique de focalisation et de collimation achromatique.

### 4.2.2 Aspects mécaniques

#### Protection contre la lumière parasite ambiante

Comme on le voit sur la Fig. 4.2, toutes les composantes optiques sont mises dans des tubes pour protéger le canal de détection de lumière ambiante parasite. Il faut toutefois se méfier des tubes, car ils peuvent aussi conduire de la lumière parasite indésirée qui se propage à l'intérieur du tube, p.ex. de la lumière réfléchiée partiellement sur les bords d'iris servant à bloquer une partie du faisceau (*stray light*).

#### Nombre de canaux possible

Le nombre de canaux qu'il est possible de placer autour du sujet à imager dépend de 4 facteurs : le rayon ( $r$ ) du sujet centré sur l'axe de rotation/translation, la longueur focale ( $f$ ) de la lentille la plus près du sujet, le diamètre ( $d$ ) de la monture de la lentille (on se sert de la pièce SM05 ou SM1 de Thorlabs Inc.) et l'espace ( $e$ ) nécessaire pour faire tenir la lentille. Pour ce qui est des tubes de chez Thorlabs Inc., il n'y en a pas de plus petits que le SM05. Si on veut mettre des lentilles plus petites, il faut des adaptateurs.

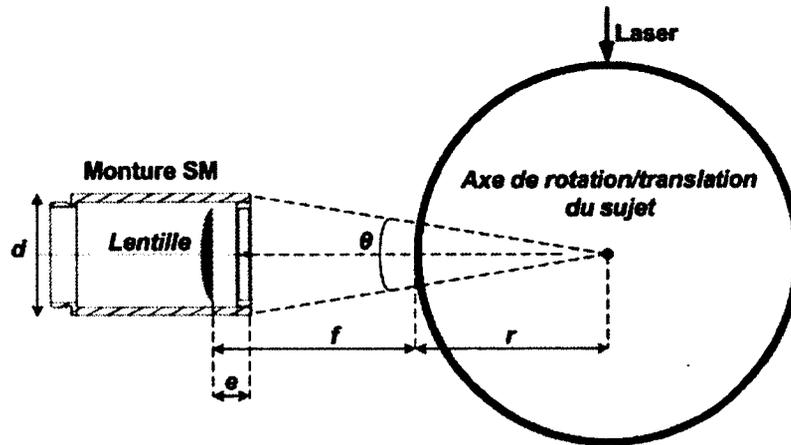


Figure 4.4 Angle couvert par un canal de détection.

L'angle total couvert ( $\theta$ ) par un canal à partir du centre du cylindre et le nombre de canaux ( $N_{canaux}$ ) pouvant être placés autour du sujet sont donnés par

$$\theta = 2 \arctan \left( \frac{d/2}{r + f - e} \right), \quad (4.1)$$

$$N_{canaux} = \frac{360}{\theta}. \quad (4.2)$$

La Fig. 4.5 illustre le nombre maximum de canaux qu'il est possible de placer autour d'un sujet ayant un rayon  $r = 25$  mm (cylindre de verre). Pour augmenter le nombre de détecteurs, il faut diminuer le diamètre de la lentille et/ou augmenter sa longueur focale. Toutefois, plus la lentille est petite, plus on diminue le NA du système et donc aussi son pouvoir de captation de la lumière. Il en est de même si on augmente la longueur focale pour une même dimension de lentille.

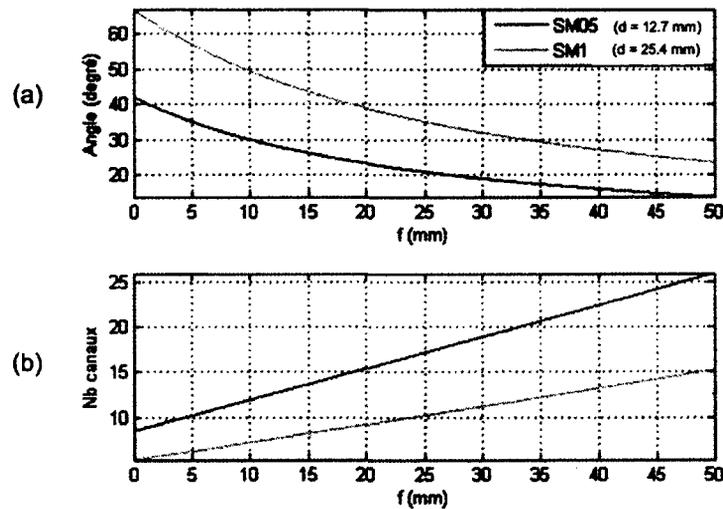


Figure 4.5 a) Angle ( $\theta$ ) couvert par un canal en fonction de la longueur focale de la lentille pour des montures de lentilles pouvant accepter des lentilles de longueur focale nominale de 25.4 mm (1 po., SM1 - trait rouge) ou de 12.7 mm (0.5 po. - SM05 - trait vert). b) Nombre de canaux qu'il est possible de placer autour de l'objet (sur  $360^\circ$ ) en fonction de la longueur focale de la lentille.

Comme on le verra au chapitre 6, la deuxième version du scanner possède 7 canaux de détection à double longueur d'onde. La Fig. 4.6 illustre le nombre maximum de ces canaux (11 en tout) qu'il serait possible de placer autour du sujet à imager. On n'est pas allé à plus haute densité de détecteurs à cause des coûts.

### Dimension d'une souris

Une souris fait typiquement environ 8 cm de longueur, de 2 à 3.5 cm de largeur et 2 cm d'épaisseur (Fig. 4.7). Donc, le parcours minimum du piston de translation doit au minimum être de 8 cm.

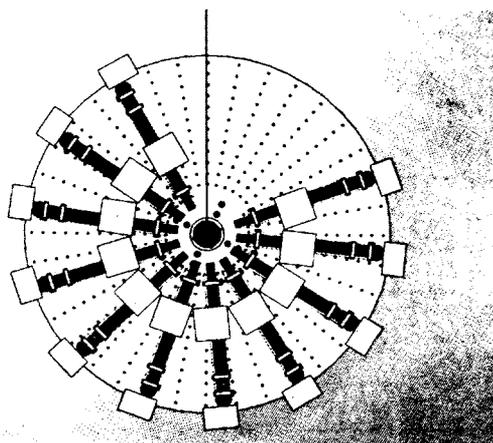


Figure 4.6 Nombre de canaux possible pour la 2<sup>ème</sup> version du scanner.

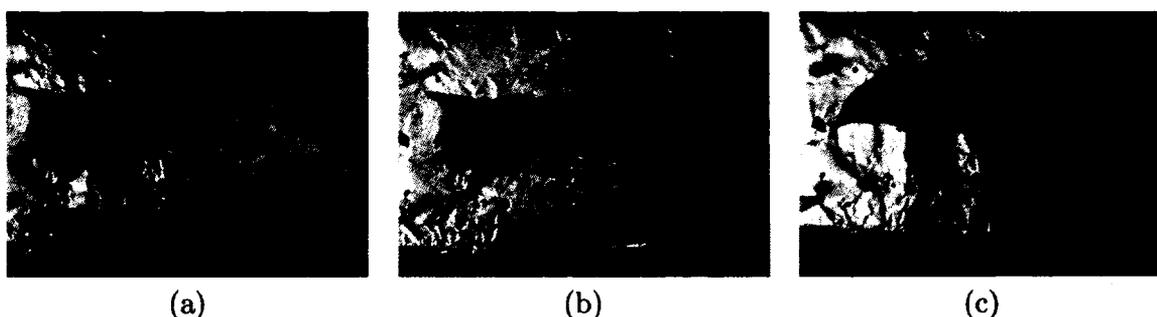


Figure 4.7 Dimensions typiques d'une souris.

### 4.3 Système de vision 3D

Un système de vision numérique (Fig. 4.8) a été conçu et réalisé afin d'obtenir une description de la géométrie 3D de la surface extérieure du sujet à imager. Ce système a fait l'objet des travaux de maîtrise de Maxime Comtois (ancien étudiant du groupe *TomOptUS*) [Comtois, 2008], mais son intégration n'a pas été faite dans la 1<sup>ère</sup> version du scanner. On ne peut donc pas faire des mesures tomographiques et de vision 3D de façon simultanée.

### 4.4 Contrôle du scanner par ordinateur

L'acquisition des mesures tomographiques est coordonnée par un programme *LabVIEW* développé par Vincent Robichaud. Les caractéristiques principales de ce programme sont :

- Contrôle de chaque moteur de façon indépendante (cette option est très pratique pour le développement).

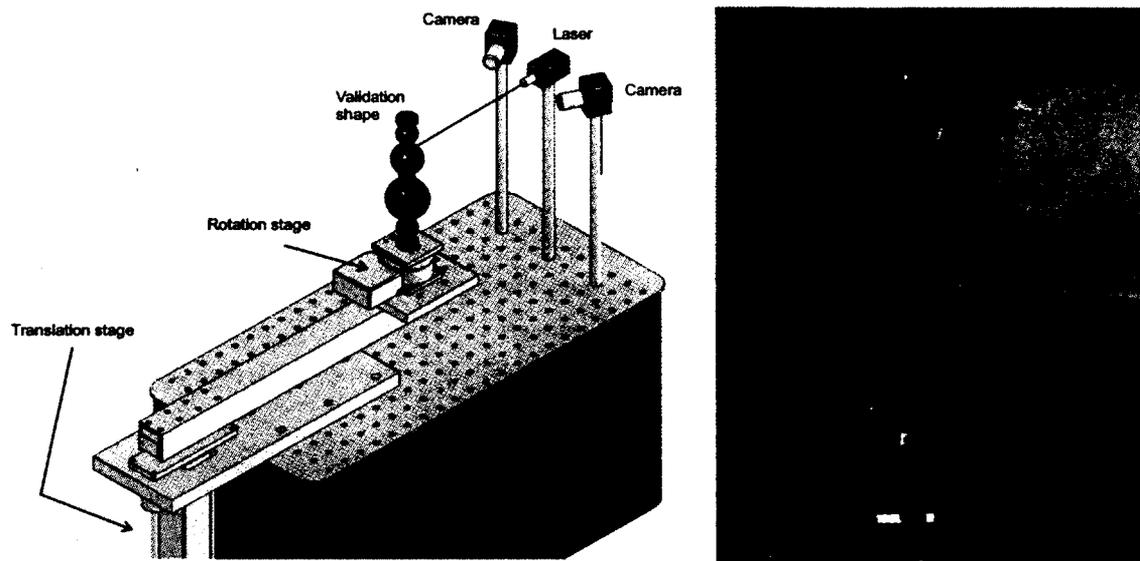


Figure 4.8 Première version du système de vision 3D [Comtois, 2008].

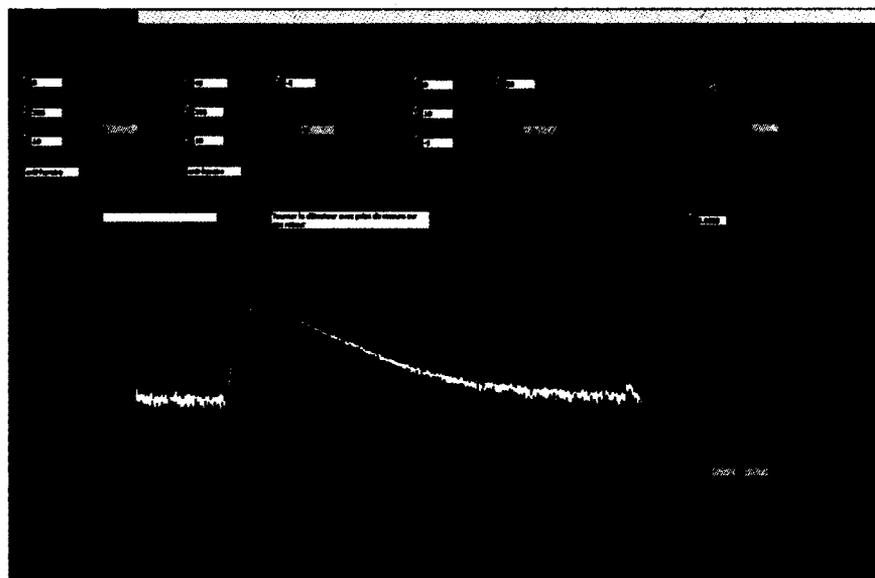


Figure 4.9 Première version de l'interface de contrôle du scanner [Robichaud, 2007].

- Prise de mesures tomographiques automatisée.
- Prise de mesures asservies en intensité (*i.e.* un filtre à densité variable sur le parcours optique du laser permet de maintenir un taux de comptage de photons constant).
- Permet l'ouverture et la fermeture d'un obturateur situé dans le parcours optique du laser pour ne pas illuminer le sujet lorsque l'un des moteurs est en mouvement

(ainsi, on évite d'illuminer de façon inutile le sujet, mais aussi l'agent fluorescent réduisant ainsi sa perte d'efficacité par photo-blanchiment).

- Affichage de la FTPSF et du taux de comptage à chaque mesure.

## 4.5 Résumé

Les points importants à retenir de ce chapitre concernant la 1<sup>ière</sup> version du scanner sont : 1) les axes de rotation/translation du sujet et de rotation du détecteur ne coïncident pas parfaitement, 2) le scanner ne possède qu'un seul canal de détection permettant la mesure d'une seule bande de longueur d'onde, et 3) le système de vision 3D n'est pas intégré au scanner. Le prochain chapitre sert donc à définir de façon détaillée les objectifs pour la réalisation de la 2<sup>ième</sup> version du scanner *TomOptUS*.

# CHAPITRE 5

## DÉFINITION DÉTAILLÉE ET OBJECTIFS DU PROJET

La TOD est un domaine interdisciplinaire faisant intervenir l'ingénierie (optique, électrique et mécanique), la physique (propagation de la lumière), les mathématiques appliquées, l'informatique et la biologie. On peut catégoriser les étapes de développement d'un scanner pour la TOD selon 5 grands axes :

- I. Conception et réalisation optique, mécanique et électronique
- II. Mesure de la surface externe du sujet par vision numérique 3D
- III. Modélisation de la propagation de la lumière dans les tissus biologiques
- IV. Développement d'algorithmes de reconstruction tomographique pour imagerie en 3D
- V. Développement de mires (objets tests simulant les propriétés des tissus biologiques) pour caractériser les performances du scanner

Les présents travaux portent sur le premier point avec une intégration du système de vision 3D qui a été réalisé antérieurement par Maxime Comtois. Plus précisément, l'article présenté au chapitre suivant rapporte de façon détaillée les travaux subséquents à ceux de Vincent Robichaud, qui a développé en grande partie la 1<sup>ière</sup> version du scanner discutée au chapitre 4. Les étapes pour la réalisation de la 2<sup>ième</sup> génération du scanner *TomOptUS* se résument comme suit :

1. Réingénierie des canaux de détection
  - i. Augmenter la densité de détection autour du sujet

Le but poursuivi ici est d'avoir plus de canaux de détection pour obtenir un échantillonnage de mesures plus grand sur celui-ci, et aussi pour réduire le temps d'acquisition. Ceci nécessite l'utilisation de composantes optiques plus petites près du sujet et/ou de premières lentilles de plus grandes focales. Par conséquent une nouvelle conception optique et mécanique des canaux doit être faite. La difficulté est qu'en utilisant de telles composantes optiques on réduit trop le pouvoir de captation de la lumière ressortant du sujet. On devra faire attention à cet aspect lors de la conception (l'invariant de Lagrange est fort utile dans ce contexte). Pour ce second prototype de scanner, mettre un canal

à tous les  $40^\circ$  serait une amélioration substantielle par rapport à la version antérieure (voir la section 4.2.2 à ce sujet dans laquelle une analyse montre que cela devrait être réalisable).

ii. Augmenter la profondeur de champ

On désire que les canaux aient cette propriété car un petit animal, n'étant pas un objet cylindrique, présente des variations dans sa forme extérieure. Par conséquent, la surface de l'animal ne sera pas toujours à la même distance d'un canal de détection lorsqu'il est tourné dans le scanner. Une configuration optique avec une grande profondeur de champ permet de limiter l'amplitude des variations de la taille de l'élément de surface sur l'animal sur lequel la lumière est captée. L'utilisation de lentilles de plus grandes focales dans la conception des canaux permettra d'atteindre ce résultat souhaité. On ne peut toutefois pas augmenter les focales indéfiniment, car cela réduira le pouvoir de captation. Ici, également, l'invariant de Lagrange servira de guide dans la conception.

iii. Acquisition simultanée dans 2 bandes de longueurs d'ondes (pour permettre l'imagerie intrinsèque et par fluorescence)

Cet aspect est nécessaire parce qu'on désire faire de l'imagerie tomographique par fluorescence avec le scanner et que, dans ce cas, les algorithmes de reconstruction nécessitent des mesures dans des bandes étroites autour de la longueur d'onde d'excitation et de la longueur d'onde d'émission de l'agent fluorescent. Ceci complexifie la conception et la réalisation optomécaniques des canaux, ainsi que leur mise en oeuvre, car l'alignement optique à réaliser sera plus délicat. Toutefois, cela demeure des difficultés relativement faciles à surmonter en utilisant des configurations optiques déjà éprouvées faisant usage de filtres dichroïques.

iv. Rendre l'optique de focalisation et de collimation achromatique

Ceci découle de la nécessité de mesures à deux bandes de longueurs d'ondes. Dans ce cas, comme la même optique est utilisée pour ces mesures, les propriétés de focalisation et de collimation doivent être les mêmes. Aussi, dans l'éventualité de l'utilisation d'autres longueurs d'ondes, on voudrait pouvoir utiliser autant que possible la même optique (mis à part bien sûr les filtres permettant de séparer la lumière en différentes bandes spectrales). Un choix

approprié de lentilles achromatiques dans la conception des canaux permettra d'atteindre ce but.

## 2. Réingénierie du scanner

### - Intégration de plusieurs canaux de détection

Ceci découle directement de l'augmentation de la densité de détection. La conception mécanique devra être revue à cette fin. Selon l'analyse de la section 4.2.2, cela est faisable et aucune difficulté n'est à signaler.

### - Intégration du système de vision 3D

Ce système a déjà été développé et est fonctionnel, mais n'a pas été intégré au scanner. Ce système sert à mesurer la forme de la surface extérieure du sujet à imager. Ceci est nécessaire pour tenir compte du changement de mode de propagation de la lumière en ligne droite à l'extérieur du sujet (en ligne droite) versus en régime diffus à l'intérieur du sujet. Plus précisément, cette surface sert à définir les conditions aux frontières des modèles de propagation de la lumière sous forme d'équations aux dérivées partielles utilisés dans les algorithmes de reconstruction tomographiques. Pour intégrer le système de vision 3D, une difficulté est l'encombrement dû à la densité des canaux de détection. Il faudra faire en sorte que les caméras puissent avoir un champ de vue libre permettant de voir la portion de surface requise sur le sujet pour échantillonner cette surface. Le positionnement idéal des caméras qui était possible lorsque non intégrées au scanner pourrait ne plus l'être.

### - Correction du décalage entre l'axe de rotation/translation du sujet et l'axe de rotation des canaux de détection

Un des problèmes avec la configuration mécanique de la version antérieure du scanner était la possibilité que les canaux de détection ne tournent pas exactement autour du même axe que le sujet. Une meilleure conception mécanique avec des tolérances plus serrées et utilisant un joint universel permet de pallier à ce problème et ainsi obtenir un alignement quasi parfait.

## 3. Ajouts majeurs au logiciel de contrôle

### - Acquisition avec une possibilité de 16 détecteurs simultanément

L'électronique de comptage de photons permet d'acquérir des signaux venant de 16 canaux de détection en parallèle. Même s'il n'y aura pas ce nombre dans

la seconde version, tout sera mis en place pour une possibilité de 16 canaux pour une mise à jour ultérieure du scanner. Le logiciel sera revu pour donner cette possibilité.

- Intégration du logiciel de vision 3D au logiciel de contrôle du scanner

Cela découle directement de l'intégration du système de vision 3D au scanner. Les deux logiciels ayant été programmés dans l'environnement LabVIEW, leur intégration pourra se faire sans grande difficulté.

