



**HAL**  
open science

**Methodes Optiques d'exploration des tissus biologiques.  
Spectrometrie des tissus cerebraux au moyen des sondes  
miniatures a fibres optiques et imagerie par  
Tomographie Optique Coherente**

Adrian Bradu

► **To cite this version:**

Adrian Bradu. Methodes Optiques d'exploration des tissus biologiques. Spectrometrie des tissus cerebraux au moyen des sondes miniatures a fibres optiques et imagerie par Tomographie Optique Coherente. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2004. Français. NNT: . tel-00007180

**HAL Id: tel-00007180**

**<https://theses.hal.science/tel-00007180>**

Submitted on 22 Oct 2004

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

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

---

**THÈSE**  
pour obtenir le grade de docteur  
de l'Université "Joseph Fourier" - Grenoble I, France  
et  
de l'Université "Alexandru Ioan Cuza" - Iași, Roumanie  
dans la discipline: physique

par

**ADRIAN BRADU**

**MÉTHODES OPTIQUES D'EXPLORATION DES TISSUS BIOLOGIQUES.  
SPECTROMÉTRIE DES TISSUS CÉRÉBRAUX  
AU MOYEN DES SONDÉS MINIATURES À FIBRES OPTIQUES  
ET  
IMAGERIE PAR TOMOGRAPHIE OPTIQUE COHÉRENTE**

Soutenue le 8 Octobre 2004, devant le jury composé de Messieurs

Rapporteurs

Claude Boccara  
Adrian Podoleanu

Examineurs

Pierre Benech, président  
Jacques Derouard, directeur de thèse  
Gheorghe Popa, co-directeur de thèse

Thèse réalisé au  
Laboratoire de Spectrométrie Physique,  
B.P.87 - 38402 Saint Martin d'Hères Cedex, France  
Laboratoires d'Optique et Spectroscopie de la Faculté de Physique de Iași, Roumanie,  
11 Carol I, 700506 - Iași, Roumanie  
Physics Laboratory, Kent University  
CT2 7NR - Canterbury, Grande Bretagne

---

---

## Remerciements

---

*Je tiens tout d'abord à remercier de manière particulière au Monsieur le Professeur Jacques Derouard pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Spectrométrie Physique, pour son aide, ses conseils et sa disponibilité dont il a fait preuve tout au long de ma thèse. Je suis donc très reconnaissant à Jacques Derouard pour accepter d'être l'un de mes directeurs de thèse et pour tout ce qu'il m'a offert. Également je veux remercier au Monsieur le Professeur Gheorghe Popa pour tout ce qui il a fait pour moi : l'acceptance d'être mon directeur de thèse, son aide morale et financier qu'il m'a donné et pour toutes ses conseils.*

*Un grande merci à Monsieur le Professeur Ghita Singurel. Grâce à vous j'ai eu l'occasion et la chance de travailler dans peut être les meilleurs laboratoire européennes d'optique et spectroscopie. Ma carrière scientifique est due à vous. Je vous remercie.*

*Je suis très reconnaissant à Adrian Podoleanu pour m'avoir accueilli au sein du "Physics Laboratory" à Canterbury, pour son aide précieux et sa patience. Lorsque on est débutant en OCT et en anglais, c'est le roumain que te sauve n'est pas ?*

*Je remercie Messieurs les membres du jury de l'honneur qu'ils me témoignent en acceptant de*

*participer à la soutenance de ma thèse.*

*Je remercie aussi à Cécile Dolbec, Emanuelle Grillon, Raphael Sablong, Olivier Hugon, Radu Cucu et George Dobre pour leur participation à ce travail, leur disponibilité et bien sûr leur humeur.*

*Je ne voudrais pas oublier quelqu'un. Je remercie à tous ceux qui près où loin m'ont aidé, encouragé et accompagnée pendant ces presque 5 ans : Régine, Richard, Frédéric, Nouredine, Camel, Marie-Laure, Cristina, Ramona, Benoît ...*

*Le financement des mes travaux a été fait à l'aide de plusieurs sources : bourse Socrates-Erasmus, bourse Marie-Curie, bourse de la Banque Mondiale. Je remercie à tous ceux qui m'ont fait confiance en m'accordant ces bourses ainsi qu'aux organisations impliquées.*

*Enfin, le plus grand merci pour ma femme, Jana qui est arrivé à supporter avec stoïcisme mes très longs et interminables périodes d'absence.*

*Pour tous les gens que sans vouloir j'ai oublié de mentionner, un grand merci à tous.*

---

## Résumé

---

Nous abordons dans ce mémoire deux méthodes d'exploration *in vivo* des tissus biologiques.

Premièrement nous présenterons une technique spectroscopique invasive d'investigation des tissus cérébraux profonds. Cette technique utilisant des sondes optiques en miniature, tire partie de la forte rétrodiffusion de la lumière par les tissus biologiques. Ainsi, l'atténuation lumineuse qu'on mesure expérimentalement contient des informations non seulement sur les propriétés de diffusion des milieux investigués mais aussi sur les concentrations des chromophores qu'ils contiennent. Le résultat est la possibilité d'envisager la mise en oeuvre d'une méthode d'observation directe de certains paramètres hémodynamiques dont la saturation tissulaire en oxygène où la concentration en hémoglobine totale. Nous nous référerons d'abord à quelques éléments théoriques sur lesquels reposent nos manipulations. Nous présenterons ensuite le dispositif expérimental, les matériels et les méthodes que nous avons utilisé en focalisant en particulier notre intérêt sur la préparation des fantômes optiques. Afin de mettre au point la méthode de travail nous montrons par expérimentations sur de milieux modèles et par simulations numériques de Monte Carlo qu'on a la possibilité expérimentale d'envisager des études d'oxymétrie tissulaire. Une fois ces aspects mises au point nous présenterons des études d'oxygénation cérébrale, *in vivo*, chez le rat, au cours d'une hypoxémie progressive. Nous concluons cette partie expérimentale démontrant la potentialité du système d'être utilisé en études sur les réactions hémodynamiques dues à l'injection

des traceurs optiques, sur le dépistage d'une ischémie et sur la mise en évidence des variations d'état rédox des enzymes respiratoires. Finalement nous nous occuperons de l'effet du confinement de l'absorbance sur les mesures spectrométriques en milieux diffusants et nous concluons que la spectrométrie d'absorption sous estime fortement les concentrations des espèces absorbants lorsque les dernières sont localisées.

Deuxièmement nous présenterons une méthode d'imagerie des tissus biologiques en particulier de l'oeil : la tomographie optique cohérente. Sa technique tire partie de propriétés de cohérence de la lumière. Ainsi, l'interférence constructive des faisceaux lumineux provenant de deux bras d'un interféromètre de type Michelson donne naissance à un signal contenant des informations sur la réflectivité provenant d'un domaine spatial de la cible limité par la longueur de cohérence de la source. Nous nous référerons d'abord à quelques éléments théoriques nécessaires pour la compréhension du fonctionnement d'un tomographe optique cohérent. Ensuite, nous présenterons notre dispositif expérimental, en nous focalisant sur les performances du système en termes de la vitesse d'acquisition des images, résolution transversale et longitudinale, rapport signal/bruit. Nous intéresserons également des limitations imposées par l'utilisation d'un miroir vibrant sur la qualité des images via la largeur de la bande des signaux générés. Nous concluons cette partie en soulignant les capacités du système de produire des images bidimensionnelles transversales et longitudinales des objets, à haute résolution.

L'ensemble de ce travail de recherche et développement a également permis de comprendre et d'explicitier certains résultats et conclusions contradictoires rapportés jusqu'à présent dans la littérature à propos de la propagation de la lumière en milieux à la fois diffusants et absorbants, de mettre en évidence certaines conditions indispensables pour la mise en oeuvre des deux techniques, de mieux définir leurs domaines d'application, leurs limitations et leurs bonnes conditions d'utilisation.

*Mots clefs : hémoglobine, saturation en oxygène, hypoxémie, simulations de Monte Carlo, spectrométrie, tomographie optique cohérente, miroir vibrant résonant, microscopie confocale, imagerie, rétine*

---

## Résumé en Roumain

---

In acest memoriu vom prezenta două metode de explorare in vivo a țesuturilor biologice.

Astfel, în prima parte vom prezenta o tehnica spectroscopică invazivă de investigare a țesuturilor profunde. Această tehnică ce utilizează sonde optice în miniatură are la bază puternica retroîmprăștiere a luminii de către țesutul biologic. Astfel, atenuarea radiației optice măsurată experimental conține informații nu numai asupra proprietăților de împrăștiere ale mediului dar și asupra concentrațiilor cromoforilor conținuți de către acesta. Rezultatul este posibilitatea de a pune în operă o metodă de observare directă a unor parametri hemodinamici precum saturația tisulară în oxigen sau concentrația totală a hemoglobinei. In acest context, ne vom referi mai întâi la câteva elemente teoretice necesare efectuării experiențelor. Apoi, prezentăm dispozitivul experimental, materialele și metodele utilizate focalizându-ne interesul în particular asupra preparării fantome-lor optice. Pentru punerea la punct a metodei de lucru, vom arăta prin experiențe cu medii model și prin simulări numerice Monte Carlo că avem posibilitatea de a realiza studii de oximetrie tisulară. Odată aceste aspecte puse la punct vom prezenta studii de oximetrie cerebrală in vivo, în cursul unei hipoxii progresive. Vom concluziona această parte experimentală demonstrând potențialitatea sistemului de a fi utilizat în studii privitoare la reacțiile hemodinamice datorate injectării unor trăsori optici, a depistării unei ischemii si a punerii în evidență a variațiilor stării redox a unor enzime respiratorii. In cele din urmă, ne vom ocupa de efectul confinării absorbantei asupra măsurătorilor

spectrometrice în medii difuzante și vom concluziona că spectrometria de absorbție subestimează concentrațiile speciilor absorbante când acestea din urmă sunt localizate spațial.

În a doua parte vom prezenta o metodă de imagistică a țesuturilor biologice, în particular a țesutului ocular : tomografia optică coerentă. Această tehnică își are originea în proprietățile de coerență ale luminii. Astfel, interferența constructivă a fasciculelor de lumină provenind din cele două brațe ale unui interferometru Michelson dă naștere la un semnal electric ce conține informații asupra reflectivității unui obiect, dintr-un domeniu spațial al acestuia limitat de lungimea de coerență a sursei. În această ordine de idei ne vom referi la câteva elemente teoretice necesare pentru a înțelege funcționarea unui tomograf optic coerent. Apoi vom prezenta dispozitivul experimental construit focalizându-ne asupra performanțelor sistemului în termenii vitezei de achiziție a imaginilor, a rezoluțiilor sale longitudinale și transversale, a raportului semnal/zgomot. De asemenea ne vom interesa de limitele pe care utilizarea unui scanner rezonant le impune calității imaginilor via lărgimea de bandă a semnalelor pe care le generează. Vom concluziona această parte prin sublinierea capacităților sistemului de a produce imagini bidimensionale transversale și longitudinale, de înaltă rezoluție.

În ansamblu, această muncă de cercetare și dezvoltare a permis de asemenea de a înțelege și explica unele rezultate și concluzii contradictorii raportate în literatură apropos de propagarea radiației optice în medii biologice, de a pune în evidență unele condiții indispensabile pentru punerea în operă a celor două tehnici, de a defini mai bine domeniile lor de aplicabilitate, limitele lor, și condițiile de funcționare corectă a acestora.