- Ajout de nouvelles fonctionnalités

Avec les ajouts matériels au scanner décrits précédemment, des fonctionnalités doivent conséquemment être ajoutées au logiciel de contrôle, comme : l'affichage des courbes temporelles acquises par les différents canaux de détection et des taux de comptage de photons, la possibilité de choisir lesquelles parmi ces courbes on désire afficher, le contrôle des caméras du système de vision 3D, et le suivi de la largeur des impulsions laser à l'aide d'un autocorrélateur.

#### 4. Caractérisation et calibration du scanner

- Fonction de réponse du système (*Instrument response function - IRF*)

Les IRF de tous les canaux doivent être caractérisées. Ceci permettra d'utiliser des algorithmes de déconvolution qui ont été développés par Geoffroy Bodi (étudiant ayant fait sa maîtrise sur ce sujet dans notre groupe de recherche) pour éliminer l'effet des fonctions de réponse dans les mesures et ainsi avoir accès au signal vrai n'ayant pas subi l'influence du système de mesure. Ceci est important pour les algorithmes de reconstruction qui utiliseront les données issues du scanner, car ces algorithmes supposent des mesures des signaux vrai, ou la connaissance des IRFs. Pour obtenir les IRFs, il faut prendre des "mesures à vide" dans lesquelles le faisceau laser entre directement dans les canaux. Pour ce faire, il faut toutefois atténuer le faisceau afin de ne pas endommager les détecteurs. Cela est une mesure bien maîtrisée dans notre laboratoire.

- Décalages temporels absolus des canaux de détection

Si on prend deux canaux différents pour faire la même mesure en un point sur un sujet, les deux canaux ne donneront pas les mêmes résultats, car ces deux canaux présentent en général des délais différents dû à la longueur des câbles électriques qui peuvent différer, à des délais différents dans leur électronique

respective, *etc* . Pour éliminer ces délais des mesures, il faut les caractériser expérimentalement. La technique pour ce faire est détaillée dans l'article présenté au chapitre suivant.

- Variation en sensibilité d'un canal à l'autre

De façon similaire aux décalages temporels, tous les canaux n'ont pas nécessairement la même sensibilité. Il faut donc caractériser la sensibilité des différents canaux pour les ramener sur une même base. Ceci est critique pour obtenir des mesures absolues et ultimement être capable de faire de l'imagerie quantitative. Pour obtenir la sensibilité relative entre les canaux, on doit faire la même mesure avec tous les canaux dans les mêmes conditions. Les amplitudes des signaux permettent alors de calculer les sensibilités relatives.

On désire également obtenir des premiers résultats avec le scanner permettant de donner une idée de ses capacités. Pour ce faire, dans l'article du chapitre suivant on exploite des mesures tomographiques faites avec le scanner pour présenter des résultats obtenus sur

- La localisation d'inclusions fluorescentes par temps de vol, et
- L'effet d'un milieu hétérogène sur le temps d'arrivée des premiers photons

Les objectifs poursuivis ici pour le développement de la 2<sup>ième</sup> génération du scanner *TomOptUS* et qui ont été réalisés sont rapportés dans l'article (soumis à la revue *Review of Scientific Instruments*) du chapitre suivant.



## CHAPITRE 6

# SECONDE GÉNÉRATION DU SCANNER

## *TomOptUS*

**Mise en contexte :** Cet article a été soumis à *Review of Scientific Instruments* le 29 août 2011.

**Titre de l'article (original en anglais) :** *A multi-view time-domain non-contact diffuse optical tomography scanner with dual wavelength detection for intrinsic and fluorescence small animal imaging*

**Titre de l'article (version française) :** Un scanner sans contact à vues multiples pour tomographie optique diffuse avec détection à double bandes de longueur dans le domaine temporel pour imagerie intrinsèque et par fluorescence sur petit animal

**Auteurs :** Eric Lapointe (étudiant à la maîtrise), Julien Pichette (étudiant au doctorat) et Yves Bérubé-Lauzière (professeur),

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

**Résumé de l'article :** On présente pour la première fois le scanner *TomOptUS* avec des canaux de détection (7 canaux - *i.e.* 14 *PMTs*) captant simultanément 2 bandes de longueur d'onde (imagerie intrinsèque et par fluorescence). L'objectif principal de cet article est de décrire de façon détaillée les aspects optique, mécanique et électronique du scanner. Il y a aussi une section sur la calibration et la caractérisation. On présente finalement des résultats de localisation d'inclusions fluorescentes et de mesures intrinsèques en milieu hétérogène.

**Abstract :** We present a non-contact diffuse optical tomography (DOT) scanner with multi-view detection (over 360 degrees) for localizing fluorescent markers in scattering and absorbing media, in particular small animals. It relies on time-domain detection after short pulse laser excitation. Ultrafast time-correlated single photon counting and photomultiplier tubes are used for time-domain measurements. For light collection, 7 free-space optics non-contact dual wavelength detection channels comprising 14 detectors overall are placed around the subject, allowing the measurement of time point-spread functions at both excitation and fluorescence wavelengths. The scanner is also endowed with an optical metrology system for measuring the outer shape of the subject in 3D using a stereo camera pair. Surface and DOT measurements are acquired simultaneously with the same laser beam. The hardware and software architecture of the scanner are discussed. In the present article, phantoms are used to validate the instrument. Results on the localization of fluorescent point-like inclusions immersed in a scattering and absorbing object are presented. The localization algorithm relies on distance ranging based on the measurement of early photons arrival times at different positions around the subject. As such, this requires exquisite timing accuracy from the scanner. Further exploiting this capability, we show results on the effect of a scattering heterogeneity on the arrival time of early photons. These results demonstrate that our scanner is operational and provides all that is necessary for reconstructing images of small animals using full tomographic reconstruction algorithms, which will be the next step. Through its free-space optics design and the short pulse laser used, our scanner shows unprecedented timing resolution compared to other multi-view time-domain scanners.

**Keywords :** diffuse optical tomography, scanner, small animal imaging, time-domain optical measurements, non-contact measurements, fluorescence, time point-spread functions, multi-wavelength detection, 3D computer vision, time-correlated single photon counting

## 6.1 Introduction

This paper describes a complete diffuse optical tomography (DOT) scanner for small animal imaging featuring multi-view (over 360°) time-domain (TD) non-contact optical detection. Compared to other biomedical imaging modalities, DOT is relatively recent dating back to the beginning of the 1990's [Mueller et *et al.*, 1993]. DOT seeks to image inside biological tissues in 3D using light, similarly to computerized tomography (CT) with X-rays. The propagation of light in biological tissues is dictated by absorption and strong elastic scattering [Wang et Wu, 2007]. When possible, near infrared (NIR) light from 650 nm to 1000 nm, called the therapeutic window, is preferred for imaging biological

tissues as these absorb less in that range, thus allowing greater light probing depth [Welch et van Gemert, 1995]. DOT relies on illuminating a tissue volume at a plurality of positions and measuring, for each of these positions, the light at several other positions after its travel through the tissue [Pogue *et al.*, 1999]. Data thus obtained are fed to an algorithm that reconstructs a 3D absorption and scattering map, allowing spatially- and possibly spectroscopically- resolved imaging of *in vivo* scattering and absorption, and of derived quantities such as local oxy- and deoxy-hemoglobin concentrations [Wang et Wu, 2007]. Several algorithms have been developed for DOT image reconstruction. As this paper is about instrumentation, these will not be discussed further here, and the reader is referred to recent reviews [Klose et Hielscher, 2008; Arridge et Schotland, 2009] DOT has also been adapted for imaging fluorescence in biological tissues [O'Leary *et al.*, 1996; Hawrysz et Sevick-Muraca, 2000; Klose *et al.*, 2005]. Fluorescence DOT (FDOT) has attracted strong interest in recent years for small animal molecular imaging using fluorescent probes and proteins that report specific biomolecular and cellular processes *in vivo* [Weissleder et Mahmood, 2001; Massoud et Gambhir, 2003; Hielscher, 2005; Ntziachristos, 2006; Klose, 2009; Leblond *et al.*, 2009].

The instrument presented herein is a complete multi-view scanner for DOT and FDOT imaging of small animals (mice) exploiting pulsed laser excitation and TD optical measurements. It comprises dual wavelength detection channels for acquiring multi-view non-contact TD tomographic data all around a subject. Free-space optics (discrete lenses and filters) are used throughout, which avoid resorting to matching fluids. Time-correlated single photon counting (TCSPC) is used for acquiring TD signals (so-called time point-spread functions - TPSFs). The scanner is able to stably acquire full TPSFs with unprecedented timing resolution and accuracy for multi-view dual wavelength detection. This capability is demonstrated in experiments whereby deep seated fluorescent inclusions are localized to within millimeter resolution using early photon arrival times extracted from fluorescence TPSFs. The scanner also integrates a stereo computer vision (CV) system developed in house for measuring the animal's 3D surface [Comtois et Bérubé-Lauzière, 2008, 2007].

The outline of the paper is as follows. Sect. 6.2 presents the requirements and choices made that have led to the design of our scanner. An overview of the scanner is given in Sect. 6.3. Details on the scanner's hardware are provided in Sect. 6.4. Sect. 6.5 describes software control. Calibration of the scanner is detailed in Sect. 6.6. Results obtained with the scanner on phantoms to validate its operation are presented in Sect. 6.7. The paper concludes with a discussion along with a summary and avenues of future work.

## 6.2 Design requirements/choices

We now discuss the design requirements considered in developing our scanner along with the motivations for the associated choices. As we go along, relevant literature is reviewed. Developing such a scanner poses significant challenges due to the need for : 1) imaging the subject in its natural state ; 2) acquiring dense sets of measurements all around the subject ; 3) shortest possible acquisition times ; 4) multi-wavelength illumination and detection for possibly imaging different fluorophores ; 5) high sensitivity and dynamic range as signals can be extremely faint due to tissue absorption and scattering, but can also be strong depending on the relative source-detector positions ; 6) measuring the animal's surface shape in 3D in order to determine where the propagation mode of light changes from diffuse (in biological tissues) to straight-line (in air) ; moreover 7) in TD systems, the detection electro-optics must provide for high temporal resolution to resolve the TD optical signals. In the subsections below, we discuss the main issues relating to non-contact, time-domain, and multi-view optical data acquisition.

### 6.2.1 Non-contact measurements

Several DOT systems reported in the literature resort to optical fibers for illuminating and for collecting the ensuing light emerging from an object to be imaged. Some constrain the object to a simple geometry with the fiber extremity in direct contact with the constrained object, as is often the case in breast imaging [Tromberg *et al.*, 2008; Rinneberg *et al.*, 2008/03/; Taroni *et al.*, 2009]. Others require the object to be immersed in a matching fluid contained in an enclosure of known geometry with the fibers passing through the enclosure's wall at several points [Ntziachristos *et al.*, 2002; Colak *et al.*, 1999]. In these, the goal is to obtain a medium with a known and as simple a geometry as possible, thereby easing the imaging problem. In small animal imaging, however, it is highly desirable to image the animal in its natural state. Constraining it to a known geometry or immersing it into a matching fluid is not desirable as this requires further precautions and manipulation (not deforming the animal, not drowning it, drying the animal, *etc.*). It also makes system operation and maintenance not attractive to end-users (filling enclosures with fluids, cleaning the system, *etc.*). Immersing the animal is also cumbersome as animals need to be anesthetized throughout an imaging session. Using matching fluids also leads to additional signal to noise ratio (SNR) losses in DOT measurements.

To circumvent such difficulties, the concept of non-contact (NC) measurements for small animal DOT imaging was first clearly enunciated in the open literature in 2003 [Ripoll

*et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2003], whereby illumination/measurements are to be made at a distance from the subject. One should note, however, that the description of a fully NC multi-view system for small animal imaging already appeared in a patent filed in 2001 [Nilsson *et al.*, 2006]. Although systems presented in open literature publications shortly after 2003 were not truly NC, the idea was launched and provided impetus [Hielscher, 2005]. Thereafter, the appearance of fully NC DOT small animal imaging systems (*i.e.* without having fibers in contact with a vessel containing the animal, or without disturbing the animal by constraining it to a simple geometry) began to increase [Xenogen Corporation, 2005; Herve *et al.*, 2007; Deliolanis *et al.*, 2007]. NC measurements facilitate data acquisition from an end-user perspective.

Owing to the several advantages of NC measurements, our scanner is designed for a fully NC architecture, even if this significantly complicates hardware, especially in the case of ultrafast TD measurements. Our scanner uses a laser beam to illuminate the subject at a distance, along with free-space optics detection channels for collecting light emerging therefrom. It is also endowed with a stereo computer vision system for measuring the 3D outer surface of the animal. This surface determines where light propagation changes from diffuse (in biological tissues) to straight-line (in air). This is of critical importance to DOT reconstruction algorithms. Light propagation models underlying such algorithms take the form of partial differential equations involving boundary conditions which require the object to be voxelized or meshed depending on the numerical scheme chosen for solving these equations (finite elements or finite differences) [Klose et Hielscher, 2008; Arridge et Schotland, 2009; Dehghani *et al.*, 2009]. An NC architecture was also selected in view of multimodal imaging, as NC set-ups offer the potential of easier integration of DOT with other medical imaging modalities such as X-ray CT, positron emission tomography (PET), and magnetic resonance imaging (MRI), which are all NC. Multimodality is a strong trend in medical imaging [Park et Gambhir, 2005; Masciotti *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010; Ghijsen *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009], and our design leaves this door open.

### 6.2.2 Time-domain measurements

Most small animal DOT scanners developed in research laboratories or commercially available use continuous wave (CW) or frequency-domain (FD) measurements [Rasmussen *et al.*, 2006; Leblond *et al.*, 2009], with an increasing number exploiting TD signals [Montcel et Poulet, 2006; Niedre *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2008; Nothdurft *et al.*, 2009; Kepshire *et al.*, 2009; Valim *et al.*, 2010]. It is generally accepted that TD signals convey richer information than CW or FD signals [Wang et Wu, 2007]. Indeed, in intrinsic imaging (detection

wavelength same as excitation), the shape of TD signals is directly related to the tissue's  $\mu_a$  and  $\mu_s$  coefficients [Patterson *et al.*, 1989]. TD data provide additional information on the paths followed by photons that propagated in a scattering medium. This has been exploited to constrain the volume of tissue probed by scattered photons [Valim *et al.*, 2010] or to select the depth probed in scattering media by optical signals [Pifferi *et al.*, 2008]. In fluorescence imaging, the lifetime of fluorescent bio-markers, which influences the shape of the measured TD curve, conveys information about local *in vivo* physiological parameters (biochemical binding, oxygenation, pH, *etc*) [Nothdurft *et al.*, 2009]. This leads to fluorescence lifetime imaging (FLIM), which is well developed in microscopy [Suhling *et al.*, 2007]. The extent of the information contained in TD signals in DOT is, however, not yet completely understood, nor fully exploited [Wang et Wu, 2007; Leblond *et al.*, 2009]. It is therefore desirable to develop DOT scanners that will allow acquiring TD signals, thereby enabling studies on how to exploit their full potential, and allow obtaining better resolved images as motivated by recent work [Valim *et al.*, 2010]. This, in fact, provides a strong rationale for our work. For these reasons, our scanner uses ultra-short laser pulse excitation along with ultrafast TD detection of optical signals using TCSPC. In terms of the temporal resolution needed, as a rule of thumb, signals that need to be measured have a width of 1 ns per cm of biological tissue traversed (*e.g.* for a mouse 2 cm in diameter, a TPSF will have a full width at half maximum (FWHM) of about 2 ns). Thus, a temporal resolution at least 10 times shorter is required to cleanly resolve such signals. Apart from expensive streak cameras, TCSPC offers the best temporal resolution and most cost-effective solution (streak cameras provide for sub-ps temporal resolutions - typically a few hundreds of fs, but are limited for acquiring several signals simultaneously - 8 being the highest number reported [Wu *et al.*, 1995; Zint *et al.*, 2003] - and their photocathode is subject to aging). TCSPC is also the most sensitive technique available as single photons are detected.

### 6.2.3 Multi-view data acquisition

DOT requires measurements at a plurality of positions on the subject to be imaged. Our scanner performs NC TD measurements all around the subject; both epi- and transillumination measurements [Ntziachristos, 2006; Leblond *et al.*, 2009] are included as sub-cases. Other scanners do not combine both types of measurements at once. Transillumination is perhaps adequate for imaging a homogeneous phantom of limited thickness, or containing a few inclusions [Turner *et al.*, 2005]. However, for a small animal containing optically dense organs (heart, liver, ...), it appears important to have access to data

acquired over  $360^\circ$ , including data from backscattered light obtained via epi- or near-to epi-illumination measurements. Backscattered measurements provide in certain cases the sole data viable for DOT reconstruction in terms of signal-to-noise ratio (SNR). Studies with a planar imaging system have evaluated the use of TD backscattered light measurements for estimating the depth of fluorescent inclusions *in vivo* [Gallant *et al.*, 2004]. Although TD data were shown not to be sufficient for unambiguously determining an inclusion's 3D position, they nevertheless provide useful depth cues. Using solely backscattered light is, however, not an optimal approach. For contact DOT systems, it has been shown that backscatter only measurements lead to a poorer spatial resolution compared to measurements over  $360^\circ$  [Pogue *et al.*, 1999]. Work in our group has also shown that it is necessary to perform measurements over  $360^\circ$  for localizing fluorescent inclusions with high precision [Bérubé-Lauzière et Robichaud, 2007; Pichette *et al.*, 2009]. Thus, with such full-angle measurements, we ensure the acquisition of reliable data in a broader range of situations with the potential of i) probing deeper through tissues compared to transillumination systems, and ii) improving on the spatial resolution of current scanners which is depth dependent and has been reported to range from 1 to 3 mm for small animals [Schulz *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2005].

### 6.3 Instrument overview

We now provide an overview of the scanner we developed to fulfill the requirements discussed above. A detailed description will follow in the next sections. Such development involves 3 main aspects : hardware, software, and image reconstruction algorithms. Fig. 6.1 shows a functional block diagram of the scanner. Its mechanical design, made using SolidWorks®CAD software, is depicted in Fig. 6.2. A photograph is shown in Fig. 6.3. Referring to Figs. 6.1 and 6.2, the beam from an ultrafast laser serves to illuminate the subject to be imaged with short light pulses. The subject can be rotated and translated about a vertical axis. Seven (7) dual wavelength detection channels allow simultaneous tomographic TD measurements of TPSFs around the subject at both the laser excitation wavelength (XTPSF), and the fluorescence wavelength (FTPSF). The detection channels can be rotated as well around the subject, and this, independently therefrom. As our scanner is designed to be NC, it completely integrates a stereo CV system for measuring the 3D outer surface shape of the subject. Both the TPSFs and 3D-CV measurements provide the necessary data for tomographic image reconstruction. Hardware and data acquisition are all controlled by computer. A graphical user interface (GUI) allows the user to configure the scanner for an imaging session and to monitor signals during data acquisition.

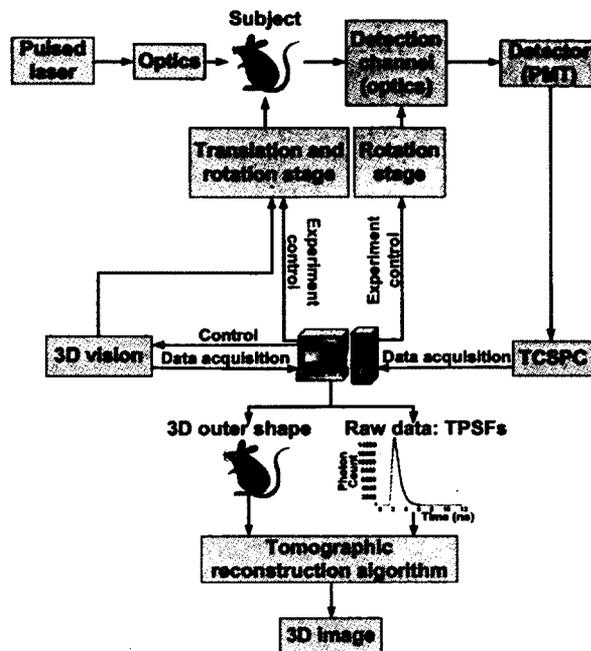


Figure 6.1 System overview.

## 6.4 Hardware

The scanner's hardware comprises electro-mechanics for multi-view data acquisition, electro-optics for TD measurements, opto-mechanics for NC detection, and a stereo camera rig for 3D outer surface shape metrology of the subject.

### 6.4.1 Electro-mechanics for multi-view data acquisition

The subject being imaged is placed vertically in our system at the upper end of a shaft (Fig. 6.4). A motorized rotation stage (Sigma Koki Co., Ltd, Japan) serves to rotate the subject around the vertical  $z$  axis (see Figs. 6.1 and 6.2). The subject can also be translated vertically along the  $z$  axis with a motorized translation stage (IAI Corp., Japan). This allows acquiring data for multiple laser injection points at different heights all around the subject. Such a configuration was chosen since it is easier to rotate the subject rather than the laser. Note that rotating the subject by an angle  $\phi_s$  with the laser beam being fixed in space is equivalent to rotating the laser beam around and injecting it into the subject at an angle  $-\phi_s$ . Vertical rotation of the subject, as opposed to horizontal, avoids physiological changes and anatomical displacements within the subject due to gravity.

The scanner has 7 dual detection channels with an inter-channel angular spacing  $\Delta\gamma = 40^\circ$  (Fig. 6.5). To cover all possible angles around the subject, the channels are mounted onto

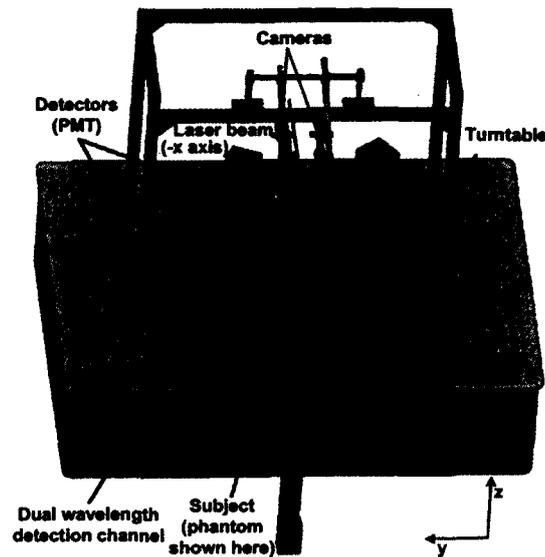


Figure 6.2 Mechanical design of the scanner which comprises 7 dual wavelength detection channels with 14 PMTs for DOT measurements and 2 cameras for measurements of the subject's surface in 3D.

a turntable (“detector turntable”) that can be rotated independently from the subject via a second motorized rotation stage (Parker Automation, USA). This way, for each laser injection point, detection can be made all around the subject, except for a small “blind” range spanning approximately  $30^\circ$  into which detection channels cannot be positioned, otherwise the laser beam would be blocked from reaching the subject. Previous versions of our scanner had few detection channels [Bérubé-Lauzière et Robichaud, 2007; Robichaud et Bérubé-Lauzière, 2008; Bérubé-Lauzière et Lapointe, 2010]. Having several now significantly reduces the data acquisition time, the relationship being linear with the number of detectors. This requires, however, that the channels be calibrated (Sect. 6.6).

Ideally, the rotation/translation axis of the subject determined by the shaft and the rotation axis of the turntable must perfectly coincide. Unless precautions are taken, this will not necessarily be the case, as both axes pertain to two different rotation stages, and these may be misaligned. To resolve this issue, we resort to a guiding hole (“shaft guide”) at the center of the turntable which is slide fit with the shaft (Fig. 6.4). At the lower end of the shaft, a double universal joint compensates for possible mechanical misalignment between the rotation stages and ensures that both can rotate freely without forcing against each other (due to the possibly high friction between the shaft and the shaft guide if the rotation stages' axes are not coincident). Apart from mechanical reasons, it is also important to have axes alignment in order to know precisely where the detection channels are positioned w.r.t. the subject as they are rotated around.



Figure 6.3 Photographs of the scanner.

### 6.4.2 Coordinate systems and related nomenclature

Before carrying on further with the hardware, we now discuss conventions used for coordinate systems used in the scanner, along with degrees of freedom and nomenclature relative to tomographic data, as these are closely related to the electro-mechanics just described. Because our system detects both excitation and fluorescence light, we will use an index  $l$  equal to "ex" or "fl" to respectively relate to these in the sequel. Index  $l$  will be called the *type of detection*.

#### Coordinate systems

As mentioned above, the  $z$  axis passes vertically through the center of the scanner. It coincides with the axes of rotation of both the subject and turntable. The positive sense of the  $z$  axis points upwards. By design and precise machining, the turntable's top surface

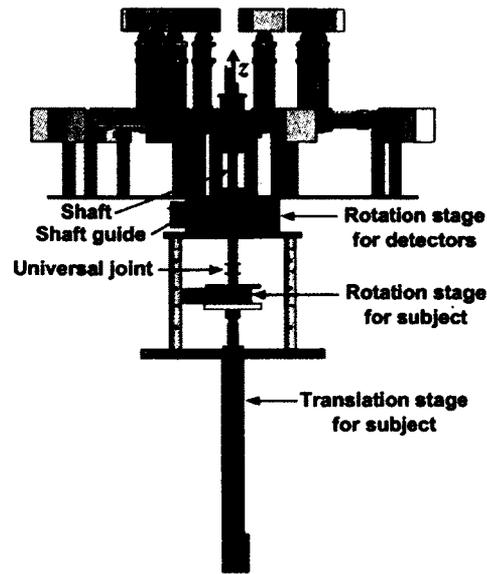


Figure 6.4 Side view of the scanner.

is perpendicular to the  $z$  axis, and so defines the  $xy$  plane. The origin of the coordinate system (CS) is defined as the intersection of that plane with the  $z$  axis. To set the  $x$  axis, two irises (not shown) at the same height as the optical axes of all detection channels above the turntable's surface are placed along a diameter of tapped holes on the turntable (dashed blue line in Fig. 6.5). The turntable is then rotated so that the laser beam can be aligned to pass simultaneously through the two irises using steering mirrors (not shown in the figures). The laser beam so aligned defines a fixed axis in space taken to be the  $x$  axis, with the beam directed along the negative  $x$  direction (Fig. 6.5). The rotation stage of the turntable can be zeroed with an offset so that the laser beam is aligned with another radius on the turntable, which will in turn correspond to the  $x$  axis (this offset is easy to obtain since the angle between radii of tapped holes is known). In practice, it is this radius, when the rotation stage of the turntable is zeroed, that serves as the  $x$  axis. For practical reasons, we take this radius by convention to be midway between two radii of tapped holes as shown in Fig. 6.5. Finally, the  $y$  axis is defined so that the three axes form a right handed set, which defines the world coordinate system (WCS). Note that the WCS stays fixed in space at all times.

We also have the detectors CS (DCS) attached to the detector turntable. It coincides with the WCS when the turntable is zeroed, and is related to the WCS via the angle  $\phi_D$  by which the turntable is rotated counterclockwise around the  $z$  axis (Fig. 6.5 - index "D" stands for "detector turntable"). The angle  $\phi_D$  is specified relative to the  $x$  axis of the WCS;  $\phi_D = 0$  when the turntable is zeroed.

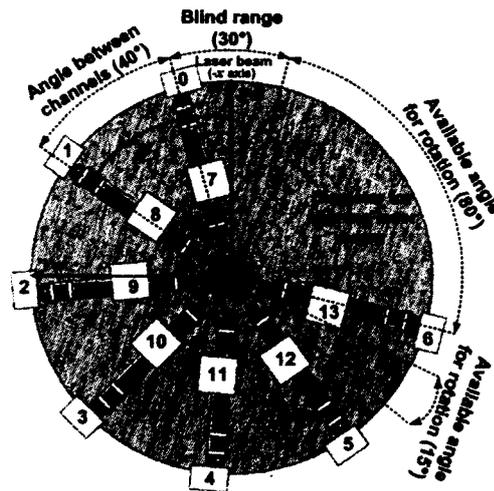


Figure 6.5 Top view of the scanner showing the different axes and angles related to coordinate systems. The  $z$  axis, common to all coordinate systems, comes out of the page;  $x_W$  and  $y_W$  refer to the  $x$  and  $y$  axes of the world coordinate system (WCS). Angles  $\phi_D$  (in red) and  $\phi_S$  (green) refer to the angles of rotation of the detector turntable and subject coordinate systems relative to the WCS.

Finally, we have the subject CS (SCS) attached to the subject. It is related to the WCS through an angle of rotation  $\phi_S$  around the  $z$  axis of the WCS, and a displacement  $\Delta z_S$  along the WCS  $z$  axis. The angle  $\phi_S$  is the amount by which the SCS is rotated counter-clockwise w.r.t. the WCS and is measured from the WCS  $x$  axis, and  $\Delta z_S$  is the amount by which the SCS is translated w.r.t. the WCS origin. When  $\phi_S = 0$  and  $\Delta z_S = 0$  the SCS coincides with the WCS. Usually, image reconstruction is carried in SCS coordinates, and images and results are displayed in the SCS.

### Tomographic data

From the previous description, our scanner possesses three degrees of freedom (Fig. 6.4) : 1) rotation of detection channels over almost  $360^\circ$  around the medium, 2) rotation of subject over  $360^\circ$  around the vertical axis, and 3) vertical translation of subject along  $z$ . As such, our scanner allows highly flexible and rather complete acquisition of TD optical tomographic data sets by varying these degrees of freedom.

With our system, we define a *tomographic projection* to be the set of TD optical measurements made at a set of detection angles for a given laser injection point. Due to the two types of measurements, there are also two types of projections : those for excitation light ( $l = ex$ ) containing XTPSFs, and those for emitted fluorescence ( $l = fl$ ) containing FTPSFs.

### 6.4.3 Electro-optics for time-domain measurements

A mode-locked Ti :Sapphire laser (Tsunami, Spectra-Physics, USA) emitting short laser pulses (pulse width 4 ps, repetition rate 80 MHz) is used to illuminate the subject and excite fluorescence therein. The laser is wavelength tunable in the therapeutic window from 700 nm to 1000 nm. This provides high flexibility to image different fluorescent probes in the NIR. We operate our laser in the picosecond regime, but it can also be set up to emit 100 fs pulses (fs regime). The laser can also be operated in CW mode if required. The max power output by the laser is 1 W nominal at 800 nm. To steer the laser beam to the subject (Fig. 6.6), we work as much as possible with reflections off optical components to minimize temporal distortion of the light pulses in the event that we work in the fs regime. We resort to wedged glass plates and front surface mirrors for this (Thorlabs Inc., USA). On its way, part of the laser beam is directed to a fast PIN photodiode for TCSPC timing, and to an autocorrelator (PulseCheck, APE GmbH, Germany) to measure the laser pulse width. The laser power incident onto the subject can be attenuated by a motorized circular variable neutral density (ND) filter (Edmund Optics, USA). The laser power incident on the subject is typically on the order of 10 mW. A shutter in the laser beam path also allows blocking the beam from reaching the subject.

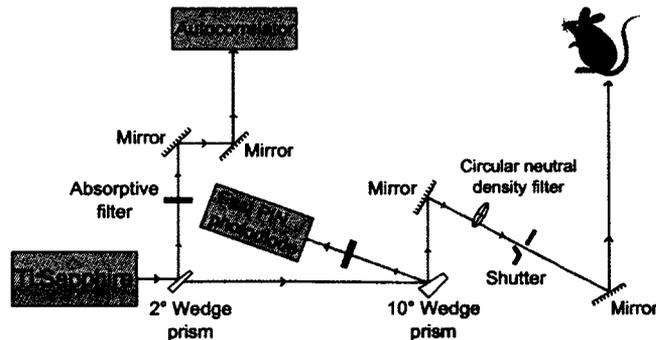


Figure 6.6 Optical path of the laser light before hitting the subject (not to scale - secondary reflections in the prism are not shown).

To obtain the high sensitivity and high temporal resolution needed for measuring the short TPSFs typical of small animal imaging (refer back to Sect. 6.2.2), we resort to TCSPC (see Becker [Becker, 2005, (1st Ed.) for an in-depth comprehensive treatment of TCSPC). This is achieved with an SPC-134 stack of 4 PCI computer plug-in cards (Becker&Hickl GmbH (bh), Germany). Each card can achieve an electrical temporal resolution of 6.6 ps FWHM. Refer to Becker's handbook [Becker, 2010 (4th Ed.) for more details on the SPC-134 and how it can be set up for a TD DOT system. The detectors used (14 in our scanner) are PMC-100-20 PMT modules (bh) with a transit time spread (TTS) specified at  $\approx 180$  ps

FWHM. Each of these modules is based on a Hamamatsu H5773 photosensor module which uses a R7400U-20 miniature metal package PMT (photocathode diameter = 8 mm). The PMC-100-20's are thermo-electrically cooled to reduce dark counts. The reference signal from the laser is obtained with a fast PIN photodiode (PHD-400N, bh) connected to the STOP input of the TCSPC cards (operated in reversed START-STOP mode). Four routers (HRT-41, bh), one for each card, allow connecting up to 4 PMT modules to each card for a maximum of 16 detection channels.

#### 6.4.4 Opto-mechanics for non-contact detection

Optical design and analysis of our channels was carried out with the ZEMAX<sup>®</sup> software, and mechanical design with SolidWorks<sup>®</sup>. Optical signals at the fluorescence and laser excitation wavelengths are detected in a non-contact manner at a distance from the subject. Fig. 6.7 depicts a dual wavelength detection channel to achieve this; free-space optics are used throughout. All optical components (lenses, filters, and irises) are placed in tubes to protect the channels from ambient and stray light contamination. For each channel, the subject is nominally positioned at a focal distance from the first lens (more on this below). Achromatic doublet lenses (nominal focal length  $f = 50$  mm - Thorlabs, USA) are used exclusively so to be able to image different fluorophores without having to change lenses (and rebuild the whole channel!). All lenses are AR coated for the range between 650 nm and 1050 nm. A dichroic beamsplitter (Semrock, USA) separates fluorescence and excitation light and redirects these respectively to the channel's horizontal (fluorescence) and vertical (excitation) arms. The dichroic beamsplitter has a reflection band from 749 nm to 790 nm and a transmission band from 813 nm to 885 nm. This is suited to indocyanine green (ICG - peak absorption at 780 nm and peak emission at 830 nm), the fluorophore used in our experiments. In each arm, an iris with a calibrated aperture of 1 mm is placed at a focal distance behind the second lens. The PMT detector is in turn positioned behind the iris at a distance such that the whole of its photocathode is illuminated considering the numerical aperture (N.A.) of the optical channel (N.A. = 0.136; acceptance angle 7.83°). Each arm in combination with the shared front-end of the detection channel forms a condenser pair configuration with unit magnification as the lenses at both ends have the same focal length. Between the lenses, light is collimated allowing the use of filters to select parts of its spectrum. During assembly, the detection channels are aligned using the laser beam which defines a fixed axis in space as discussed above in Sect. 6.4.2.

As excitation light entering a channel can be several orders of magnitude stronger than fluorescence light, and since the dichroic filter is not perfect at separating excitation and

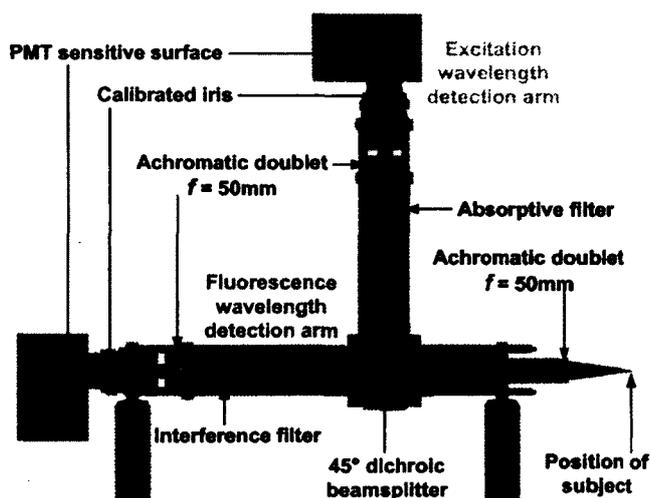


Figure 6.7 Optical layout of a dual-wavelength detection channel. For each optical path (laser excitation (green) and fluorescence (blue)) the lenses form a condenser pair with unit magnification.

fluorescence light, a high-pass interference filter (Semrock, USA) is used in the fluorescence arm to further block excitation light and let fluorescence light through. In the excitation arm, a neutral density (ND) absorptive filter (Thorlabs, USA) is used to further attenuate light and ensure that the photon flux does not saturate or damage the PMT, and that it is sufficiently small to make the probability to detect multiple photons during each laser cycle negligible (single photon counting regime [Becker, 2005, (1st Ed.)]). The optical density (OD) of the filter used depends on the detection channel's position on the turntable. Larger values are used for channels that acquire signals closest to the laser beam (channels 7 and 13 in Fig. 6.5).

In principle, the best would be to detect light from a smallest possible surface element on the subject. This would reduce the complexity in modeling light collection at the subject's surface, for then the element would be highly localized and could to a good approximation be considered planar (moreover, it could also be fitted within a surface element when the finite element method is used as part of the tomographic image reconstruction process [Bouza Domínguez et Bérubé-Lauzière, 2011]). However, too small an element prevents enough light to be collected. As a trade-off between a small enough nominal detection spot and a sufficiently high photon counting detection rate, in practice we designed for a spot of 1 mm when the subject is at the nominal distance from the detection channel. With our unit magnification condenser pair configuration, this explains the 1 mm iris in front of the detector in our channels.

Another important aspect to consider are the shape variations of a small animal which is not a cylindrical object. It was mentioned above that the subject is nominally positioned at a focal distance from the first lens of the channel. Due to these shape variations, this will not necessarily be the case in practice : the distance between a given detection channel (first lens) and the subject will change depending on where on the subject detection is made. As a consequence, the size of the detection spot on the subject's surface will vary and may be out of focus.

The previous considerations call for an optical system with a large depth-of-focus (ideally infinite) so that the detection spot does not vary significantly while the subject to detection channel distance changes. An infinite depth-of-focus is possible with a telescope configuration, but then the acceptance angle becomes infinitely small resulting in very little light being collected. For this reason, as a compromise we designed our channels with lenses having a somewhat large nominal focal length of 50 mm and a relatively small cone of acceptance of  $7.83^\circ$ .

To analyze defocus due to subject shape variations, Fig. 6.8 displays fractional vignetting as a function of the spot diameter on the object for different object/lens distances. This was obtained with ZEMAX and for the present situation fractional vignetting (definition given in ZEMAX) can be considered as the percentage of rays coming from an object plane and incident upon the entrance pupil which make it through all apertures in the optical system and reach the PMT via the iris. Our system is designed and optimized for

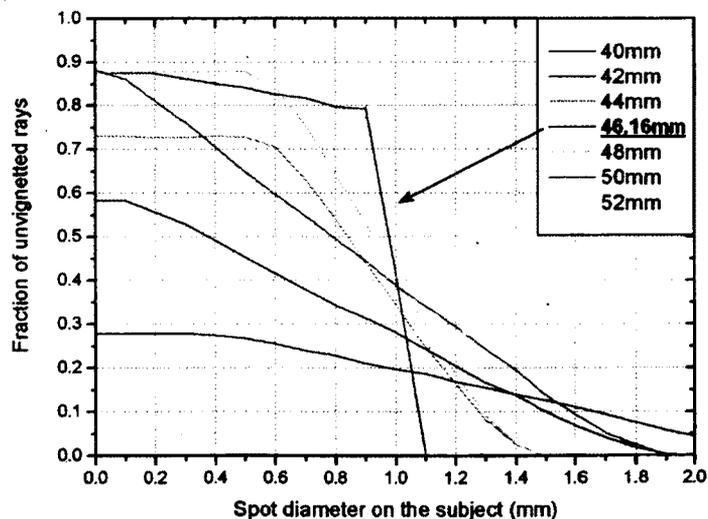


Figure 6.8 Fraction of unvignetted rays vs spot diameter on subject.

a spot diameter of 1 mm at a distance equal to one back focal length (b.f.l.) from the first

lens (b.f.l. = 46.16 mm). Considering the curve for the distance 46.16 mm in Fig. 6.8, this is why for spot diameters smaller than 1 mm a large portion of rays are not vignetted, whereas above 1 mm, this fraction rapidly drops to zero. Due to vignetting, the density of rays that reach the iris will not be the same depending on the radial distance from the optical axis from which rays emerge from the object. Fig. 6.8 also shows that for a range of  $\pm 6$  mm about the b.f.l. distance from the first lens (46.16 mm), the spot diameter on the subject for which rays make it to the PMT is always smaller than 2 mm. This analysis allows quantifying the size and profile of the spot seen on the subject by the detection system w.r.t. the distance of the subject from the first lens.