***Cuvinte cheie :*** hemoglobină, saturație în oxigen, hypoxie, simulări Monte Carlo, spectrometrie, tomografie optică coerentă, scanner rezonant, microscopie confocală, imagistică, retină



---

## Table de matières

---

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
Bibliographie . . . . .	4
<b>1 Spectrométrie en milieux diffusants. Principes théoriques</b>	<b>6</b>
1.1 Principes théoriques de la propagation de la lumière en milieux absorbants et diffusants . . . . .	7
1.2 La loi de Beer-Lambert et la mesure de concentrations de chromophores . . . . .	10
1.2.1 Cas d'un milieu purement absorbant . . . . .	10
1.2.2 Cas d'un milieu à la fois absorbant et diffusant . . . . .	14
1.3 Milieux d'absorbance compartimentée . . . . .	19
1.3.1 Possibilités d'adaptation de la formulation pour le cas des milieux d'absorbance localisée . . . . .	19
1.3.2 Mesures des variations temporelles des concentrations des chromophores en conditions de localisation de l'absorbance . . . . .	22
1.3.3 Modèle de simulation numérique de Monte Carlo . . . . .	24
1.4 Conclusion . . . . .	27
Bibliographie . . . . .	29
<b>2 Spectrométrie en milieux diffusants au moyen de sondes optiques aiguilles</b>	<b>32</b>
2.1 Dispositif expérimental . . . . .	33
2.1.1 Principes de base . . . . .	33
2.1.2 La source lumineuse . . . . .	35
2.1.3 Les sondes optiques . . . . .	35
2.1.4 L'estimation du volume exploré par le rayonnement optique . . . . .	36

2.1.5	Les spectromètres . . . . .	38
2.1.6	Traitement des données . . . . .	41
2.2	La préparation des fantômes optiques . . . . .	42
2.2.1	Le calcul des propriétés de diffusion et du facteur d'anisotropie d'un milieu modèle . . . . .	43
2.2.2	L'absorption du milieu modèle . . . . .	45
2.2.3	La préparation des fantômes optiques d'absorbance localisée . . . . .	45
2.2.4	La préparation des fantômes optiques contenant du sang . . . . .	48
2.2.5	Milieux modèles à base de microsphères de latex : de la théorie à la pratique . . . . .	49
2.3	Techniques et protocoles biologiques . . . . .	53
2.3.1	Le modèle animal, le protocole et le dispositif expérimental . . . . .	53
2.3.2	Injection d'un produit de contraste . . . . .	56
2.3.3	Vélocimétrie Doppler . . . . .	57
2.4	Conclusions . . . . .	58
	Bibliographie . . . . .	59
<b>3</b>	<b>Spectrométrie en milieux diffusants à l'aide des sondes optiques aiguilles. Applications</b>	<b>62</b>
3.1	Spectrométrie en milieux diffusants en conditions d'une distribution homogène des chromophores . . . . .	63
3.1.1	Configuration expérimentale et méthode de travail . . . . .	64
3.1.2	Résultats expérimentaux . . . . .	64
3.1.3	Calcul de la longueur des trajectoires des photons par simulations numériques de Monte Carlo . . . . .	66
3.1.4	Discussions . . . . .	68
3.2	Application : étude de l'oxygénation cérébrale, in vivo, chez le rat, au cours d'une hypoxémie progressive . . . . .	71
3.2.1	Montage expérimental. Méthode de travail . . . . .	71
3.2.2	Résultats expérimentaux . . . . .	72
3.2.3	Conclusions . . . . .	87
3.3	Spectrométrie en milieux diffusants en conditions d'une distribution non homogène des chromophores . . . . .	91
3.3.1	Configuration expérimentale et méthode de travail . . . . .	91
3.3.2	Résultats expérimentaux . . . . .	92
3.3.3	Simulations de Monte Carlo en conditions d'absorbance localisée . . . . .	96
3.3.4	L'effet d'utilisation d'un facteur correctif . . . . .	98
3.3.5	Conclusions . . . . .	101
3.4	Conclusions . . . . .	102

---

Bibliographie . . . . .	103
<b>4 Tomographie Optique Cohérente. Principes théoriques</b>	<b>106</b>
4.1 Introduction . . . . .	107
4.2 Interférométrie à sources lumineuses de faible cohérence . . . . .	108
4.2.1 Calcul de l'intensité lumineuse détectée . . . . .	108
4.2.2 La visibilité des franges d'interférence . . . . .	111
4.2.3 Le signal OCT . . . . .	113
4.3 Tomographie optique cohérente longitudinale . . . . .	114
4.3.1 La résolution en profondeur . . . . .	114
4.3.2 L'effet de la dispersion . . . . .	115
4.3.3 La largeur de bande et le traitement électronique du signal OCT . . . . .	117
4.3.4 Conclusion . . . . .	119
4.4 Tomographie optique cohérente transversale (en-face) . . . . .	120
4.4.1 La résolution transversale . . . . .	121
4.4.2 L'effet d'un faisceau hors d'axe . . . . .	124
4.4.3 La largeur de bande et le traitement électronique du signal OCT . . . . .	126
4.4.4 Conclusion . . . . .	127
4.5 La microscopie confocale et la tomographie optique cohérente . . . . .	127
4.5.1 Pouvoir de résolution longitudinale d'un microscope confocal . . . . .	128
4.5.2 Pouvoir de résolution transversale d'un microscope confocal . . . . .	129
4.5.3 Conclusion . . . . .	131
4.6 Le bruit dans les systèmes OCT . . . . .	131
4.6.1 Sources de bruit . . . . .	132
4.6.2 Le rapport signal/bruit dans une configuration balancée . . . . .	134
4.6.3 Conclusion . . . . .	137
4.7 Conclusions . . . . .	138
Bibliographie . . . . .	139
<b>5 Tomographie optique cohérente. Mise au point d'un système utilisant un miroir vi-</b>	
<b>brant résonant</b>	<b>143</b>
5.1 Régimes de fonctionnement d'un système OCT. Terminologie . . . . .	144
5.2 Dispositif expérimental . . . . .	145
5.2.1 La source lumineuse . . . . .	147
5.2.2 L'interféromètre . . . . .	147
5.2.3 Le système de balayage de la lumière . . . . .	148
5.2.4 La détection et l'acquisition des données . . . . .	151
5.3 Résultats . . . . .	152