### 6.4.5 3D outer surface shape metrology

As discussed earlier, measuring the outer shape of the subject is a necessity in an NC architecture. Outer surface measurements can be carried optically by a number of 3D CV techniques involving structured illumination of the object to be imaged, such as spot ranging, light striping (also called laser profilometry), or projected encoded patterns [Klette *et al.*, 1998] as exemplified in other DOT systems [Schulz *et al.*, 2004; Advanced Research Technologies (ART), 2004; Xenogen Corporation, 2005; Comtois et Bérubé-Lauzière, 2008].

The design of our 3D CV system is dictated by our scanner's architecture that uses rotation and translation stages for acquiring DOT data around the subject. To obtain the subject's 3D outer surface shape, we developed an optical metrology system using a stereo camera pair [Comtois et Bérubé-Lauzière, 2008] depicted in Fig. 6.9 (left) in its simplest expression in a situation where a validation shape is to be scanned; Fig. 6.9 (right) shows the system when integrated into the DOT scanner. For scanning mice, two stainless steel posts (diameter = 2.4 mm (0.094 in), height = 203.2 mm (8 in)) are fixed at a distance from the center of the rotation stage to attach the animal's limbs. Each camera (*Flea*, Point Grey Research, Canada) acquires, for each subject position, an image in which the laser spot is visible on the subject. The positions of the laser spot found in the 2 images allow computing its 3D position by triangulation. A 3D model of the outer surface is then formed by meshing the cloud of 3D points so acquired. The mesh is easy to generate as the cloud is highly structured since the points are acquired in an ordered manner around the subject at regularly spaced increasing angles, and successive heights.

Our 3D CV system has the advantage of using the same laser beam, thereby reducing overall system complexity. This configuration allows simultaneous surface and DOT measurements, which reduces acquisition time. An additional benefit is to measure the exact position where laser light penetrates the subject, while others [Schulz *et al.*, 2005; Delio-

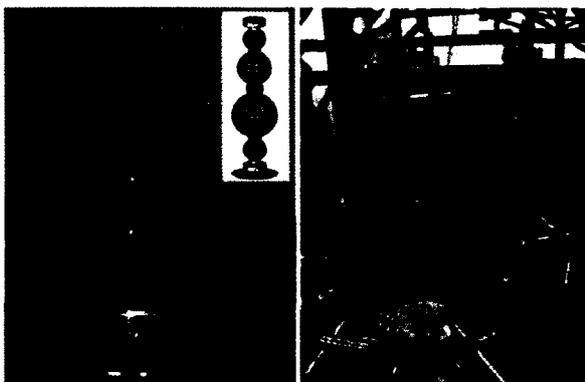


Figure 6.9 Photographs of the 3D computer vision (CV) system. Left : In its simplest expression and with a validation shape as object. The validation shape (see inset) consists of precision machined spheres with known radii ; it is used to validate 3D reconstruction (see below). Right : 3D CV system integrated into the scanner.

lanis *et al.*, 2007] indirectly infer this position with less accuracy. This exact position is required in DOT algorithms [Arridge, 1999].

To do metric measurements with a stereo camera pair, the stereo rig needs to be calibrated. This means determining the so-called intrinsic and extrinsic parameters of the cameras used. Intrinsic parameters refer to a camera's lens focal length, principal point, skew coefficient, and distortions (often related to lens optical aberrations). Extrinsic parameters refer to the position and orientation of a camera in space with respect to a reference coordinate system. Intrinsic and extrinsic parameters of the cameras in our stereo system are determined using Bouguet's well-documented, easy to use, and freely available Matlab Camera Calibration Toolbox [Bouguet, 2010] ; there is no need to discuss this more amply here. Integration of the stereo rig into the scanner further requires that both the rig and scanner use a common coordinate system, and that the axis along which the subject is rotated/translated in the scanner be precisely known to the stereo rig. To achieve this, we devised a technique, described elsewhere [Comtois et Bérubé-Lauzière, 2008] which resorts to a custom designed precisely machined plate that can be mounted with high precision at the top end of the rotation/translation shaft of the scanner. On this plate, a checker board can be fixed, which at zero angle and zero height defines the common coordinate system. This checker board, when rotated and translated, also allows calibrating the axis of rotation/translation. We refer here the reader to the above-cited reference for mathematical formulas and implementation details of the approach.

Fig. 6.10 displays the exact model obtained from the SolidWorks drawing of a validation shape we use, and its reconstruction with our stereo CV system. A quantitative comparison shows that the reconstruction differs from the model by at most 0.5 mm on the four larger spheres (there are discrepancies at the junctions between these spheres because these junctions could not be machined exactly according to the drawings; thus the junctions are excluded from this analysis). Fig. 6.11 shows a reconstruction of a mouse's torso. The mouse scanned was a hairy dead mouse that was frozen laying on its belly, hence the flat belly and the textured back in the 3D reconstruction.

## 6.5 Software

Data acquisition and hardware control are completely automated through custom software and a GUI we developed using the LabVIEW<sup>TM</sup> programming environment (National Instruments, USA).

### 6.5.1 Graphical user interface

The GUI, illustrated in Fig. 6.12, allows configuring the scanner's internal hardware (TCSCP settings, number of active detectors, offsets to zero the rotation and translation stages) along with parameters related to an imaging session such as ranges and step sizes of displacements (rotation of subject and of detection channels, translation of subject), photon counting collection time, and position of the circular variable ND filter to attenuate laser light. The GUI also provides real-time feedback on the acquired signals as measurements are in progress : actual position of subject and detectors, elapsed time of experiment, photon counting rates, and graphs of TCSPC histograms (TPSFs) - with the possibility of selecting which graphs to display during acquisition. The GUI also provides for complete manual control of the scanner (not displayed), a feature useful for development and testing.

### 6.5.2 Data acquisition and hardware control

A flow chart of data acquisition and the associated hardware control is depicted in Fig. 6.13. For each position of the subject ( $\Delta z_s, \phi_s$ ), a stereo pair of images is acquired to calculate in 3D the point ("laser spot") where the laser beam impinges. Normally, the beam hits the subject, but it may happen that it misses it. If so, then nothing is done, and the object is rotated to its next position. This is repeated until a spot is found on the subject. Then, a verification is made to see if a tomographic projection at the current object angle  $\phi_s$

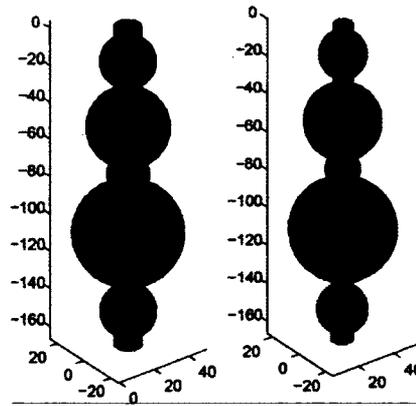


Figure 6.10 Left : Model of the validation shape. Right : Reconstructed validation shape with the 3D CV system.

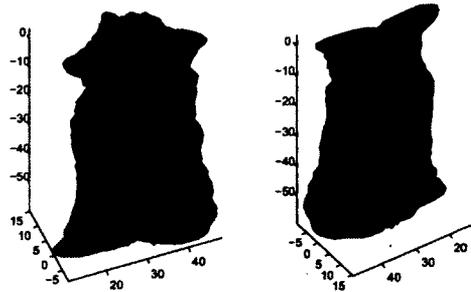


Figure 6.11 Reconstruction of a mouse's torso. Left : Mouse belly. Right : Mouse back.

shall be acquired. In the affirmative, the projection is acquired by stepping the detector turntable over the specified angular range (maximum  $40^\circ$ ), and the XTPSFs and FTPSFs are acquired via TCSPC for each angular position. The previous verification is necessary since more points on the surface of the subject are required to reconstruct its outer shape, than there are tomographic projections that are acquired (typically, tomographic projections will be acquired at every 5 or 10 degrees, whereas the outer surface is meshed at every 1 or 2 degrees). Once a slice has been processed (*i.e.*  $\phi_S$  has been varied over its whole range, typically  $260^\circ$ ), the subject is translated to the next slice. The whole process is repeated until the object has been translated over the specified range along  $z$ .

Acquisition time strongly depends on the experiment's configuration, *i.e.* step and range selected for each stage, and TCSPC collection time. To give an idea, a complete scan for a TCSPC collection time of 1 s, over a height of 2 cm at steps of 2 mm, with ranges of  $360^\circ$  for the subject and  $30^\circ$  for the detector turntable, and with angular steps of  $10^\circ$  for



Figure 6.12 GUI of the scanner illustrating a case where 4 fluorescence and 6 excitation detection channels were used (green and red circles ON at the bottom left of the GUI).

both subject and detectors takes approximately 50 minutes (*i.e.* about 4.5 minutes for each slice at a given height comprising a total of 108 measurements).

The software also allows to : 1) activate the autocorrelator for periodically measuring the laser pulse width during data acquisition, 2) open and close the shutter (Fig. 6.6) so as to not illuminate the subject while no measurement is being made (such as when the subject and detectors are being displaced) - in this manner, the subject is not unnecessarily exposed to laser light which also prevents fluorescent agents from bleaching prematurely ; 3) carry out measurements at a constant photon counting rate via feedback control of the variable ND filter that attenuates the laser beam.

## 6.6 Calibration

The detection channels need to be calibrated to account for temporal shifts between them and differences in their detection efficiencies if absolute measurements are needed. This section addresses these issues, but before, we describe the phantom used in the calibration procedure and in the experiments presented later. We also describe a technique - numerical constant fraction discrimination - for measuring the arrival time of diffused light pulses that will be used in the sequel.

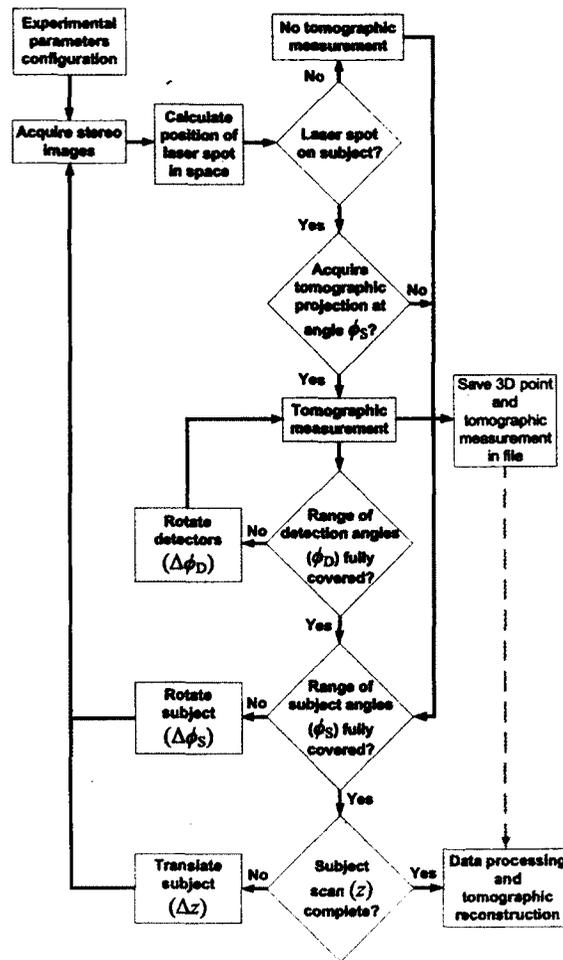


Figure 6.13 Flow chart of data acquisition and associated hardware control.

### 6.6.1 Phantoms

To simulate tissue optical properties, we use a phantom made of a 5 cm outer diameter (O.D.) cylindrical glass tube (wall thickness = 1.5 mm, height = 12 cm) filled with a 48 :1 (V/V) aqueous dilution of Intralipid<sup>®</sup> 20% (Baxter), see Fig. 6.14 (left). This suspension liquid yields a reduced scattering coefficient  $\mu'_s = 5 \text{ cm}^{-1}$  [Ripoll *et al.*, 2002].

### 6.6.2 Numerical constant fraction discrimination

In highly scattering media as used here, an ultra-short light pulse injected into it will propagate as a diffused pulse that temporally broadens due to scattering. To measure the arrival time of a pulse's wavefront, we resort to numerical constant fraction discrimination (NCFD), a technique we developed earlier [Bérubé-Lauzière et Robichaud, 2007]. NCFD

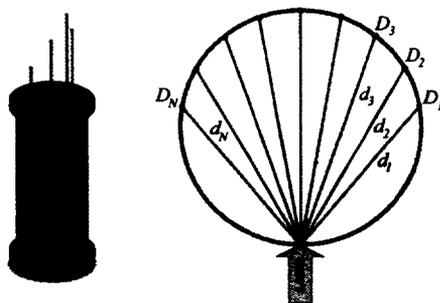


Figure 6.14 Left : Phantom made of a glass cylinder filled with an aqueous dilution of Intralipid (illustrated here with fluorescent inclusions embedded in it and used in some experiments, see the results section - Sect. 6.7.1). Right : Measurement configuration for determining the absolute offset of the reference channel (Sect. 6.6.5).

allows obtaining in a stable manner from a TPSF the arrival time of early photons (early photons arrival time - EPAT) which define the wavefront. In a homogeneous phantom as above, a diffuse pulse will to a good approximation be spherical, with the speed of the pulse's wavefront being almost constant (denoted by  $v_{avg}$  [Bérubé-Lauzière et Robichaud, 2007]). Using EPATs, we measured wavefront speeds of about 1/10-th of the speed of light in vacuum [Bérubé-Lauzière et Robichaud, 2007]. More exactly, for the phantom and wavelengths used here, we obtained  $v_{avg,ex} = 3.72$  cm/ns at 780 nm and  $v_{avg,fl} = 3.91$  cm/ns at 830 nm. EPATs and wavefront speeds will be used in the sequel.

### 6.6.3 The calibration problem

Given a position on a static object, the measurement of a signal made under the exact same conditions at that position by different detection channels of the same type ( $l = ex$  or  $fl$ ) should give the same result. This is not so in practice due to temporal shifts and gain variations across channels. Temporal shifts are caused by differences in cable lengths, delays in the electronics, and response times of the PMTs. Gain variations are due to the internal gain specific to each PMT, and to tolerances in the filters used. In our case, the latter are mainly observed in the  $ex$  detection channels which use absorbing neutral density filters. Moreover, in TD systems, a signal emanating from the object (to be called a "true" signal since it does not have the imprint of the measurement system) is temporally convolved with the instrument response function (IRF) of the detection channel used to measure it, with the IRF being dependent on several factors, notably the TTS of the PMT [Becker, 2010 (4th Ed.)]. The objective of calibration here is to obtain measurements freed as much as possible from the effects of the detection channels.

Mathematically, a measured signal  $v_k(t)$  obtained from a channel labeled by index  $k$  can be modeled as

$$v_k(t) = A_k \cdot IRF_k(t) \otimes u(t - \Delta t_k) + b_k(t), \quad (6.1)$$

with  $u(t)$  being the true signal from the object,  $A_k$  the gain specific to channel  $k$ ,  $\Delta t_k$  the time shift (or offset) it introduces on the signal,  $IRF_k(t)$  its instrument response function (whose maximum is considered normalized to 1), and  $b_k(t)$  the noise on the measurement accounting for Poisson statistics associated with photon detection, and detector noise;  $\otimes$  is the temporal convolution operator. Note that  $A_k$  and  $\Delta t_k$  could have been lumped into the IRF, but here we want to make as explicit as possible the parameters to be calibrated so as to correct for their effects on the measurements. Specifically, the calibration procedure will serve to determine  $A_k$ ,  $\Delta t_k$ , and  $IRF_k(t)$  for all  $k$ ; we assume the noise is small and can be filtered out (which we actually always do [Bodi, 2010]).

#### 6.6.4 Calibration measurements

Two experiments to acquire calibration data were repeated with the laser wavelength tuned at 780 nm and then at 830 nm (wavelengths of interest for ICG). Note that if other wavelengths need to be considered, *e.g.* for other fluorophores, the same procedure must be carried at these wavelengths.

The first experiment consists in measuring the IRFs of all the channels. For this, each channel is positioned at  $180^\circ$ , *i.e. en face* the laser beam, with the latter entering straight into the channel after being strongly attenuated with a stack of ND filters so as to be in the photon counting regime and not damage the detector (no diffusing object is placed in the laser path). IRFs measured in the first experiment are shown for both wavelengths (*ex* or *fl*) in Fig. 6.15. At 780 nm, IRF FWHMs vary from 116 ps to 285 ps with an average of 195 ps, and at 830 nm, these values are 114 ps to 256 ps with an average of 169 ps. Note that depending on the number of ND filters used for measuring each channel's IRF, a correction for the time shift introduced by the thickness of glass of the filters has been applied using the formula  $\Delta t_{\text{shift,glass}} = \eta_{\text{glass}} d_{\text{glass}} / c_0$ ;  $\eta_{\text{glass}} = 1.5$  is the index of refraction of glass,  $d_{\text{glass}}$  is the thickness of the stack of filters, and  $c_0$  is the speed of light in vacuum.

In the second experiment, all detection channels measure a TPSF at the same angular position about the cylindrical phantom described above. This is repeated for several angles, thus producing series of overlapping TPSFs at several angular positions about the phantom. Specifically, these TPSFs were acquired on a transverse slice at mid-height of the phantom ( $z = 54$  mm) for one angle of the subject at  $\phi_S = 0^\circ$ ; a single subject angle is

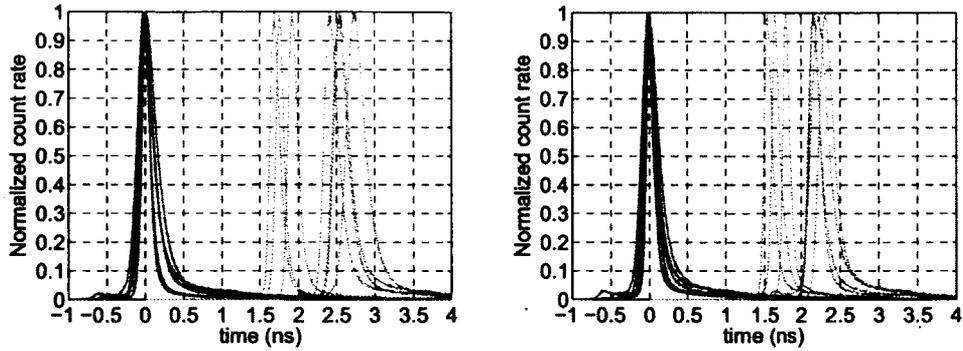


Figure 6.15 Left : Measured IRFs for arms of the detection channels  $k = 7, \dots, 13$  pertaining to the excitation wavelength ( $\lambda_{ex} = 780$  nm) : raw data with maximum normalized to 1 shown in green. Raw data shifted to a common maximum centered at time zero solely to aid visual comparison of the IRFs shown in red. Right : Same as left, but for the fluorescence path ( $\lambda_{fl} = 830$  nm,  $k = 0, \dots, 6$ ).

sufficient since the phantom is cylindrical. To get these series of measurements consisting of a total of 63 TPSFs for each wavelength, the turntable is rotated from  $\phi_D = 20^\circ$  to  $340^\circ$  in steps of  $40^\circ$  (for usual measurements, the turntable is rotated by at most  $40^\circ$ , *i.e.* the spacing between successive channels).

### 6.6.5 Procedure and data processing

For each type of detection channels (*ex* or *fl*), the calibration procedure consists in the following steps : 1) A detection channel is chosen to serve as a reference (we choose this reference to be  $k = 3$  for *fl* and  $k = 10$  for *ex*). 2) All IRFs are corrected for temporal shifts w.r.t. the IRF of the reference so as to be aligned with the latter based on their EPATs. 3) Each TPSF acquired in the second experiment is denoised and deconvolved from its respective shifted IRF obtained from the first experiment (denoising and deconvolution are performed using wavelets and Wiener filtering [Bodi, 2010]). Note that the IRFs corrected for temporal shifts are used for deconvolution since in our approach, we choose to refer all shifts to the reference channel, with such shifts being obtained next (would we not use the corrected IRFs, then the deconvolution would also shift the TPSFs). 4) For each angular position of detection, and for each  $k$ , the parameter  $A_k$  is first calculated so that the TPSF of channel  $k$  has the same amplitude as that of the reference. Then,  $\Delta t_k$  is determined so to provide for the best match in a least squares sense between the reference's TPSF and the TPSF of channel  $k$ . 5) The values for  $A_k$  and  $\Delta t_k$  obtained for all position of detection are averaged to find the parameters characterizing the detection channels.

At this point, all channels of a given type are calibrated relatively to their reference. In particular, the offsets  $\Delta t_k$  of all channels w.r.t. that reference are known. However, the absolute offset of the reference (AOR) is not known. As already mentioned, a TPSF measured by a given channel, the reference channel being no exception, contains delays due to light propagation in air (here outside the cylindrical phantom) and delays in the electronics. In using TD data, such as in tomographic reconstruction and fluorescence localization algorithms, it is the time photons propagate inside the medium that is of interest. Thus, such delays need to be characterized. The last piece required towards this end is the absolute offset of the reference channel to be denoted  $t_{\text{AOR}}$ . Once obtained, then we can write the final form of the offsets for each channel as  $\Delta t_k \leftarrow \Delta t_k + t_{\text{AOR}}$ .

To obtain  $t_{\text{AOR}}$ , measurements made by the reference channel at positions  $D_n$ ,  $n = 1, \dots, N$ , around the phantom are considered (see Fig. 6.14 (right); the data for such measurements are already available from the second experiment). The values  $d_1, \dots, d_N$  are the geometrical distances from the laser injection point to positions  $D_1, \dots, D_N$  respectively. Recall that in a highly scattering homogeneous medium such as used here, an ultra-short light pulse injected into it can to a good approximation be considered to propagate as a spherical diffused pulse. Using NCFD, the total time for the arrival of such a wavefront at a position  $D_n$  may be written as

$$t_n = \frac{d_n}{v_{\text{avg}}} + t_{\text{AOR}}. \quad (6.2)$$

Based on this equation, using two detection points having different geometrical distances  $d_n$  and  $d_m$ , we obtain

$$t_{\text{AOR}} = \frac{d_n \cdot t_m - d_m \cdot t_n}{d_n - d_m}. \quad (6.3)$$

Note that this last expression is independent from  $v_{\text{avg}}$ , hence its value being immaterial here. Computing this for several pairs of detection points and averaging gives the reference's absolute offset (the following values were obtained :  $t_{\text{AOR},ex} = 1.4510$  ns with a standard deviation of 0.1617 ns at 780 nm, and  $t_{\text{AOR},fl} = 1.3282$  ns with a standard deviation of 0.2364 ns at 830 nm). Fig. 6.16 shows results of the calibration process. As can be seen, once the channels are calibrated, their measurements overlap quasi perfectly as it should be. Note that the effect of deconvolving the IRFs from the signals is subtle, since IRFs are very narrow in our system.

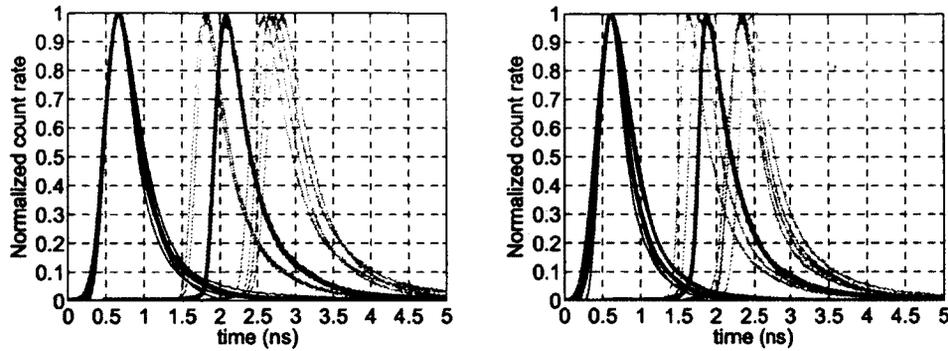


Figure 6.16 Left : In green, raw TPSFs for the laser excitation path (780 nm) acquired on the phantom with all channels making a measurement at the same angular position (here at  $180^\circ$  is shown - reference channel in magenta). In red are the same TPSFs, but denoised, and with IRFs and delays removed using the calibration data (reference in blue). Right : Same as left, but for the fluorescence path (830 nm).

### 6.6.6 Validation

To validate system calibration, data were collected on 3 different slices at  $z = 30, 35,$  and  $40$  mm. On each slice, 5 projections were acquired with  $\phi_S$  varying from  $0^\circ$  to  $320^\circ$  in steps of  $80^\circ$ . In each projection, together the detectors covered a range from  $20^\circ$  to  $340^\circ$  with some overlapping between detection channels by varying  $\phi_D$  in steps of  $10^\circ$  over  $90^\circ$  (*i.e.*  $50^\circ$  beyond the usual  $40^\circ$  range separating successive detection channels). The EPAT for each TPSF in these projections was calculated. Fig. 6.17 displays uncorrected and corrected EPATs using the calibration parameters. When corrected, EPATs from successive channels overlap, and overall EPATs are seen to smoothly distribute as it should be.

## 6.7 Results

In this section, we present results obtained with the scanner on the time-of-flight (TOF) localization of small fluorescent inclusions suspended in a thick scattering medium by exploiting EPATs. We also show results on the effect of an heterogeneous medium on EPATs. Such applications pose stringent requirements on the timing resolution of a TD system, and the capabilities of our scanner allows tackling such applications.

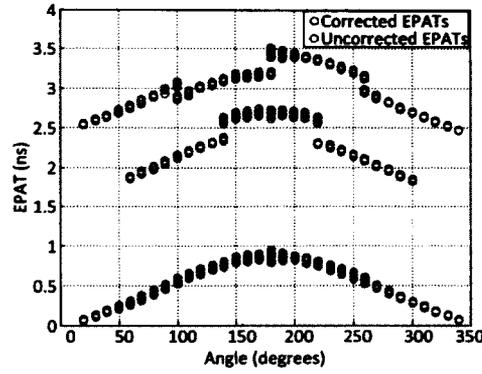


Figure 6.17 Uncorrected (red) and corrected (blue) EPATs for 3 tomographic projections acquired at 780 nm on the cylindrical phantom.

### 6.7.1 Fluorescence localization

#### Rationale

Consider a point-like fluorescent inclusion embedded in an otherwise homogeneous scattering medium. The goal is to localize that inclusion within the medium. We hereon refer to Fig. 6.18 (left) showing a slice of such a situation for one detection position about the phantom described previously. An ultra-short laser excitation pulse injected into the medium will temporally broaden due to scattering while propagating in the medium and reach the inclusion. The latter will in turn respond by emitting a spherical pulse of fluorescence diffusively expanding towards the boundary of the medium. The respective arrival times of this spherical pulse to different detection positions measured via EPATs of FTPSFs depend on the inclusion's depth relative to that position.

In practice, the EPAT measured by a given detection channel, as displayed in Fig. 6.18 (left), is the sum of various propagation times :  $t_{\text{EPAT}} = t_L + t_{\text{LP}} + t_{\text{PD}} + t_D + t_E$ , where :  $t_L$  is the travel time of the laser light outside the medium to reach its boundary entry point into the medium at L ;  $t_{\text{LP}}$  is the time from the laser entry point to the inclusion located at P ;  $t_{\text{PD}}$  is that for the fluorescence pulse to get from the inclusion to the detection point  $D$  on the boundary ;  $t_D$  accounts for the light travel outside the medium from the boundary to the detector (PMT) through the optics, and  $t_E$  represents electrical delays in cables and detection electronics. This is the analogue of Eq. 6.2 for the case of a fluorescent inclusion. The sum of the delays  $t_L$ ,  $t_D$  and  $t_E$  corresponds to  $\Delta t_k$  obtained by calibration (Sect. 6.6), with  $k$  the index of the channel considered. Subtracting out  $\Delta t_k$  ( $= t_L + t_D + t_E$ ) from  $t_{\text{EPAT}}$ , and using the speed at which diffuse pulses travel, we can thus obtain a measurement of the total distance the laser excitation and fluorescence diffuse pulses have traveled together :  $d_{\text{tot}} = d_{\text{LP}} + d_{\text{PD}} = v_{\text{avg,ex}} t_{\text{LP}} + v_{\text{avg,fl}} t_{\text{PD}}$ . Would the pulses travel a the same

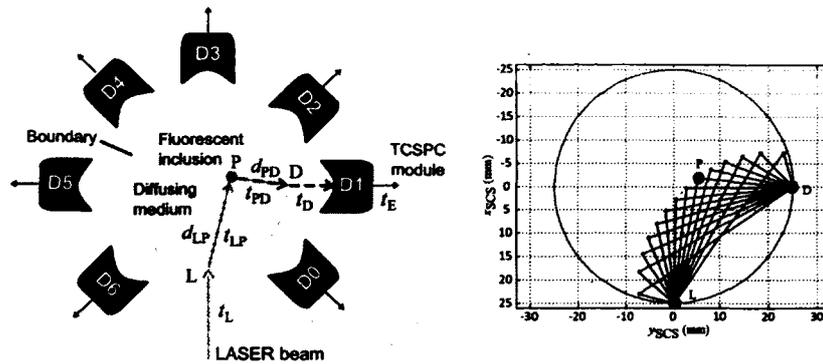


Figure 6.18 Left : Contributions to a measured EPAT for the light emitted by a fluorescent inclusion. Right : Oval on which the inclusion is to be found.

speed at both wavelengths  $\lambda_{ex}$  and  $\lambda_{fl}$ , this would be the equation of an ellipse in 2D (an ellipsoid in 3D) with foci at L and D [Pichette et Bérubé-Lauzière, 2010]. But, since the speeds differ, this is the equation of an oval in 2D (an ovoid in 3D) on which the inclusion is to be found (Fig. 6.18 (right)).

### Algorithm

In principle, two ovals in 2D (three ovoids in 3D) are sufficient to localize one fluorescent inclusion as the latter will be found at the intersection thereof. In practice we use the intersection of several pairs of ovals and a density map of these intersections. These ovals are obtained from several tomographic measurements to collect EPATs for a plurality of laser/detector relative positions around the medium (source-detector pairs). This multi-projection approach has the advantage to be amenable to the localization of several inclusions. Indeed, the peaks (local maxima) of the density map provide the most probable locations where inclusions are likely to be found. Fig. 6.19 (left) shows an example. When dealing with real world measurements, each oval for which the photon count rate at the detector is too low (below 10% the maximum count rate over all detectors) is discarded, because such measurements are not reliable. In the case of a plurality of inclusions, an EPAT measured at a certain detector is always determined by the inclusion with the shortest distance to this detector. This is so since early photons from the closest inclusion will arrive before those from the other inclusions, which will, therefore, not influence the EPAT. It is thus mandatory that various projections around the medium be acquired in order to be able to “see” all inclusions.

### Localization results

Fig. 6.19 (right) shows a typical localization result obtained with the scanner for a case where three fluorescent inclusions were placed mid-height in the medium. Each inclusion

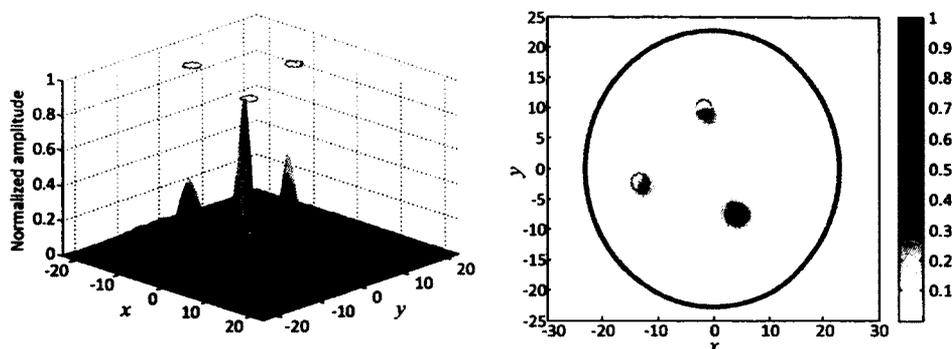


Figure 6.19 Left : Density map obtained from oval intersections showing the most probable locations (peaks) where inclusions are likely to be found. Right : Localization result for 3 inclusions.

is made of a small glass tube (O.D. = 4 mm, wall thickness = 0.5 mm, length = 10 mm, capped at both ends) filled with ICG (Fisher Scientific) at a concentration of  $10 \mu\text{mol/L}$ . Localization was carried with data from 36 projections with  $\phi_S$  varying over  $360^\circ$  at steps  $\Delta\phi_S = 10^\circ$ . Each projection contains 65 detection positions for  $\phi_D$  ranging from  $20^\circ$  to  $340^\circ$  with a detector step  $\Delta\phi_D = 5^\circ$ . As given in Table 6.1, the inclusions are localized within a maximum of 1.3 mm to their true positions. These are high accuracy results considering the size (5 cm diameter) and the diffusivity ( $\mu'_s = 5 \text{ cm}^{-1}$ ) of the medium. It can be appreciated that this localization approach relies on highly accurate measurements of small time intervals. As such, it requires extremely high timing accuracy and stability, which our scanner is able to achieve, as demonstrated by the accurate localization results obtained. Note that our localization approach does not assume an *a priori* known number of inclusions; it is able to find them automatically. Further details on the localization technique presented here and further results are given elsewhere [Pichette et Bérubé-Lauzière, 2010].

### 6.7.2 Effects of an heterogeneous medium on EPATs

In this section, the goal is to measure how EPATs change due to a scattering heterogeneity. Here, measurements are carried at the laser wavelength. The phantom used is depicted in Fig. 6.20. The same cylindrical tube as before is used except for a large inclusion with

Tableau 6.1 Localization result corresponding to Fig. 6.19.

Incl.	True position	Recovererd position	Distance error (mm)
	( $x, y$ ) (mm,mm)	( $x, y$ ) (mm,mm)	
1	(-1.7365, 9.8481)	(-1.517, 8.546)	1.3205
2	(-13.2949, -2.3443)	(-13.18, -3.124)	0.7881
3	(4.8357, -7.5905)	(4.315, -7.792)	0.5583

different scattering properties at the center. Five experiments were performed each with

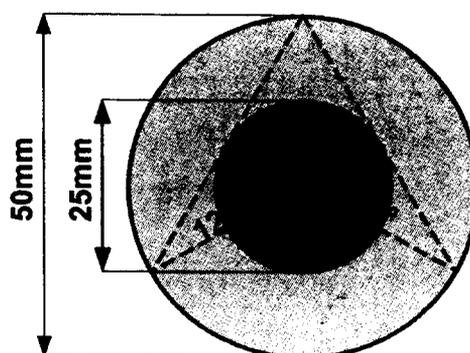


Figure 6.20 Schematic (top view) of the heterogeneous medium consisting of two concentric glass tubes filled with different concentrations of aqueous dilutions of Intralipid (Outer tube : diameter = 50 mm, wall thickness = 1.5 mm, height = 12 cm. Inner tube : diameter = 25 mm, wall thickness = 1 mm, height = 12 cm). The larger glass tube is always filled with a 48 :1 (V/V) aqueous dilution of Intralipid.

a different degree of scattering inside the inner tube. Fig. 6.21 shows the results. Each experiment used data from 18 tomographic projections ( $\phi_S$  ranging from 0 to 340° in steps of 20°) on a single transverse slice ( $z = 54$  mm) and 63 angular positions of detection in each projection ( $\phi_D$  ranging from 20° to 340° in steps of 10°).

In Fig. 6.21, the EPATs curve (a) corresponds to no inclusion inside the medium. Curve (b) shows the effect on EPATs of the glass of the inner tube only as both tubes are filled with the same concentration of Intralipid. Since there is no scattering inside the glass, the diffused photons wavefront propagates faster within the glass, and the global effect is to slightly reduce EPATs. Smaller EPATs occur when the inner tube is filled with a lower concentration of Intralipid as (c) shows because less scattering allows the diffuse wavefront to propagate faster. This culminates when the inner tube is filled with air as curve (d) shows. Finally, increasing scattering (higher concentration) slows the diffuse wavefront as (e) shows (here a fourfold concentration is used ; the curve is noisier because signals are fainter). As seen in Fig. 6.21, all EPATs agree well in the detection angle ranges  $[0^\circ, 120^\circ]$  and  $[240^\circ, 360^\circ]$  (these ranges are delimited by the bold vertical bars in the figure). This can be explained by the fact that the shortest path between the laser excitation and detection points does not pass through the small glass tube in these ranges (see Fig. 6.20). These results on the variation of EPATs with heterogeneities are a first step towards the development of full tomographic algorithms that will use EPATs as input.

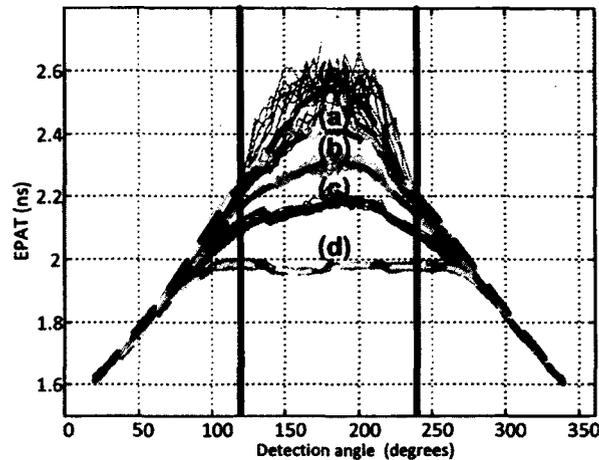


Figure 6.21 EPATs at the laser wavelength : a) Without inner smaller glass tube (whole medium consists of a homogeneous 48 :1 (V/V) aqueous dilution of Intralipid). b) Inner glass tube filled with a 48 :1 (V/V) dilution of Intralipid. c) Inner glass tube filled with a 96 :1 (V/V) dilution (low concentration) of Intralipid. d) With inner small glass tube filled with air. e) Inner glass tube filled with a 12 :1 (V/V) dilution (high concentration) of Intralipid.

## 6.8 Discussion and conclusions

We described a complete NC TD DOT scanner capable of simultaneous multi-view tomographic and surface measurements acquired with the same laser beam. Surface measurements allow obtaining the outer shape of the subject as needed in an NC architecture. The scanner includes 7 free-space optics NC dual wavelength detection channels comprising 14 detectors. These allow measurements of TPSFs at both excitation and fluorescence wavelengths. To-date, this is the most extensive multi-view NC DOT scanner resorting to TD measurements in terms of the number of detectors used and the full range of detection angles covered around the subject. Referring to Fig. 6.5, with this scanner's configuration and the design of the detection channels, the number of dual-wavelength detection channels could be further increased to a maximum of 10. Further detection channels to decrease acquisition time could be packed in by resorting to smaller optics, or to larger focal lengths for the first lens of the channels. However, the trade-off would then be a reduced collection efficiency. Adding further channels to our scanner will be the subject of further work.