---

5.3.1	Les performances du système . . . . .	152
5.3.2	Études sur la largeur de bande du signal généré par le miroir résonant . . .	164
5.3.3	Fonctionnement séquentiel SLO-OCT . . . . .	170
5.3.4	Fonctionnement en mode b-scan . . . . .	171
5.4	Conclusions . . . . .	171
	Bibliographie . . . . .	174
<b>Annexes</b>		<b>177</b>
<b>A Simulations de Monte Carlo en conditions de localisation de l'absorbance : aspects techniques</b>		<b>177</b>
	Bibliographie . . . . .	180
<b>B Le logiciel fitofinvivo</b>		<b>182</b>
	Bibliographie . . . . .	184
<b>C Le calcul de la fréquence du signal OCT transversal</b>		<b>186</b>
C.1	Le cas d'un faisceau au centre du miroir . . . . .	186
C.2	Le cas d'un faisceau hors du centre du miroir . . . . .	187
<b>D La liste de publications et communications</b>		<b>189</b>
D.1	Publications . . . . .	189
D.2	Communications . . . . .	190

---

## Glossaire

---

<b>BPF</b>	=	filtre passe bas
<b>BS</b>	=	diviseur de faisceaux
<b>DC</b>	=	coupleur directionnel
<b>DPF</b>	=	facteur différentiel de la longueur des trajectoires des photons
<b>DSC</b>	=	débit sanguin cérébral
<b>FiO2</b>	=	fraction inspirée en oxygène
<b>FPR2</b>	=	coupleur à fibre optique
<b>Hb</b>	=	hémoglobine désoxygénée
<b>HbO2</b>	=	hémoglobine oxygénée
<b>LDF</b>	=	vélocimétrie Doppler
<b>OCT</b>	=	tomographie optique cohérente
<b>PaCO2</b>	=	pression artérielle partielle en dioxyde de carbone
<b>PaO2</b>	=	pression artérielle partielle en oxygène
<b>RBC</b>	=	globule rouge
<b>RMN</b>	=	résonance magnétique nucléaire
<b>SaO2</b>	=	saturation artérielle en oxygène
<b>ScO2</b>	=	saturation cérébrale en oxygène
<b>SvO2</b>	=	saturation veineuse en oxygène
<b>SLD</b>	=	diode superluminescente
<b>BLO</b>	=	ophtalmoscope laser à balayage
<b>TS</b>	=	platine de translation

---

## Introduction

---

Nous voyons la majorité des objets qui nous entourent grâce à la lumière diffusée qu'ils nous renvoient, et que l'on caractérise par sa couleur, c'est-à-dire son spectre. Le problème qui se pose est de relier cette lumière diffusée à la composition des corps, via les spectres d'absorptions spécifiques des substances absorbantes qu'ils contiennent. Triviale dans le cas de l'analyse par transmission de milieux limpides, la spectrométrie des corps diffusants est compliquée par la nature aléatoire du trajet emprunté par la lumière. De nombreux travaux ont été, et sont encore consacrés à l'étude de la propagation de la lumière dans des milieux diffusants et à ses applications à l'analyse spectrométrique. Dans le domaine de l'optique biomédicale, l'analyse spectrométrique offre la possibilité de développer des dispositifs capables de mesurer des paramètres physiologiques tels que la saturation en oxygène du sang et la concentration totale en hémoglobine. Ce sont *les oxymètres optiques*. Les premiers essais de réalisation d'un oxymètre capable de mesurer la saturation artérielle en oxygène du sang, (la  $SaO_2$ ), de manière continue, remontent à la deuxième guerre mondiale lorsque les scientifiques se sont intéressés à la possibilité de mesurer la  $SaO_2$  des pilotes d'avion pendant leur vols à très grande altitude. Suite aux recherches dans ce domaine, en 1942, Millikan a développé un premier dispositif vraiment pratique qui utilisait le rayonnement optique traversant le lobe de l'oreille [4]. Malheureusement son dispositif n'offrait pas la stabilité et la reproductibilité demandée pour son utilisation clinique. Plus tard, Hewlett-Packard a

réalisé un oxymètre fonctionnant à huit longueurs d'onde [7]. Cet appareil comportait un élément assurant l'échauffement de la peau afin d'obtenir une vasodilatation maximale. Finalement ce dispositif n'a pas été développé à cause de sa grande dimension et de son prix. En 1975, Nakajima a réalisé le premier oxymètre pulsé [5]. Le principe de fonctionnement de cet appareil est basé sur le fait que la concentration de l'hémoglobine dans les artères présente une variation synchronisée avec les battements cardiaques tandis que les capillaires et les veines ne présentent pas cet effet. Ainsi, la lumière transmise à travers une section d'un tissu présente une variation pulsatile caractéristique uniquement au sang artériel. On peut alors en déduire les concentrations relatives des hémoglobines correspondant au sang artériel. En fait, à notre connaissance cet oxymètre est le seul utilisé à grande échelle pour utilisation clinique.

La plupart des ces travaux concernent des situations où la longueur du trajet optique est grande devant le libre parcours moyen, ce qui permet de réduire l'équation de transfert radiatif décrivant la propagation de la lumière à celle d'une simple équation de diffusion. Cette approximation n'est pas valable dans le cas de sondes spectroscopiques de petites tailles constituées de deux fibres optiques de petit diamètre accolées où très proches, l'une servant à éclairer le milieu, l'autre à collecter la lumière diffusée vers l'arrière sont utilisées. Pour cette situation particulière peu de travaux ont été effectués. C'est pour cela que nous avons voulu utiliser les potentialités offertes par la spectrométrie optique pour mettre au point une méthode optique invasive mais locale, de mesure de la saturation cérébrale en oxygène, *in vivo*, à l'aide d'une sonde à fibres optiques aiguilles.

Ainsi, des études sur la dépendance de l'atténuation du rayonnement optique avec le coefficient d'absorption pour un milieu modèle nous ont permis d'envisager des études d'oxymétrie cérébrale, *in vivo*, chez le rat, en conditions d'hypoxémie progressive (diminution de la quantité d'oxygène inspirée). Les conclusions de ces études nous ont amené d'une part à étudier les possibilités de notre système à mettre en évidence la présence d'une ischémie (diminution du débit sanguin provoquée par l'obstruction d'une artère), des variations de l'absorbance optique dues aux variations d'état rédox des enzymes respiratoires, de suivre les réactions hémodynamiques cérébrales provoquées par l'injection d'un bolus optique et d'autre part d'étudier l'effet du confinement de l'absorbance en compartiments cylindriques, situation qui correspond au confinement

du sang dans les vaisseaux sanguins sur les mesures d'oxymétrie cérébrale in vivo. Les avantages d'utilisation d'un tel système pour l'exploration cérébrale sont évidentes : portabilité de l'instrumentation, instrumentation peu sophistiquée et donc peu coûteuse, l'utilisation d'un rayonnement peu dangereux, compatibilité avec expériences simultanées d'imagerie RMN, etc.