Our scanner, through the design choices made, shows an unprecedented temporal resolution for a multi-view dual-wavelength TD scanner (IRF  $\approx 200$  ps FWHM on average). The key factors to achieve this are the use of : 1) an ultra-short Ti :Sapphire solid-state laser system instead of pulsed laser diodes (it must be noted however, that the use of such a laser

adds considerably to the system's cost), 2) free-space optics throughout, which minimizes temporal dispersion of optical signals, and improves the sharpness of the IRF, as compared to other systems using fiber optics in their signal paths [Kepshire *et al.*, 2009; Montcel et Poulet, 2006], 3) high temporal resolution TCSPC electronics, in conjunction with 4) low transit time spread PMTs. For comparison, Poulet's group report a system with an IRF of 260 ps using TCSPC, MCP-PMTs and optical fibers [Montcel et Poulet, 2006]. The Dartmouth group described a 5 dual wavelength detection channels NC scanner to be used in conjunction with a commercial X-ray CT scanner [Kepshire *et al.*, 2009]. Their scanner uses optical fibers and a red-enhanced PMT in the detection channels. It achieves a temporal resolution of  $\approx 465$  ps. To our knowledge, the only TD system that surpasses the temporal resolution of our scanner is that of Niedre's single view transillumination NC free-space optics system [Valim *et al.*, 2010] (IRF 163 ps FWHM) which resorts to a supercontinuum pulsed fiber laser (pulse width  $\approx 30$  ps) and TCSPC with preselected PMT modules for temporal resolution (150 ps). This system, which measures a single wavelength at a time, is an adaptation of an earlier system that used a gated intensified CCD (ICCD) camera with 200 ps gate widths and 25 ps temporal step size [Niedre *et al.*, 2006; Niedre et Ntziachristos, 2010]. Culver's group has developed a similar transillumination system for fluorescence lifetime tomography with minimum 300 ps gate widths [Nothdurft *et al.*, 2009]. Kumar *et al.* have also developed a time-gated ICCD system [Kumar *et al.*, 2008] with a reported IRF of 300 ps FWHM.

Clearly the detectors we use, with their TTS of  $\approx 180$  ps, are the limiting factor to the temporal resolution we obtain. Had we used detectors with a lower TTS, such as micro-channel plate PMTs (MCP-PMT - TTS  $\approx 35$  ps) as others do [Montcel et Poulet, 2006], or single photons avalanche diodes (SPADs - TTS  $\approx 35$  ps) [Cova *et al.*, 2006] for TCSPC as we have already proposed [Bérubé-Lauzière *et al.*, 2007], we could easily bring the IRF to below 50 ps. To us, SPADs appear as the best alternative for the future, as they are much less costly than MCP-PMTs, as well as being much less fragile.

Results obtained with our scanner on the localization of fluorescent point-like inclusions immersed in a diffusing medium were presented. The localization algorithm relies on distance ranging based on the measurement of early photons arrival times at different positions around the subject. Achieving this requires exquisite timing resolution and accuracy. This capability was further exploited to show the effect of a scattering heterogeneity on the arrival time of early photons. Our scanner integrates everything necessary for providing TD data and surface measurements for full tomographic reconstruction algorithms that are under development in our laboratory [Bouza Domínguez et Bérubé-Lauzière, 2011].

Results of 3D image reconstructions on mice obtained with such a tomographic algorithm exploiting high temporal resolution TD measurements made with our scanner will be the subject of a forthcoming paper.

**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 needed for 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. Yves Bérubé-Lauzière is member of the FRSQ-funded Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel.

# CHAPITRE 7

## CONCLUSION

Pour conclure ces présents travaux de recherche, on commence par présenter un sommaire des contributions et des résultats importants. Enfin, quelques travaux futurs à réaliser sont décrits et les perspectives d'avenir sont présentées.

### 7.1 Sommaire

L'objectif principal de ce mémoire concerne la conception et la réalisation optique, optomécanique et électro-mécanique de la 2<sup>ième</sup> version du scanner *TomOptUS*. Au chapitre 2, on a décrit les bases de la tomographie optique diffuse. L'absorption, la diffusion, la fluorescence, les géométries de scanners, les types de mesures et les systèmes de TOD existants sont les aspects abordés. Ce qu'il faut retenir de ce chapitre est qu'il nous faut un système sans contact en détection par rétrodiffusion et par transillumination. Au chapitre 3, on établit les notions de conception optique qui sont utiles à la réingénierie des canaux de détection optique de la 1<sup>ière</sup> version. Le chapitre 4 a servi à décrire la 1<sup>ière</sup> version du scanner dans le but de bien cerner les besoins de la 2<sup>ième</sup> version. Dans le chapitre 5, les objectifs du projet sont identifiés. Dans le chapitre 6, la 2<sup>ième</sup> version du scanner est présentée via un article soumis à la revue scientifique *Review of Scientific Instruments*.

La 2<sup>ième</sup> version du scanner est munie de 7 canaux de détection optique permettant la détection simultanée de la lumière dans 2 bandes de longueur d'onde. Il est donc possible de faire de l'imagerie intrinsèque et de l'imagerie par fluorescence. Le temps d'acquisition est évidemment plus court que celui de la 1<sup>ière</sup> version. Aussi, le système de vision numérique 3D est intégré au scanner. On peut maintenant mesurer la surface externe du sujet en 3D en utilisant le même faisceau laser que celui servant aux mesures tomographiques.

Le système a été calibré et caractérisé. Les *TPSFs* de tous les canaux de détection ne sont pas nécessairement identiques pour une position angulaire de détection donnée. L'*IRF* a donc été enlevée de chaque mesure (en exploitant les travaux de Geoffroy Bodi). Ceci a permis de corriger temporellement et en amplitude toutes les mesures pour toutes les positions angulaires de détection.

Le scanner calibré a été testé expérimentalement en faisant des mesures en fluorescence. En utilisant les algorithmes de localisation de fluorescence par temps de vol (basé sur les travaux de Julien Pichette), il a été possible de localiser 3 inclusions fluorescentes à 1 mm près placées dans un même plan. Nous avons aussi obtenu des résultats préliminaires de l'effet d'un milieu hétérogène sur le temps de vol des premiers photons. En fait, le temps d'arrivée des premiers photons est plus long lorsqu'on augmente la diffusion dans le milieu.

## 7.2 Travaux futurs

Plusieurs perspectives d'avenir s'offrent au groupe *TomOptUS* suite aux développements décrits dans le présent travail. Trois perspectives sont identifiées ici : 1) les mesures tomographiques, 2) le scanner en général et 3) les canaux de détection optique.

### 7.2.1 Mesures tomographiques

Maintenant qu'on a un scanner de TOD multicanal fonctionnel, celui-ci ouvre la voie à plusieurs mesures :

1. Mesures pour caractériser la résolution spatiale du système en imagerie intrinsèque et en imagerie par fluorescence (notons que ceci sera fortement dépendant des algorithmes de reconstruction tomographique utilisés)
2. Mesure de la sensibilité du scanner en mode fluorescence (quantité minimale de fluorophore détectable pour un temps de mesure prédéterminé)
3. Mesures intrinsèques et en fluorescence sur différents objets/sujets
  - Mires développées dans notre laboratoire (p.ex. réplique de souris)
  - Petits animaux (souris)
4. Études de dynamique de fluorescence
  - Utilisation de mires liquides dans lesquelles on injecte graduellement un agent fluorescent qui diffusera dans celle-ci et dont il serait intéressant de faire l'imagerie en fonction du temps (notamment pour des applications en génie tissulaire) ;
  - Études de dynamique de fluorescence sur petits animaux (notamment pour des applications en pharmacocinétique et pour la segmentation d'organes [Hillman et Moore, 2007]. Pour ces applications, il sera toutefois nécessaire de réduire davantage le temps d'acquisition, à moins de se restreindre à parties limitées

de l'animal. Tel que mentionné dans l'article du chapitre 6, il faut actuellement environ 4.5 minutes pour l'acquisition d'une tranche de données, ce qui est encore relativement long. Pour des études intéressantes en dynamique de fluorescence, il faudrait typiquement pouvoir acquérir en moins de 10 minutes différentes tranches à intervalles de 2 mm sur environ 1 cm de longueur de l'animal (actuellement, il faut 22 minutes pour cela). Ceci permettrait au moins des études dynamiques locales, comme p.ex. sur l'abdomen ou le cerveau. Doubler le nombre des canaux de détection actuels permettra de s'approcher de cet objectif.

### 7.2.2 Le scanner (en général)

La 3<sup>ème</sup> version du scanner devra permettre d'imager l'animal en position horizontale, plus naturelle pour ce dernier. Il sera ainsi également plus facile d'installer l'animal pour une séance d'imagerie. Ceci ouvrira en outre la possibilité d'une intégration directe avec d'autres modalités d'imagerie telles que la TEP, la TDM et l'IRM, qui imagent le sujet en position horizontale.

La pollution lumineuse dans le labo n'est pas négligeable, d'autant qu'on fait du comptage de photons qui est très sensible à toute lumière ambiante. On travaille toujours en éteignant l'éclairage du laboratoire et dans notre cas cette pollution vient principalement des indicateurs lumineux sur les différents instruments associés au scanner (laser, moteurs, blocs d'alimentation, *etc* ...). Il faudra encasturer le scanner dans une boîte.

### 7.2.3 Canaux de détection optique

Les canaux optiques réalisés dans les présents travaux sont conçus pour capter la lumière venant d'un objet à une distance fixe de la première lentille (*grosso modo* à sa distance focale). Or un animal a une forme irrégulière. Ceci fait qu'un élément de surface vu par un canal n'est pas toujours à la distance pour laquelle le canal a été conçu, engendrant ainsi une variation de la taille de cet élément selon sa distance. Ceci n'est pas souhaitable. Une première piste pour remédier à cela est de garder constante la distance entre la première lentille et le sujet à imager. Une façon de faire serait d'utiliser un mécanisme de déplacement asservi de la première lentille (cette solution serait toutefois très dispendieuse). Une alternative serait d'utiliser un système optique avec une grande profondeur de champ, infini si possible (système afocal), limitant ainsi les variations de la taille de l'élément de surface vu par le canal de détection. Ceci fait toutefois en sorte que peu de lumière peut

être captée, car seuls les rayons parallèles à l'axe optique du canal de détection sont captés (l'angle de captation devient nul à la limite). L'option la plus susceptible d'être utilisée sera de compenser les variations de la taille de l'élément de surface vu par une connaissance *a priori* de la distance du sujet par rapport à la première lentille obtenue par le système de vision 3D. Cette compensation pourra alors être apportée de façon logicielle.

Pour que le scanner actuel puisse imager différents agents fluorescents, on doit changer les filtres à l'intérieur des canaux de détection. Pour donner plus de flexibilité à cet égard, il faudra trouver une façon d'intégrer une roue à filtre contrôlée par ordinateur permettant de sélectionner un filtre approprié pour un fluorophore donné. Il faudra aussi pouvoir changer la longueur d'onde d'excitation. Une alternative serait d'utiliser des filtres syntonisables contrôlables par ordinateur. De tels filtres existent et sont basés sur des cristaux liquides (p.ex. VariSpec filters de la compagnie CRI [Cambridge Research & Instrumentation, 2011]. Ils rejettent toutefois moins bien la lumière en dehors de la bande passante que des filtres interférentiels.

Pour le scanner développé ici, les canaux de détection sont tous dans un même plan. Une autre avenue de développement pour augmenter la densité de détection et ainsi réduire davantage le temps d'acquisition serait de faire la détection simultanée sur plusieurs plans parallèles (ces plans étant perpendiculaires à l'axe du scanner). De façon analogue à ce qui est fait en TEP ou en TDM, un scanner à plusieurs couches de détecteurs serait une avenue intéressante à développer, car elle permettrait de réduire encore davantage le temps d'acquisition (cela augmenterait les coûts également !). À cause de la dimension des *PMTs* et du fait qu'on a des canaux à deux bandes de longueur d'onde, il faudrait fort probablement décaler les canaux de couches successives. C'est certainement une idée à approfondir.

Enfin, une autre voie sera de miniaturiser les canaux de détection. Jusqu'aux travaux récents de notre groupe, tous les systèmes de TOD par *TCSPC* utilisaient des *PMTs* (voir article de conférence en annexe [Robichaud *et al.*, 2007]). Dans ces travaux, nous avons comparé les *PMTs* aux photodiodes à avalanche (*APDs*) pour le comptage de photons et il appert qu'il serait possible d'utiliser ces dernières pour des mesures tomographiques par comptage de photons [Robichaud *et al.*, 2007]. Les *APDs* pouvant être beaucoup plus compactés et ayant une surface photosensible beaucoup plus petite que les *PMTs* permettront une telle miniaturisation.

# ANNEXE A

## Graphiques

System/Prescription Data

File : C:\SWH\comoptus\ThemesMemoires-TowOptUS\EricLapointe\Project\ProjectionCondenser\F1-21mm\_Dia-25mm\_VerstonAnterieur  
 Title :  
 Date : MON OCT 25 2010

GENERAL LENS DATA:

Surfaces : 16  
 Stop : 1  
 System Aperture : Float By Stop Size - 12.7  
 Glass Catalogs : SCHOTT ERICCATALOG  
 Ray Aiming : OFF  
 Apodization : Uniform, factor = 0.00000E+000  
 Effective Focal Length : 45.73769 (in air at system temperature and pressure)  
 Effective Focal Length : 45.73769 (in image space)  
 Back Focal Length : -145.1421  
 Total Track : 333.32  
 Image Space F/# : 1.800696  
 Paraxial Working F/# : 5.538237  
 Working F/# : 1.303149  
 Image Space NA : 0.0899109  
 Object Space NA : 0.5794432  
 Stop Radius : 12.7  
 Paraxial Image Height : 7.875382  
 Paraxial Magnification : -7.875382  
 Entrance Pupil Diameter : 25.4  
 Entrance Pupil Position : 0  
 Exit Pupil Diameter : 96.36825  
 Exit Pupil Position : -533.6686  
 Field Type : Object height in Millimeters  
 Maximum Field : 1  
 Primary Wave : 0.63  
 Lens Units : Millimeters  
 Angular Magnification : 0.2631777

Fields : 5  
 Field Type: Object height in Millimeters

#	X-Value	Y-Value	Weight
1	0.000000	0.000000	1.000000
2	0.000000	-0.500000	1.000000
3	0.000000	-1.000000	1.000000
4	0.000000	0.500000	1.000000
5	0.000000	1.000000	1.000000

Vignetting Factors

#	VDX	VGY	VGX	VGY	VAN
1	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
2	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
3	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
4	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
5	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000

Wavelengths : 1  
 Units: nm

#	Value	Weight
1	0.430000	1.000000

SURFACE DATA SUMMARY:

Surf	Type	Comment	Radius	Thickness	Glass	Diameter	Conic
OBJ	STANDARD		Infinity	17.86312			0
STO	STANDARD		Infinity	0		25.4	0
2	STANDARD	LA1951	Infinity	11.74	N-BK7	25.4	0
3	STANDARD		13.08	20		25.4	0
4	STANDARD	IRIS	Infinity	23		0	0
5	STANDARD	FILTER	Infinity	3.5	BOROFLOAT	25.4	0
6	STANDARD		Infinity	26.5		25.4	0
7	STANDARD	FILTER	Infinity	3	BOROFLOAT	25.4	0
8	STANDARD		Infinity	9.7		25.4	0
9	STANDARD	FILTER	Infinity	3	BOROFLOAT	25.4	0
10	STANDARD		Infinity	17.1		25.4	0
11	STANDARD	FILTER	Infinity	3.5	BOROFLOAT	25.4	0
12	STANDARD		Infinity	9.2		25.4	0
13	STANDARD	LA1708	103.01	2.78	N-BK7	25.4	0
14	STANDARD		Infinity	180		25.4	0
15	STANDARD	IRIS	Infinity	20		12	0
IMA	STANDARD		Infinity			8	0

Figure A.1 Caractéristiques du système optique de la 1<sup>ère</sup> génération du scanner.

```

System/Prescription Data
File : C:\FVM\Concepts\ThemaMiroires-TonOptUS\EricLapointe\Projct\ProjectionCondenseur\CondenseurMagni_LensD9mmAchromat.c
Title:
Date : MON OCT 25 2010
Configuration 1 of 2

GENERAL LENS DATA:

Surfaces      :      16
Stop          :      1
System Aperture : Focal By Stop Size = 6.35
Glass Catalog : SCHOTT ERICCATALOG
Ray Aiming    : Off
Apodization   : Uniform, factor = 0.00000E+000
Effective Focal Length : -13.37897 (in air at system temperature and pressure)
Effective Focal Length : -13.37897 (in image space)
Back Focal Length : 69.35542
Total Track   : 351.8422
Image Space F/# : 1.210943
Paraxial Working F/# : 3.638076
Working F/#   : 3.690169
Image Space NA : 0.1361524
Object Space NA : 0.1362809
Stop Radius   : 6.35
Paraxial Image Height : 0.5505160
Paraxial Magnification : -1.000939
Entrance Pupil Diameter : 12.7
Entrance Pupil Position : 0
Exit Pupil Diameter : 3.174543
Exit Pupil Position : -18.40977
Field Type    : Object height in Millimeters
Maximum Field : 0.55
Primary Wave  : 0.83
Lens Units    : Millimeters
Angular Magnification : -4.000576

Fields        : 3
Field Type: Object height in Millimeters
#    X-Value    Y-Value    Weight
1    0.000000    0.000000    1.000000
2    0.000000    -0.500000    1.000000
3    0.000000    0.500000    1.000000

Vignetting Factors
#    VCX    VCY    VDX    VDY    VCX    VCY    VDX    VDY
1    0.000000  0.000000  0.000000  0.000000  0.000000  0.000000  0.000000  0.000000
2    0.000000  0.000000  0.000000  0.000000  0.000000  0.000000  0.000000  0.000000
3    0.000000  0.000000  0.000000  0.000000  0.000000  0.000000  0.000000  0.000000

Nodal Lengths : 2
Units: mm
#    Value    Weight
1    0.230000    1.000000
2    0.780000    1.000000

SURFACE DATA SUMMARY:

Surf  Type      Comment      Radius    Thickness  Glass      Diameter  Conic
001  STANDARD      -            Infinity   46.16023   -          1.1        0
070  STANDARD      -            Infinity   0          -          12.7       0
2    STANDARD      -            -250       1.5        SF16       12.7       0
3    STANDARD      -            26.79      3.5        BAFN10     12.7       0
4    STANDARD      AC127-050-B -24.2      125        -          12.7       0
5    COONBERK      -            -          0          -          -          0
6    STANDARD      DICHOIC FILTER Infinity   1.1        M-SK7      23.49168   0
7    STANDARD      -            -1.1       -          -          24.67348   0
8    COONBERK      -            -          1.1        -          -          0
9    STANDARD      -            Infinity   110        -          15.69937   0
10   STANDARD      FILTER       Infinity   3.5        BOROFLUAT 25.4       0
11   STANDARD      -            Infinity   25        -          18.26484   0
12   STANDARD      AC254-050-B 33.55      7.5        LANG22     25.4       0
13   STANDARD      -            -27.55     1.8        SF16       25.4       0
14   STANDARD      -            -125.6     44.94221   -          25.4       0
15   STANDARD      IRIS        Infinity   30        -          1          0
16A  STANDARD      -            Infinity   -          -          4          0
    
```

Figure A.2 Caractéristiques du système optique de la 2<sup>ème</sup> génération du scanner.

# ANNEXE B

## SCANNER À 3 CANAUX

**Mise en contexte :** Cet article a été présenté sous forme de poster par Eric Lapointe à la conférence BIOMED de l'Optical Society of America (OSA) à Miami (USA) le 13 mars 2010. Les auteurs ont contribué également à la rédaction de cet article.

**Titre de l'article (original en anglais) :** *A time-domain non-contact fluorescence diffuse optical tomography scanner for small animal imaging*

**Titre de l'article (version française) :** Scanner sans contact dans le domaine temporel pour tomographie optique diffuse par fluorescence pour imagerie sur petit animal

**Auteurs :** Yves Bérubé-Lauzière (professeur) et Eric Lapointe (étudiant à la maîtrise)  
Laboratoire *TomOptUS*, Département de génie électrique et de génie informatique,  
Université de Sherbrooke, 2500 boul. Université, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada

**Résumé de l'article :** On présente pour la première fois la version du scanner TomOptUS avec plus d'un canal de détection (3 canaux). On décrit les aspects électronique, optique et mécanique du scanner. On traite aussi brièvement du système de vision 3D pour la mesure de la forme extérieure du sujet et de l'algorithme de localisation de la fluorescence.