Même dans cet instant, la lumière diffusée par cette page est collectée par l'oeil du lecteur et focalisée sur la rétine produisant une série de réactions chimiques qui sont responsables des signaux nerveux envoyés au cerveau. Un traitement ultérieur des signaux donne naissance à des images successives de chaque mot de la page. Cette fonction essentielle de l'oeil a conduit à un considérable intérêt de l'étudier et de le comprendre, par différentes méthodes, dont l'imagerie optique. Cependant une petite partie seulement des technologies optiques utilisées pour l'imagerie tirent parti des propriétés de cohérence de la lumière. Ainsi, même si beaucoup d'instruments utilisent des lasers, qui sont des générateurs de rayonnement cohérent, les lasers ne sont le plus souvent utilisés que pour l'éclairage où bien pour la concentration de la chaleur [6]. En revanche, la Tomographie Optique Cohérente (OCT) a attiré l'attention des chercheurs travaillant dans le domaine de la photonique qui essaient d'utiliser le potentiel de l'OCT afin d'en faire un instrument de diagnostic médical par imagerie. Dans cette direction on peut citer des articles de référence apparus dès les années 1990 : [3],[1],[2].

Nous avons voulu contribuer aux efforts conjugués des scientifiques afin de remplacer les systèmes ophtalmoscopiques à balayage traditionnelles utilisées en clinique par la mise en oeuvre d'un système OCT rapide utilisant un miroir vibrant travaillant à très grande fréquence (4KHz) afin d'évaluer la possibilité d'utiliser la tomographie optique cohérente pour l'oxymétrie du tissu oculaire. Les performances du système construit nous ont confirmé les possibilités énormes de la tomographie optique cohérente pour faire de l'imagerie 3D à grande résolution.

Parce que nous nous sommes occupés de la mise au point de deux systèmes optiques ayant des applications distinctes nous avons opté pour un découpage de cette thèse en chapitres relatifs à la spectrométrie des milieux diffusants et à la tomographie optique cohérente. Ainsi, la thèse est divisée en cinq chapitres. Les premières trois chapitres sont dédiés à la spectrométrie des milieux diffusants. Dans le première chapitre nous développerons quelques aspects théoriques sur la pro-



pagation de la lumière dans un milieu diffusant en insistant sur les possibilités que la spectroscopie en milieu diffusant peut nous fournir pour des mesures absolues des propriétés optiques d'un tel milieu d'une part et les mesures de variations des propriétés optiques d'autre part. Le dixième chapitre est dédié à la présentation des dispositifs expérimentaux, de l'instrumentation, des matériaux et des méthodes utilisées pour la mise en oeuvre du système spectrométrique. Le troisième chapitre est largement consacrée aux résultats expérimentaux obtenus à l'aide de ce système. Dans les chapitre 4 et 5 nous présenterons respectivement les aspects théoriques sur la tomographie optique cohérente et le dispositif expérimental que nous avons mis en oeuvre. Aussi, nous exposerons les principaux résultats expérimentaux obtenus. Finalement, nous conclurons en discutant aussi les perspectives d'évolution et d'application de la spectroscopie de milieux biologiques et des possibilités d'utilisation de la tomographie optique cohérente dans l'oxymétrie du tissu biologique.

*Le travail de cette thèse a été effectué essentiellement au "Laboratoire de Spectrométrie Physique" à Grenoble, mais aussi au "Laboratoire de Spectroscopie en Infrarouge" à la Faculté de Physique de Iasi, Roumanie et au "Physics Laboratory" à l'Université de Kent, Canterbury, Grand Bretagne, étant le résultat d'une thèse en cotutelle entre l'Université "Joseph Fourier" de Grenoble et l'Université "Alexandru Ioan Cuza" de Iasi.*

## **Bibliographie**

- [1] Fercher, A., Hitzzenberg, C., Drexler, W., Kamp, G., and Sattman, H. (1993). In vivo Optical Coherence Tomography. *A.J.Ophthalmol.*, 116 :113–119.
- [2] Fujimoto, J., Brezinski, M., Tearney, G., Boppart, S., Bouma, B., Hee, M., Southern, J., and Swanson, E. (1995). Optical biopsy and imaging using Optical Coherence Tomography. *Nature Med.*, 1 :970–972.
- [3] Huang, D., Swanson, E., Lin, C., Schuman, J., Stinson, W., Wang, W., Hee, M., Flolte, T., Gregory, K., Puliafito, C., and Fujimoto, J. (1991). Optical Coherence Tomography. *Science*, 254 :1178–1181.

- 
- [4] Millikan, G. (1942). The oximeter ; an instrument for measuring continuously oxygen saturation of arterial blood in man. *Rev.Sci.Instrum*, 13 :434–444.
- [5] Nakajima, S., Hinai, Y., Takase, H., and Yamaguchi, K. (1975). New pulsed type earpiece oximeter. *Kokyu to Junkan*, 23.
- [6] Schmitt, J. (1999). Optical Coherence Tomography (oct) : A review. *IEEE J.Sel.Top,Quant.Electron.*, 5(4) :1205–1215.
- [7] Tuchin, V. (2002). *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*. SPIE Press.

---

## Spectrométrie en milieux diffusants. Principes théoriques

---

### Sommaire

---

<b>1.1 Principes théoriques de la propagation de la lumière en milieux absorbants et diffusants . . . . .</b>	<b>7</b>
<b>1.2 La loi de Beer-Lambert et la mesure de concentrations de chromophores .</b>	<b>10</b>
1.2.1 Cas d'un milieu purement absorbant . . . . .	10
1.2.2 Cas d'un milieu à la fois absorbant et diffusant . . . . .	14
<b>1.3 Milieux d'absorbance compartimentée . . . . .</b>	<b>19</b>
1.3.1 Possibilités d'adaptation de la formulation pour le cas des milieux d'absorbance localisée . . . . .	19
1.3.2 Mesures des variations temporelles des concentrations des chromophores en conditions de localisation de l'absorbance . . . . .	22
1.3.3 Modèle de simulation numérique de Monte Carlo . . . . .	24
<b>1.4 Conclusion . . . . .</b>	<b>27</b>
<b>Bibliographie . . . . .</b>	<b>29</b>

---

*Ce chapitre est dédié à la présentation des bases théoriques nécessaires pour l'élaboration des expériences ayant comme but les études des évolutions temporelles de l'oxygénation du tissu vivant cérébral, in vivo, chez le rat et pour la compréhension et l'interprétation des résultats ainsi obtenus. Tout d'abord nous présenterons le formalisme utilisé dans la littérature pour décrire la propagation de la lumière dans un milieu à la fois absorbant et diffusant, catégorie dans laquelle s'inscrit les tissus biologiques et des aspects concernant les possibilités de mesure des concentrations de chromophores dans un tel milieu. Nous focaliserons également notre attention sur le cas des milieux diffusants dans lesquels l'absorbance est distribuée spatialement de manière non homogène.*

## **1.1 Principes théoriques de la propagation de la lumière en milieux absorbants et diffusants**

Afin de faire de la spectrométrie en milieu à la fois diffusant et absorbant, tels que les tissus biologiques, il est nécessaire d'établir une relation analytique entre l'intensité lumineuse recueillie à une certaine distance d'une source lumineuse  $I(r, \lambda)$ , l'intensité de la source  $I_0(0, \lambda)$  et les différents paramètres optiques du milieu dont son coefficient d'absorption  $\mu_a(\lambda)$ . L'un des modèles les plus complets qui décrit la propagation de la lumière dans un tel milieu et qui peut nous donner une telle information est l'équation de transport de Boltzmann. Bien que cela prend en compte tout les aspects concernant la propagation du rayonnement optique, sauf les aspects ondulatoires, cette équation est mathématiquement difficile à résoudre et doit être simplifiée. La méthode la plus utilisée consiste à développer la radiance en chacun point de l'espace en série de puissance d'harmoniques sphériques. En retenant seulement  $n$  termes, l'équation de transport de Boltzmann se réduit à un nombre de  $n$  équations différentielles couplées. Si  $n = 1$ , on peut montrer que la

variation spatio-temporelle de la densité de photons  $\varphi^1$  est décrite par l' équation [2] :

$$-D\nabla^2\varphi(\mathbf{r}, t) + \left[ \mu_a c + \left( 1 + \frac{3D\mu_a}{c} \right) \frac{\partial}{\partial t} + \frac{3D}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right] \varphi(\mathbf{r}, t) = \left( 1 + \frac{3D}{c^2} \frac{\partial}{\partial t} \right) s_0(\mathbf{r}, t) \quad (1.1)$$

où

$$D = \frac{c}{3(\mu_a + \mu_s^*)}, \quad \mu_s^* = \mu_s(1 - g)$$

Dans l'équation de transport  $\varphi$  tient compte des toutes les catégories de photons se propageant dans le milieu, c'est-à-dire les photons *balistiques* (qui ne subissent pas de processus de diffusion), *serpentes* (quelques diffusions) et *diffusés* (un grand nombre de processus de diffusion). Dans la même équation,  $\mu_s$  est le *coefficient de diffusion des photons*,  $g$  s'appelle *coefficient d'anisotropie de la diffusion*  $\mu_s^*$  *coefficient de diffusion réduit* et  $c$  est la vitesse de propagation de la lumière dans le milieu à étudier. En fait, le facteur d'anisotropie  $g$  est une mesure de la déviation de la lumière après un seul processus de diffusion. Si un photon est dévié avec un angle  $\theta$  par rapport à la direction initiale suite au processus de diffusion, alors  $g$  est par définition la composante moyenne de la nouvelle direction de la trajectoire sur la direction initiale :

$$g = \langle \cos \theta \rangle$$

Également, le facteur  $g$  peut être défini à l'aide de la notion de *fonction de phase*  $p(\theta)$  décrivant la probabilité qu'un photon soit dévié de la direction initiale vers une autre direction :

$$g = \int_0^\pi p(\theta) 2\pi \sin \theta \cos \theta d\theta = \langle \cos \theta \rangle \quad (1.2)$$

la fonction de phase étant normalisée, c'est-à-dire :

$$\int_0^\pi p(\theta) 2\pi \sin \theta d\theta = 1 \quad (1.3)$$

---

<sup>1</sup>le nombre de photons par unité de volume

Le tissu biologique diffuse la lumière préférentiellement vers l'avant, et typiquement les valeurs du coefficient d'anisotropie  $g$  sont situées dans la gamme 0.70-0.98 [3]. En intégrant dans une seule quantité  $\mu_s^*$  le coefficient de diffusion et le facteur d'anisotropie on peut décrire la diffusion des photons par des chemins aléatoires de pas  $l^* = 1/\mu_s^*$ , chaque pas impliquant une diffusion isotropique. Une telle description équivalente à la propagation des photons avec des pas de longueur moyenne  $l^* = 1/\mu_s^*$  est valable à condition que la diffusion domine l'absorption, c'est-à-dire  $\mu_a \ll \mu_s^*$  et que la longueur moyenne du trajet des photons soit grande devant  $1/\mu_s^*$ . Un tel régime est appelé *régime de diffusion*, cas dans lequel l'équation de transport se réduit à l'équation de diffusion :

$$-D\nabla^2\varphi(\mathbf{r}, t) + \left( \mu_a c + \frac{\partial}{\partial t} \right) \varphi(\mathbf{r}, t) = s_0(\mathbf{r}, t) \quad (1.4)$$

Dans cette équation, la densité de photons,  $\varphi$ , tient compte seulement des photons diffusés.