# A time-domain non-contact fluorescence diffuse optical tomography scanner for small animal imaging

Yves Bérubé-Lauzière and Eric Lapointe

Laboratoire TomOptUS, Département de génie électrique et de génie informatique  
 Université de Sherbrooke, 2500 boul. de l'Université, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada  
 Corresponding author: Yves.Berube-Lauziere@USherbrooke.ca

**Abstract :** We introduce a novel time-domain multi-view (over 360°) non-contact fluorescence diffuse optical tomography scanner for localizing fluorescent dyes in scattering media, eventually in small animals. Localization results of fluorescent inclusions in 3D are presented.

©2010 Optical Society of America

OCIS codes: (170.6920) Time-resolved imaging; (170.3890) Medical optics instrumentation; (110.6960) Tomography

## 1. Introduction

Diffuse optical tomography (DOT) systems have in the past used optical fibers in contact with the subject. For small animal imaging (our focus), however, bringing optical fibers in contact without disturbing the subject's shape would require complex automated mechanics with associated long acquisition times. To avoid this, 2 solutions have been proposed [1]: 1) Assume that the subject has a simple geometry (e.g. cylinder, slab or hemisphere), or 2) put the subject in a vessel with simple geometry containing a matching fluid. The 1<sup>st</sup> solution is unrealistic as small animals do not have a shape describable analytically. The 2<sup>nd</sup> leads to a decreased signal to noise ratio (SNR) and makes system operation and maintenance difficult (pouring fluids, cleaning the system, etc). Immersing the animal, without drowning it, is also cumbersome. To circumvent such difficulties, non-contact (NC) geometries were introduced [2], whereby measurements are made by detectors at a distance from the subject. NC measurements facilitate data acquisition and offer the possibility of easier integration with other medical imaging modalities (CT, PET and MRI), which are all NC [3].

The majority of small animal DOT scanners use continuous wave (CW) or frequency-domain (FD) measurements [4]. However, it is known that time-domain (TD) signals are information richer than CW or FD signals [5]. Indeed, in intrinsic imaging (detection wavelength same as excitation), TD signals are directly related to the tissue optical absorption  $\mu_a$  and scattering  $\mu_s$  coefficients [6]. In fluorescence imaging, the lifetime of fluorescent bio-markers contains info about local *in vivo* physiological parameters (biochemical binding, pH...) [7]. This leads to fluorescence lifetime imaging (FLIM), which is well developed in microscopy [8]. It is highly desirable to develop a DOT scanner that will allow exploiting the full potential of TD signals and obtain better resolved images. This, in fact, provides the rationale for our work.

We are developing a TD NC fluorescence DOT (FDOT) scanner for small animal *in vivo* molecular imaging without resorting to matching fluids or constraining the animal. Few other groups actively develop such scanners [9,10]. The challenges are the need for 1) high sensitivity, 2) high dynamic range as signals can be extremely faint due to tissue absorption and scattering, but can also be strong depending on the relative detector positions w.r.t. the source; 3) in TD systems, the detection electro-optics must provide for high temporal resolution to resolve the TD signals (so-called time point-spread functions - TPSFs); finally, 4) the 3D animal's outer shape must be measured to determine where the propagation mode of light changes from diffuse (in biological tissues) to straight-line (in air). We herein present a system that addresses all of these issues and will illustrate its use for localizing discrete fluorescent inclusions using a time of flight approach which requires exquisite timing accuracy.

## 2. DOT scanner

Fig. 1 provides a functional diagram of our scanner.

**Electro- opto- mechanics and optical tomographic data acquisition:** Figs. 2 and 3 illustrate the electro-mechanical set-up of our scanner (excitation laser source and associated optics not shown). The subject being imaged, a phantom, is placed vertically; it can be rotated around the vertical axis via a motorized rotation stage (green arrows in Fig. 3). This allows acquiring data for multiple laser injection points around the subject. This configuration was chosen as it is easier to rotate the subject than the laser. Moreover, vertical rotation, as opposed to horizontal, avoids physiological changes in the subject due to gravity. The incident laser beam directed along the -x direction is at the same height as the detection channels. The subject can be translated vertically (z) so that data along multiple transverse slices are available for imaging. The current version of the scanner comprises 3 free-space optics NC detection channels separated by 22.5°. Each comprises 2 lenses in a projection condenser pair configuration (Fig. 4).

These channels allow collecting light simultaneously in parallel from 3 positions on the subject's surface, thereby increasing optical signal acquisition throughput compared to our previous prototype [11]. In principle, the best would be to detect light from a smallest possible surface element on the subject. However, too small an element will prevent enough light to be collected. An element of diameter = 1mm has been chosen as a good compromise. As we measure fluorescence, 2 interference filters (Semrock, USA) are inserted between the lenses to reject light at the laser wavelength. The detection channels are mounted on a disk that can be rotated, independently from the subject, via a 2<sup>nd</sup> motorized rotation stage underneath, so that detection can be made all around the subject (Fig. 3). Optical data so acquired for each laser injection point is called a tomographic projection. There is a blind range of 80° where the detection channels cannot go as they would block the laser beam. *As such, our set-up allows highly flexible and complete acquisition of NC tomographic optical data sets in the TD.*

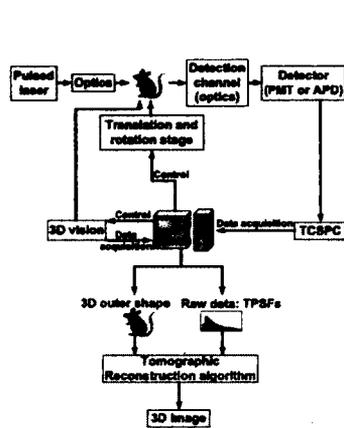


Fig. 1: System overview.



Fig. 2: Photograph of the real set-up.

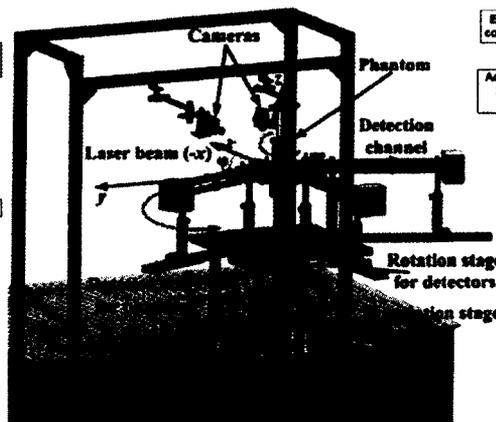


Fig. 3: Electro-mechanical set-up of our scanner.



Fig. 4: Optical path of the detection channels.

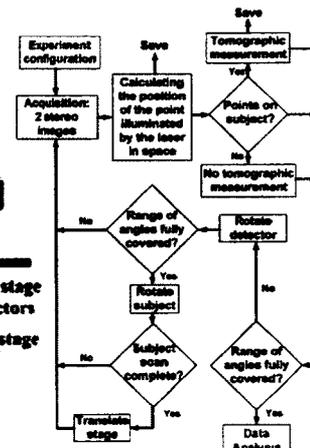


Fig. 5: Data acquisition flow graph.

**Electro-optics:** A mode locked Tsunami laser (Spectra-Physics, USA) emitting short laser pulses (pulse width = 4ps; rep. rate = 80MHz) serves to inject light into the subject and excite fluorescence. This laser, tunable from 700 to 1000nm, gives the possibility to image different fluorescent agents in the NIR. Note: We operate our laser in the ps regime, but it can also be set to emit 100fs pulses (fs regime). To achieve the high sensitivity and the high temporal resolutions needed for TD measurements, we resort to time-correlated single photon counting (TCSPC). This is made with an SPC-134 4 parallel channel TCSPC PC plug-in card (Becker&Hickl (bh), Germany). The detectors used are PMT modules (PMC-100-20 - bh, photocathode diameter = 8mm, timing resolution 200ps, cooled to reduce dark counts). We have previously demonstrated that single photon avalanche photodiodes (SPADs) can advantageously replace PMTs with appropriate optical design [12].

**3D surface metrology:** To obtain the subject's 3D outer shape, we developed an optical metrology system using a stereo camera pair and computer vision techniques [1]. The cameras each acquire, for each subject position, an image in which the laser spot is visible on the subject. The positions of the laser spot in the 2 images then serve to compute its 3D position by triangulation. A 3D model of the outer surface is then formed by meshing the 3D points so obtained. This 3D surface metrology technique has the advantage of using the scanner's laser beam, thereby reducing system complexity, and allowing simultaneous surface and DOT measurements. Additionally, the exact position where laser light penetrates the subject (important for the tomographic reconstruction algorithm [13]) is measured, while traditionally, this is indirectly inferred with less accuracy [2,14].

**Instrument computer control:** Fig. 5 provides the flow chart of scanner control and data acquisition. All the data acquisition is controlled automatically via LabVIEW software we developed. To scan the whole subject, the software controls the detector's rotation stage as well as the subject's rotation and translation stages. The computer

also acquires the TPSFs from TCSPC and two images of the entry laser point on the subject all around it. The data so acquired, will then serve in a reconstruction algorithm to obtain the 3D image of the subject.

### 3. Fluorescence localization results obtained with the scanner

**Phantom and fluorescent inclusions:** We use a phantom to simulate tissue optical properties (cylindrical glass tube O.D.=5cm, wall thickness 1.5mm, height 12cm, filled with a 48:1 V/V aqueous dilution of Intralipid® 20% (Baxter)  $\Rightarrow$  scattering coefficient  $\mu_s' = 5\text{cm}^{-1}$ ). In this phantom, we embed fluorescent inclusions (each made with a glass tube, O.D.=4mm, wall thickness 0.5mm, length 5mm, capped at both ends) filled with indocyanine green (ICG - NIR fluorophore, absorption/emission peaks 780nm/830nm - Fisher Scientific), at a concentration of  $10\mu\text{mol/L}$ .

**Localization algorithm:** Our algorithm has been detailed elsewhere [15]; we summarize it here. The short excitation laser pulses injected into the scattering phantom broaden as they travel through it. Part of the excitation light eventually reaches fluorescence sites which in turn emit light at the longer fluorescence wavelength in the form of spherical pulses. The photon time-of-flight distributions in these fluorescence pulses (fluorescence TPSFs (FTPSFs)) are measured at several positions around the medium with TCSPC (here at every  $22^\circ$ ). From each FTPSF, we extract the early photon arrival times (EPATs) using numerical constant fraction discrimination (NCFD) [11]. Photons with early arrival times travel in the medium along near straight trajectories, and thus carry the most information for localizing fluorescent objects. Such acquisitions of EPATs repeated along the height of the phantom (every 2.5mm) allow building a 3D surface map of EPATs around the medium (Fig. 6). The  $(\varphi, z)$  of minima in such maps ( $\varphi =$  angular position) correspond to fluorescent inclusions. Once  $(\varphi, z)$  of an inclusion is found via digital analysis of the EPAT map, its radial position  $r$  is subsequently determined by exploiting the quasi linear relationship of inclusion depth vs time we previously demonstrated experimentally [11] and a geometric triangulation calculation using the speed of propagation in the medium to convert times to distances.

Fig. 7 shows results obtained with this technique and our system. Here, we localize 4 fluorescent inclusions within 1 to 2mm to their true positions. These are high accuracy results considering the size and the diffusivity of the medium. We point out that this localization approach relies on extremely accurate measurements of small time intervals; as such it poses stringent requirements in terms of timing accuracy, which our system is able to achieve.

### 4. Summary and future work

We have presented the implementation of a novel non-contact architecture for a time-domain DOT scanner. Based on experimental results, we have demonstrated that our scanner is able to provide extremely high timing accuracy, enabling the 3D localization of an a priori unknown number of fluorescent point-like inclusions using photon time of flight information. Our current set-up includes 3 fluorescence detection channels. Work is in progress to add more channels to reduce acquisition time and increase angular sampling. Light detection at the laser wavelength will also be performed as it is important to implement tomographic algorithms which require measurements at both the excitation and fluorescence wavelengths.

Light detection at the laser wavelength will also be performed as it is important to implement tomographic algorithms which require measurements at both the excitation and fluorescence wavelengths.

### 5. References

- [1] M. Comtois & Y. Bérubé-Lauzière, "Optical surface metrology in 3D for small animal non-contact DOT," Proc. SPIE 6796 (2007).
- [2] J. Ripoll *et al.*, "Free-space propagation of diffuse light: Theory and experiments," Phys. Rev. Lett. 91, pp.1-4 (2003).
- [3] A.P. Gibson, J.C. Hebden, and S.R. Arridge, "Recent advances in diffuse optical imaging," Phys. Med. and Biol. 50, R1-R43 (2005).
- [4] J.C. Rasmussen, *et al.*, "Radiative transport in fluorescence-enhanced frequency domain photon migration," Med. Phys. 33, 4685-700 (2006).
- [5] L. V. Wang, and H.-I Wu, *Biomedical Optics: Principles and Imaging*, Wiley-Interscience (2007).
- [6] 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, 2331-36 (1989).
- [7] R.E. Nothdurft *et al.*, "In vivo fluorescence lifetime tomography", J. Biomed. Opt. 14, 024004 (2009).
- [8] K. Suhling *et al.*, "Time-resolved fluorescence microscopy", Photochem. Photobiol. Sci. 4, 13-22 (2005).
- [9] Hervé *et al.*, "Noncontact fluorescence diffuse optical tomography of heterogeneous media," Appl. Opt., 46, 4896-906 (2007).
- [10] D. Kepshire *et al.*, "A microCT guided fluo. tomography system for small animal molecular imaging," Rev. Sci. Inst., 80, 043701 (2009).
- [11] V. Robichaud, Y. Bérubé-Lauzière, "TD Spatial Localiz. of Fluo. Inclusions in Thick Scattering Media with Early Photons," OSA-Biomed Conf. BMD32 (2008).
- [12] Y. Bérubé-Lauzière, V. Robichaud, "TOF 3D localiz. of fluo. inclusions in thick turbid media with ultra-fast TCSPC APDs and electronics," Proc. SPIE 6771-17 (2007).
- [13] S. Arridge "Optical tomography in medical imaging," Inv. Prob. 15 R41-93 (1999).
- [14] Lasser *et al.*, "Surface Reconstruction for Free-Space 360 FMT and the Effects of Animal Motion," IEEE Trans. Med. Im. 27, 188-94 (2008).
- [15] J. Pichette, Y. Bérubé-Lauzière, "3D localiz. of fluo. inclusions from multiple tomo. projections in the TD," Proc. SPIE 7174-52 (2009).

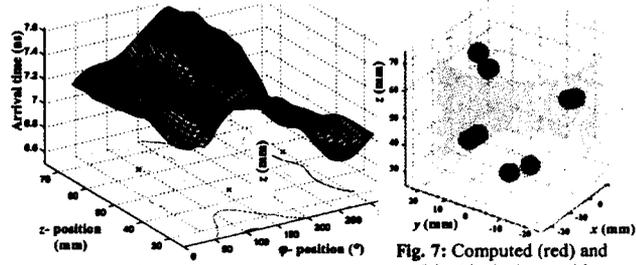


Fig. 6: Unfolded EPAT surface.

Fig. 7: Computed (red) and true (blue) inclusion positions.

# LISTE DES RÉFÉRENCES

- Advanced Research Technologies (ART) (2004) *eXplore Optix - Pre-Clinical Optical Molecular Imager Product Manual*. [www.art.ca](http://www.art.ca).
- Advanced Research Technologies (2010) ART. <http://www.art.ca/en/preclinical/optix-mx3/acquisition-system.php>, page consultée le 1 octobre 2010.
- Arridge, S. et Lionheart, W. (1998) Nonuniqueness in diffusion-based optical tomography. *Optics Letters*, volume 23, n° 11, p. 882–884.
- Arridge, S. et Schotland, J. (2009) Optical tomography : Forward and inverse problems. *Inv. Probl.*, volume 25, n° 12, p. 123010.
- Arridge, S. R. (1999) Optical tomography in medical imaging. *Inv. Probl.*, volume 15, n° 2, p. 41–93.
- Becker, W. (2005, (1st Ed.)) *Advanced time-correlated single photon counting techniques*. Springer.
- Becker, W. (2010 (4th Ed.)) *The bh TCSPC Handbook*. Becker&Hickl GmbH, Berlin, Germany.
- Bérubé-Lauzière, Y. et Lapointe, E. (2010) A time-domain non-contact fluorescence diffuse optical tomography scanner for small animal imaging. Dans *Biomed. Opt. Top. Meet. (OSA-BIOMED) (OSA)*. p. BTuD76.
- Bérubé-Lauzière, Y. et Robichaud, V. (2007) Time-of-flight non-contact fluorescence diffuse optical tomography with numerical constant fraction discrimination. Dans *Proc. SPIE 6629, Diff. Opt. Im. in Tissue, Europ. Conf. Biomed. Opt.*, volume 6629. p. 66290Y.
- Bérubé-Lauzière, Y., Robichaud, V. et Lapointe, E. (2007) Time-resolved non-contact diffuse optical tomography measurements with ultra-fast time-correlated single photon counting avalanche photodiodes. Dans *Proc. SPIE 6629, Diff. Opt. Im. in Tissue, Europ. Conf. Biomed. Optics*, numéro Paper. p. 6629–32.
- Bodi, G. (2010) *Débruitage, déconvolution et extraction de caractéristiques de signaux dans le domaine temporel pour imagerie biomédicale optique*. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke.
- Bouguet, J.-Y. (2010) <http://www.vision.caltech.edu/bouguetj>, page consultée le 2 avril 2011.
- Bouza Dominguez, J. et Bérubé-Lauzière, Y. (2011) Diffuse optical tomography of absorption in biological media using time-dependent parabolic simplified spherical harmonics equations. Dans *Proc. SPIE 8088, Diff. Opt. Imag., Europ. Conf. Biomed. Optics*, numéro 8088-27.

- Cambridge Research & Instrumentation* (2010) *CRI*. <http://www.cri-inc.com/products/maestro.asp>, page consultée le 2 octobre 2010.
- Cambridge Research & Instrumentation* (2011) *CRI*. <http://www.cri-inc.com/products/varispec.asp>, page consultée le 19 janvier 2011.
- Colak, S., van der Mark, M., Hooft, G., Hoogenraad, J., van der Linden, E. et Kuijpers, F. (1999) Clinical optical tomography and NIR spectroscopy for breast cancer detection. *IEEE J. Sel. Top. Quant. Electron.*, volume 5, n° 4, p. 1143–1158.
- Comtois, M. (2008) *Vision numérique et modèles 3D pour imagerie moléculaire sur petits animaux par tomographie optique*. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, 74 p.
- Comtois, M. et Bérubé-Lauzière, Y. (2007) Three-dimensional optical metrology and models for non-contact diffuse optical tomography of small animals. Dans *Proc. SPIE 6626, Molec. Imag., Europ. Conf. Biomed. Opt.* p. 66260T.
- Comtois, M. et Bérubé-Lauzière, Y. (2008) Optical surface metrology in 3D for small animal non-contact diffuse optical tomography. Dans *Proc. SPIE 6796, Phot, North '07, Biophotonics*, volume 6796. p. (8pp.).
- Cova, S., Ghioni, M., Zappa, F., Rech, I. et Gulinatti, A. (2006) A view on progress of silicon single photon avalanche diodes and quenching circuits. *Proc. SPIE*, volume 6372, p. 63720I-1.
- Cubeddu, R., Comelli, D., D'Andrea, C., Taroni, P. et Valentini, G. (2002) Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine. *Applied Optics*, volume 35, p. 61–76.
- Da Silva, A., Leabad, M., Driol, C., Bordy, T., Debourdeau, M., Dinten, J.-M., Peltie, P. et Rizo, P. (2009) Optical calibration protocol for an X-ray and optical multimodality tomography system dedicated to small-animal examination. *Applied Optics*, volume 48, n° 10, p. 151–162.
- Da Silva, A. D., Dinten, J.-M., Pettié, P., Coll, J.-L. et Rizo, P. (2008) In vivo fluorescence molecular optical imaging : From small animal towards clinical applications. Dans *2008 Mediterranean Conference on Control and Automation*, Conference Proceedings, MED'08. p. 1335–1340.
- Das, C., Trivedi, A., Mitra, K. et Vo-Dinh, T. (2003) Short pulse laser propagation through tissues for biomedical imaging. *Journal of Physics D (Applied Physics)*, volume 36, n° 14, p. 1714–1721.
- Dehghani, H., Eames, M. E., Yalavarthy, P. K., Davis, S. C., Srinivasan, S., Carpenter, C. M., Pogue, B. W. et Paulsen, K. D. (2009) Near infrared optical tomography using NIRFAST : Algorithm for numerical model and image reconstruction. *Comm. Num. Meth. Eng.*, volume 25, n° 6, p. 711–32.
- Deliolani, N., Lasser, T., Hyde, D., Soubret, A., Ripoll, J. et Ntziachristos, V. (2007) Free-space fluorescence molecular tomography utilizing 360° geometry projections. *Opt. Lett.*, volume 32, n° 4, p. 382 – 384.