A l'aide de l'équation 1.4 une grande variété de géométries peuvent être résolues analytiquement : milieu infini, semi-infini, plaque, cylindre infini, sphère, etc [14],[1]. Ainsi en utilisant des méthodes comme *la spectroscopie résolue dans l'espace* [14],[11] et *la spectroscopie résolue dans le temps* [14] il est possible de résoudre l'équation de diffusion et à partir de là de trouver la relation entre les intensités lumineuses et les paramètres optiques du milieu  $\mu_a$  et  $\mu_s^*$ .

Concrètement, comme nous allons le constater dans les sections suivants, notre intérêt s'est focalisé sur une géométrie à sondes optiques aiguilles ayant comme milieu d'étude le cerveau. Dans une telle géométrie expérimentale nous ne sommes pas dans un régime de diffusion car à cause de la petite distance entre la source et le détecteur, les photons subissent un nombre réduit de diffusions et par conséquent l'équation de transport de Boltzmann ne peut pas nous offrir une relation entre la réflectance lumineuse (le rapport entre  $I(r, \lambda)^2$  et  $I_0(0, \lambda)$ ) et les paramètres optiques du milieu.

<sup>2</sup>Dans une telle géométrie, à sondes aiguilles, l'intensité lumineuse recueillie  $I(r, \lambda)$  est due à la rétrodiffusion de la lumière dans le milieu.

Une alternative à l'utilisation de l'équation de transport est d'exploiter la loi de Beer-Lambert classique en l'adaptant pour le cas des milieux non seulement absorbants mais aussi diffusants et pour la géométrie expérimentale qui nous intéresse.

## 1.2 La loi de Beer-Lambert et la mesure de concentrations de chromophores

### 1.2.1 Cas d'un milieu purement absorbant

#### La loi de Beer-Lambert

Par simplicité, on considère le cas d'une cuvette qui contient un liquide non diffusant dans lequel on dissout un composant absorbant de concentration  $c^3$ . Ensuite, on considère qu'un faisceau collimaté d'intensité lumineuse  $I_0(\lambda)$  traverse la cuvette d'épaisseur  $L$  et émerge avec une intensité lumineuse réduite  $I(\lambda)$ . Comme tout les photons parcourent *des chemins de la même longueur L*, la relation entre  $I(\lambda)$  et  $I_0(\lambda)$  est donnée par la loi de Beer-Lambert classique :

$$I(\lambda) = I_0(\lambda)e^{-\mu_a(\lambda)L} \quad (1.5)$$

où  $\mu_a(\lambda)$  représente *le coefficient d'absorption* du composant absorbant<sup>4</sup>. Par convention on exprime la baisse de l'intensité lumineuse en termes d'unités logarithmiques à l'aide de la densité optique *OD*. Ainsi, une atténuation de 1 *OD* va correspondre à une division par 10 de l'intensité lumineuse. Par ailleurs on va pouvoir écrire :

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = \frac{\mu_a(\lambda)L}{\ln 10} \quad (1.6)$$

<sup>3</sup>l'unité conventionnelle pour la concentration est mol par litre (molaire M)

<sup>4</sup>l'unité conventionnelle pour  $\mu_a$  est  $\text{cm}^{-1}$

Si la substance absorbante est dissoute uniformément dans le liquide alors,  $\mu_a$  va pouvoir être exprimée fonction de  $c$  :

$$\mu_a(\lambda) = 2.3 \times 10^3 \times c \times \varepsilon(\lambda) \quad (1.7)$$

où  $\varepsilon(\lambda)$  est connu comme *le coefficient d'absorption spécifique*<sup>5</sup>. Si on considère maintenant une cuvette dans laquelle nous avons  $n$  absorbants de concentrations  $c_i$ , ( $i = 1 \dots n$ ) et s'il n'y a pas d'interactions chimiques entre ces composants, alors, le coefficient d'absorption s'obtient tout simplement en additionnant la contribution de chaque absorbant :

$$\mu_a(\lambda) = (2.3 \times 10^3) \sum_{i=1}^n c_i \varepsilon_i(\lambda) \quad (1.8)$$

Les équations 1.8 forment les bases de la spectroscopie d'absorption. La loi de Beer-Lambert nous montre que  $\mu_a(\lambda)$  peut être déterminé par mesure de l'atténuation du rayonnement optique si *la longueur du chemin physique parcourue par la lumière dans le milieu étudié est connue*.

Dans les conditions où une variation temporelle des concentrations des chromophores de  $c_i$  à  $c_i + \delta c_i$  se produit entre les instants  $t$  et  $t + \delta t$  alors la variation de l'atténuation lumineuse  $\delta A$  qui résulte peut être exprimée mathématiquement par :

$$\delta A = A(\lambda, t + \delta t) - A(\lambda, t) = \log \left[ \frac{I(\lambda, t)}{I(\lambda, t + \delta t)} \right] = \sum_{i=1}^n \delta c_i \cdot \varepsilon_i(\lambda) \cdot L \quad (1.9)$$

La relation 1.9 nous permet de trouver la variation de la concentration d'un chromophore simplement par une mesure de la variation temporelle de l'atténuation lumineuse dans les conditions où le coefficient d'extinction spécifique du chromophore et la distance entre la source et le détecteur sont connus.

<sup>5</sup>Les unités conventionnelles pour  $\mu_a$  et  $\varepsilon$  sont dans une certaine manière différentes.  $\mu_a$  est exprimé en termes de logarithmes népériennes et son unité est le  $\text{cm}^{-1}$  tandis que  $\varepsilon$  est défini comme le nombre de *OD* d'atténuation produit par l'absorbant à une concentration de 1 mM et pour un chemin physique de 1 cm. Ainsi on peut exprimer  $\mu_a$  vs  $\varepsilon$  par :  $\mu_a = c_a \cdot \varepsilon \cdot \ln(10) \cdot 10^3 = (2.3 \cdot 10^3)c \cdot \varepsilon$ .