- Ducros, N., Da Silva, A., Dinten, J.-M. et Peyrin, F. (2008) Fluorescence diffuse optical tomography : A simulation-based study comparing time-resolved and continuous wave reconstructions performances. Dans *2008 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : From Nano to Macro*, Proceedings, ISBI. p. 388–391.
- Fischer, R., Tadic-Galeb, B. et Yoder, P. (2008) *Optical System Design*, 2<sup>e</sup> édition. McGraw-Hill Professional, 809 p.
- Gallant, P., Belenkov, A., Ma, G., Lesage, F., Wang, Y., Hall, D. et McIntosh, L. (2004) A quantitative time-domain optical imager for small animals *in vivo* fluorescence studies. Dans *Biomed. Opt. Top. Meet. (OSA-BIOMED) (OSA)*. p. Paper WD2.
- Ghijssen, M. T., Lin, Y., Nalcioglu, O. et Gulsen, G. (2011) Development of a hybrid MRI and fluorescence tomography system for small animal imaging. Dans *Proc. SPIE 7892, Multimodal Biomed. Imag. VI*, volume 7892. p. 789212.
- Gibson, A., Hebden, J. et Arridge, S. (2005) Recent advances in diffuse optical imaging. *Phys. Med. Biol.*, volume 50, p. 1–43.
- Hall, D. (2006) Time domain optical molecular imaging of small animals *in vivo*. Dans *Proc. SPIE 6143, Medical Imaging 2006 : Physiology, Function, and Structure from Medical Images*, numéro Paper 6143. p. 61431J.
- Hawrysz, D. et Sevick-Muraca, E. (2000) Developments toward diagnostic breast cancer imaging using near-infrared optical measurements and fluorescent contrast agents. *Neoplasia*, volume 2, n<sup>o</sup> 5, p. 388–417.
- Herve, L., Koenig, A., Da Silva, A., Berger, M., Boutet, J., Dinten, J., Peltie, P. et Rizo, P. (2007) Noncontact fluorescence diffuse optical tomography of heterogeneous media. *Appl. Opt.*, volume 46, n<sup>o</sup> 22, p. 4896–906.
- Hielscher, A. (2005) Optical tomographic imaging of small animals. *Curr. Op. Biotech.*, volume 16, n<sup>o</sup> 1, p. 79–88.
- Hielscher, A., Bluestone, A., Abdoulaev, G., Klose, A., Lasker, J., Stewart, M., Netz, U. et Beuthan, J. (2002) Near-infrared diffuse optical tomography. *Disease Markers*, volume 18, p. 313–337.
- Hillman, E. M. C. et Moore, A. (2007) All-optical anatomical co-registration for molecular imaging of small animals using dynamic contrast. *Nature Photonics*, volume 1, p. 526–530.
- Jiang, Z., Piao, D., Xu, G., Ritchey, J., Holyoak, G., Bartels, K., Bunting, C., Slobodov, G. et Krasinski, J. (2008) Trans-rectal ultrasound-coupled near-infrared optical tomography of the prostate part II : Experimental demonstration. *Optics Express*, volume 16, n<sup>o</sup> 22, p. 17505 – 20.
- Joshi, A., Rasmussen, J., Kwon, S., Wareing, T., McGhee, J. et Sevick-Muraca, E. (2008) Multi-modality CT-PET-NIR fluorescence tomography. Dans *2008 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : From Nano to Macro*, Proceedings, ISBI. p. 1601–1604.

- Kepshire, D., Mincu, N., Hutchins, M., Gruber, J., Dehghani, H., Hypnarowski, J., Leblond, F., Khayat, M. et Pogue, B. (2009) A microcomputed tomography guided fluorescence tomography system for small animal molecular imaging. *Rev. Sci. Instrum.*, volume 80, n° 4, p. 043701.
- Klette, R., Schlüns, K. et Koschan, A. (1998) *Computer Vision - Three-Dimensional Data from Images*. Springer.
- Klose, A. et Hielscher, A. (2008) Optical tomography with the equation of radiative transfer. *Int. J. Numer. Meth. Heat Fluid Flow*, volume 18, n° 3-4, p. 443 – 64.
- Klose, A., Ntziachristos, V. et Hielscher, A. (2005) The inverse source problem based on the radiative transfer equation in optical molecular imaging. *J. Comp. Phys.*, volume 202, n° 1, p. 323–45.
- Klose, A. D. (2009) *Light Scattering Reviews 4*, chapitre 6. Radiative transfer of luminescence light in biological tissue. Springer, p. 294–345.
- Ko, W., Kwak, Y. et Kim, S. (2007) Development of a non-contact diffuse optical tomography system for image reconstruction of blood vessel with nir light. Dans *World Congress On Medical Physics and Biomedical Engineering 2006*, IFMBE Proceedings, volume 14. p. 1345–1348.
- Kumar, A., Raymond, S., Dunn, A., Bacskai, B. et Boas, D. (2008) A time domain fluorescence tomography system for small animal imaging. *IEEE Trans. Med. Imag.*, volume 27, n° 8, p. 1152–1163.
- LaFrenière, G. (2010) *La matière est faite d'onde*. <http://www.glafreniere.com/optique/airy.htm>, page consultée le 25 octobre 2010.
- Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3<sup>e</sup> édition. Springer, 954 p.
- Leblond, F., Davis, S., Valdés, P. et Pogue, B. (2009) Pre-clinical whole-body fluorescence imaging : Review of instruments, methods and applications. *Journal of photochemistry and photobiology B : Biology*, volume 98, n° 1, p. 78–94.
- Li, C., Wang, G., Qi, J. et Cherry, S. (2009) Three-dimensional fluorescence optical tomography in small-animal imaging using simultaneous positron-emission-tomography priors. *Opt. Lett.*, volume 34, n° 19, p. 2933–5.
- Lin, Y., Barber, W. C., Iwanczyk, J. S., Roeck, W., Nalcioglu, O. et Gulsen, G. (2010) Quantitative fluorescence tomography using a combined tri-modality ft/dot/xct system. *Opt. Expr.*, volume 18, n° 8, p. 7835–7850.
- Masciotti, J. M., Lee, J., Stewart, M. et Hielscher, A. H. (2009) Instrumentation for simultaneous magnetic resonance and optical tomographic imaging of the rodent brain. Dans *Proc. SPIE 7171, Multimodal Biomed. Imag. IV*, volume 7171. p. 71710Q (16pp.).
- Massoud, T. et Gambhir, S. (2003) Molecular imaging in living subjects : Seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev.*, volume 17, p. 545–580.

- Montcel, B. et Poulet, P. (2006) An instrument for small-animal imaging using time-resolved diffuse and fluorescence optical methods. *Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. A*, volume 569, p. 551–6.
- Mueller, G. et al. (1993) *Medical Optical Tomography : Functional Imaging and Monitoring*. SPIE Press.
- Navarro, F., Berger, M., Goutayer, M., Guillermet, S., Josserand, V., Rizo, P., Vinet, F. et Texier, I. (2009) A novel indocyanine green nanoparticle probe for non invasive fluorescence imaging in vivo. Dans *Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications*, Proceedings of the SPIE, volume 7190. p. 71900L–1 – 71900L–10.
- Niedre, M., de Kleine, R., Aikawa, E., Kirsch, D., Weissleder, R. et Ntziachristos, V. (2008) Early photon tomography allows fluorescence detection of lung carcinomas and disease progression in mice in vivo. Dans *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, volume 105. p. 19126–19131.
- Niedre, M. et Ntziachristos, V. (2010) Comparison of fluorescence tomographic imaging in mice with early-arriving and quasi-continuous-wave photons. *Opt. Lett.*, volume 35, n° 3, p. 369–371.
- Niedre, M. J., Turner, G. M. et Ntziachristos, V. (2006) Time-resolved imaging of optical coefficients through murine chest cavities. *J. Biomed. Opt.*, volume 11, n° 6, p. 064017.
- Nilson, D., Cable, M. D. et Rice, B. W. (2006) Multi-view imaging apparatus. US Pat. 7,113,217 B2 (filed 13 July 2001).
- Nothdurft, R., Patwardhan, S., Akers, W., Ye, Y., Achilefu, S. et Culver, J. (2009) In vivo fluorescence lifetime tomography. *J. Biomed. Opt.*, volume 14, n° 2, p. 024004.
- Ntziachristos, V. (2006) Fluorescence molecular imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering*, volume 8, p. 1–33.
- Ntziachristos, V., Tung, C., Bremer, C. et Weissleder, R. (2002) Fluorescence molecular tomography resolves protease activity *in vivo*. *Nat. Med.*, volume 8, n° 7, p. 757–760.
- O’Leary, M., Boas, D., Li, X., Chance, B. et Yodh, A. (1996) Fluorescence lifetime imaging in turbid media. *Opt. Lett.*, volume 21, n° 2, p. 158–160.
- Olympus (2010a) *Olympus*. <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>, page consultée le 10 octobre 2010.
- Olympus (2010b) *Olympus*. <http://www.olympusmicro.com/primer/java/filters/lctf/index.html>, page consultée le 2 novembre 2010.
- Palmer, M., Shibata, Y., Kruskal, J. et Lenkinski, R. (2002) In vivo imaging of small animals with optical tomography and near-infrared fluorescent probes. Dans *Proc. SPIE 4626, Biomed. Nanotech. Architec. Appl.* p. 166–169.
- Parak, W., Pellegrino, T. et Plank, C. (2005) Labelling of cells with quantum dots. *Nanotechnology*, volume 16, n° 2, p. 9–25.

- Park, J. M. et Gambhir, S. S. (2005) Multimodality radionuclide, fluorescence, and bioluminescence small-animal imaging. *Proc. IEEE*, volume 93, n° 4, p. 771–782.
- Patterson, M. S., Chance, B. et Wilson, B. C. (1989) Time resolved reflectance and transmittance for the noninvasive measurement of tissue optical properties. *Appl. Opt.*, volume 28, p. 2331–2336.
- Pichette, J. et Bérubé-Lauzière, Y. (2010) Time-domain elliptical localization of point-like fluorescence inclusions with early photons arrival times. Dans *Biomed. Opt. Top. Meet. (OSA-BIOMED) (OSA)*. p. BTuD46.
- Pichette, J., Lapointe, E. et Bérubé-Lauzière, Y. (2009) Three-dimensional localization of discrete fluorescent inclusions from multiple tomographic projections in the time-domain. Dans *Proc. SPIE 7174, Opt. Tomo. Spectros. Tissue VIII, BiOS - Photonics West*. p. 717452 (10pp.).
- Pifferi, A., Torricelli, A., Spinelli, L., Contini, D., Cubeddu, R., Martelli, F., Zaccanti, G., Tosi, A., Dalla Mora, A., Zappa, F. et Cova, S. (2008) Time-resolved diffuse reflectance using small source-detector separation and fast single-photon gating. *Phys. Rev. Lett.*, volume 100, n° 13, p. 138101.
- Pogue, B., McBride, T., Osterberg, U. et Paulsen, K. (1999) Comparison of imaging geometries for diffuse optical tomography of tissue. *Optics Express*, volume 4, n° 8, p. 270–286.
- Poulet, P. et Montcel, B. (2006) An instrument for small-animal imaging using time-resolved diffuse and fluorescence optical methods. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section A (Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment)*, volume 569, n° 2, p. 551–556.
- Rao, J., Dragulescu-Andrasi, A. et Yao, H. (2007) Fluorescence imaging *in vivo* : Recent advances. *Current Opinion in Biotechnology*, volume 18, n° 1, p. 17–25.
- Rasmussen, J., Joshi, A., Pan, T., Wareing, T., McGhee, J. et Sevick-Muraca, E. (2006) Radiative transport in fluorescence-enhanced frequency domain photon migration. *Medical Physics*, volume 33, n° 12, p. 4685 – 700.
- Rinneberg, H., Grosenick, D., Moesta, K., Wabnitz, H., Mucke, J., Wubbeler, G., MacDonald, R. et Schlag, P. (2008/03/) Detection and characterization of breast tumours by time-domain scanning optical mammography. *Opto-Electron. Rev.*, volume 16, n° 2, p. 147–62.
- Ripoll, J., Nieto-Vesperinas, M., Weissleder, R. et Ntziachristos, V. (2002) Fast analytical approximation for arbitrary geometries in diffuse optical tomography. *Opt. Lett.*, volume 27, n° 7, p. 527–529.
- Ripoll, J., Schulz, R. et Ntziachristos, V. (2003) Free-space propagation of diffuse light : Theory and experiments. *Phys. Rev. Lett.*, volume 91, n° 10, p. 1–4.
- Robichaud, V. (2007) *Architecture 3D sans contact et localisation par temps de vol pour tomographie optique diffuse par fluorescence*. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, 118 p.

- Robichaud, V. et Bérubé-Lauzière, Y. (2008) Time-domain spatial localization of fluorescent inclusions in thick scattering media with early photons. Dans *Biomed. Opt. Top. Meet. (OSA-BIOMED) (OSA)*. p. BMD32.
- Robichaud, V., Lapointe, E. et Bérubé-Lauzière, Y. (2007) Ultra-fast time-correlated single photon counting avalanche photodiodes for time-domain non-contact fluorescence diffuse optical tomography. Dans *Photonics North 2007*, Proceedings of SPIE, volume 6796. p. 679606W-1 – 66290W-12.
- Roy, R., Thompson, A., Godavarty, A. et Sevick-Muraca, E. (2005) Tomographic fluorescence imaging in tissue phantoms : A novel reconstruction algorithm and imaging geometry. *IEEE transactions on medical imaging*, volume 24, n° 2, p. 137–154.
- Schmitz, C., Locker, M., Lasker, J., Hielscher, A. et Barbour, R. (2002) Instrumentation for fast functional optical tomography. *Review of Scientific Instruments*, volume 73, n° 2, p. 429–439.
- Schulz, R., Echner, G., Rühle, H., Stroh, W., Vierling, J., Vogt, T., Peter, J. et Semmler, W. (2005) Development of a fully rotational non-contact fluorescence tomographer for small animals. *IEEE Nuclear Science Symposium*, volume 4, p. 2391–2393.
- Schulz, R., Ripoll, J. et Ntziachristos, V. (2003) Noncontact optical tomography of turbid media. *Optics Letters*, volume 28, n° 18, p. 1701–3.
- Schulz, R., Ripoll, J. et Ntziachristos, V. (2004) Experimental fluorescence tomography of tissues with noncontact measurements. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, volume 23, n° 4, p. 492–500.
- Selb, J., Joseph, D. K. et Boas, D. A. (2006) Time-gated optical system for depth-resolved functional brain imaging. *Journal of Biomedical Optics*, volume 11, n° 4.
- Smith, W. J. (1997) *Practical Optical System Layout : And Use of Stock Lenses*, 1<sup>re</sup> édition. McGraw-Hill Professional, 224 p.
- Smith, W. J. (2008a) Getting the Most Out of "Stock" Lenses. Dans *Modern Optical Engineering*, chapitre 21, 4<sup>e</sup> édition. McGraw-Hill Professional, p. 659–685.
- Smith, W. J. (2008b) *Modern Optical Engineering*, 4<sup>e</sup> édition. McGraw-Hill Professional, 764 p.
- Smith, W. J. (2008c) Optical System Considerations. Dans *Modern Optical Engineering*, chapitre 4, 4<sup>e</sup> édition. McGraw-Hill Professional, p. 58.
- Smith, W. J. (2008d) Prism and Mirror Systems. Dans *Modern Optical Engineering*, chapitre 7, 4<sup>e</sup> édition. McGraw-Hill Professional, p. 135.
- Smith, W. J. (2008e) The Basics of Lens Design. Dans *Modern Optical Engineering*, chapitre 16, 4<sup>e</sup> édition. McGraw-Hill Professional, p. 417.
- Smith, W. J. (2008f) The Primary Aberrations. Dans *Modern Optical Engineering*, chapitre 5, 4<sup>e</sup> édition. McGraw-Hill Professional, p. 71–104.

- Smith, W. J. (2008g) Wave-Front Aberrations and MTF. Dans *Modern Optical Engineering*, chapitre 15, 4<sup>e</sup> édition. McGraw-Hill Professional, p. 376.
- Suhling, K., Tregidgo, C., Sergeant, N., Levitt, J. A., Pavlides, A., Green, M., Hungerford, G., Rei, A. et Ferreira, M. I. C. (2007) Time-resolved fluorescence microscopy. Dans *Proc. SPIE 6771, Adv. Phot. Count. Tech. II*. p. 182–192.
- Taroni, P., Pifferi, A., Salvagnini, E., Spinelli, L., Torricelli, A. et Cubeddu, R. (2009) Seven-wavelength time-resolved optical mammography extending beyond 1000 nm for breast collagen quantification. *Opt. Expr.*, volume 17, n° 18, p. 15932–46.
- Tromberg, B. J., Pogue, B. W., Paulsen, K. D., Yodh, A. G., Boas, D. A. et Cerussi, A. E. (2008) Assessing the future of diffuse optical imaging technologies for breast cancer management. *Med. Phys.*, volume 35, n° 6, p. 2443–2451.
- Turner, G., Zacharakis, G., Soubret, A., Ripoll, J. et Ntziachristos, V. (2005) Complete-angle projection diffuse optical tomography by use of early photons. *Optics Letters*, volume 30, n° 4, p. 409–411.
- Valim, N., Brock, J. et Niedre, M. (2010) Experimental measurement of time-dependant photon scatter for diffuse optical tomography. *J. Biomed. Opt.*, volume 15, n° 6, p. 065006.
- Van Munster, E. B. et Gadella, T. W. (2005) Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, volume 95, p. 143–175.
- Vasefi, F., Ng, E., Kaminska, B., Chapman, G. H., Jordan, K. et Carson, J. J. L. (2009) Transmission and fluorescence angular domain optical projection tomography of turbid media. *Applied Optics*, volume 48, n° 33, p. 6448–6457.
- VisEn Medical (2010) *VisEn a PekinElmer Company*. [http://www.visenmedical.com/products/quantitative\\_tomography\\_systems/underlying\\_technology\\_of\\_the\\_fmt\\_platform/index.html](http://www.visenmedical.com/products/quantitative_tomography_systems/underlying_technology_of_the_fmt_platform/index.html), page consultée le 10 octobre 2010.
- Wang, J., Pogue, B., Jiang, S. et Paulsen, K. (2010) Near-infrared tomography of breast cancer hemoglobin, water, lipid, and scattering using combined frequency domain and cw measurement. *Optics Letters*, volume 35, n° 1, p. 82 – 4.
- Wang, L. et Wu, H. (2007) *Biomedical Optics - Principles and Imaging*. Wiley-Interscience.
- Weissleder, R. et Mahmood, U. (2001) Molecular imaging. *Radiology*, volume 219, p. 316–333.
- Weissleder, R. et Pittet, M. J. (2008) Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*, volume 425, p. 580–589.
- Welch, A. J. et van Gemert, M. J. C. (éd.) (1995) *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue*, 1<sup>re</sup> édition. Springer.
- Wu, J., Wang, Y., Perelman, L., Itzkan, I., Dasari, R. et Feld, M. (1995) Time-resolved multichannel imaging of fluorescent objects embedded in turbid media. *Opt. Lett.*, volume 20, n° 5, p. 489–491.

Xenogen Corporation (2005) *IVIS Imaging System 3D Series - Product Manual*. 860 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501.

Zint, C., Uhring, W., Torregrossa, M., Cunin, B. et Poulet, P. (2003) Streak camera : A multidetector for diffuse optical tomography. *Applied Optics*, volume 42, n° 16, p. 3313–3320.