## Oxymétrie cérébrale

L'utilité de la spectroscopie d'absorption pour l'oxymétrie cérébrale est évidente lorsque on observe le spectre d'absorption de l'hémoglobine. L'hémoglobine, le plus important absorbant d'un tissu biologique est présente essentiellement sous deux formes, oxygénées ( $HbO_2$ ) et désoxygénées ( $Hb$ ) (voir leurs coefficients d'extinction dans la figure 1.1). Elle est contenue dans les globules rouges, (les *RBC*) et son but est de transporter l'oxygène vers des régions des tissus où la  $PaO_2$  (la pression artérielle partielle en oxygène) est basse. Ainsi, en partant de la connaissance de la

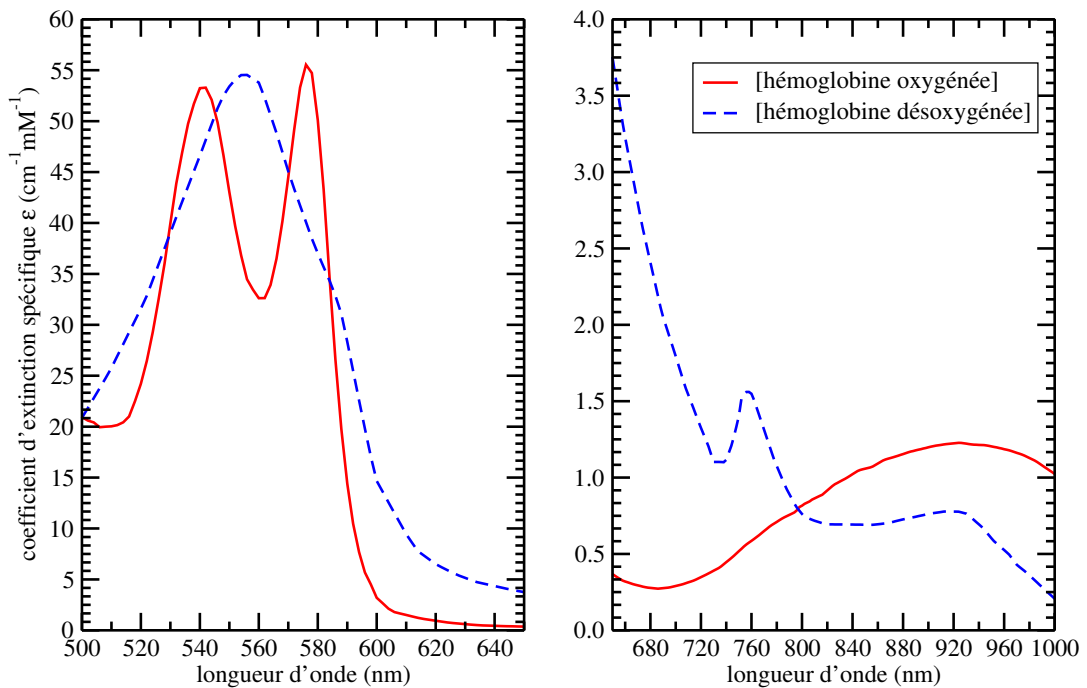


FIG. 1.1 – Le spectre d'absorption de l'hémoglobine oxygénée est désoxygénée [13] dans le domaine spectrale 500-650 dans lequel nous avons fait nos expérimentations et dans le domaine 650-1000 nm.

dépendance des coefficients d'extinctions avec la longueur d'onde et de la supposition qu'il n'y a que deux espèces absorbantes dans le tissu ( $HbO_2$  et  $Hb$ ) on arrive à trouver les concentrations des hémoglobines à l'instant donné en effectuant tout simplement des mesures à deux longueurs

d'onde différentes :

$$\begin{cases} c_{HbO_2}(t) = \frac{1}{L} \times \frac{\varepsilon_{Hb}(\lambda_2) \cdot \log \frac{I(\lambda_1, t)}{I_0(\lambda_1, t)} - \varepsilon_{Hb}(\lambda_1) \cdot \log \frac{I(\lambda_2, t)}{I_0(\lambda_2, t)}}{\varepsilon_{HbO_2}(\lambda_1) \varepsilon_{Hb}(\lambda_2) - \varepsilon_{HbO_2}(\lambda_2) \varepsilon_{Hb}(\lambda_1)} \\ c_{Hb}(t) = \frac{1}{L} \times \frac{\varepsilon_{HbO_2}(\lambda_1) \cdot \log \frac{I(\lambda_2, t)}{I_0(\lambda_2, t)} - \varepsilon_{HbO_2}(\lambda_2) \cdot \log \frac{I(\lambda_1, t)}{I_0(\lambda_1, t)}}{\varepsilon_{HbO_2}(\lambda_1) \varepsilon_{Hb}(\lambda_2) - \varepsilon_{HbO_2}(\lambda_2) \varepsilon_{Hb}(\lambda_1)} \end{cases} \quad (1.10)$$

et d'extraire les valeurs des paramètres physiologiques d'intérêt comme *la saturation cérébrale en oxygène* définit par :

$$S_{cO_2}(t) (\%) = \frac{c_{HbO_2}(t)}{c_{HbO_2}(t) + c_{Hb}(t)} \times 100 \quad (1.11)$$

et *la concentration totale de l'hémoglobine* :

$$c_t(t) = c_{HbO_2}(t) + c_{Hb}(t) \quad (1.12)$$

En conditions réelles il faut tenir compte d'un nombre plus grand de chromophores, nombre qui dépend finalement des conditions expérimentales. Ainsi en certaines expérimentations il faut tenir compte de la présence de la mélanine dans l'épiderme, et en autres, fonction de la longueur d'onde il faut tenir compte ou non de la présence de l'eau. Ce n'est pas le cas du domaine visible et proche infrarouge où l'absorption de l'eau est faible. Finalement les enzymes respiratoires (*les cytochromes*) contribuent à l'absorption et peuvent ainsi être détectés, en particulier le cytochrome c qui présente un pic d'absorption important dans son état oxydé à ~604 nm et un autre pic à ~552 nm cette fois dans son état réduit (voir la figure 1.2 page suivante). La présence d'un nombre de chromophores supérieur nécessite des mesures simultanées à plusieurs longueurs d'onde, la loi de Beer-Lambert devant être écrite pour un nombre  $m$  de longueurs d'onde  $\lambda_j$  supérieure au nombre

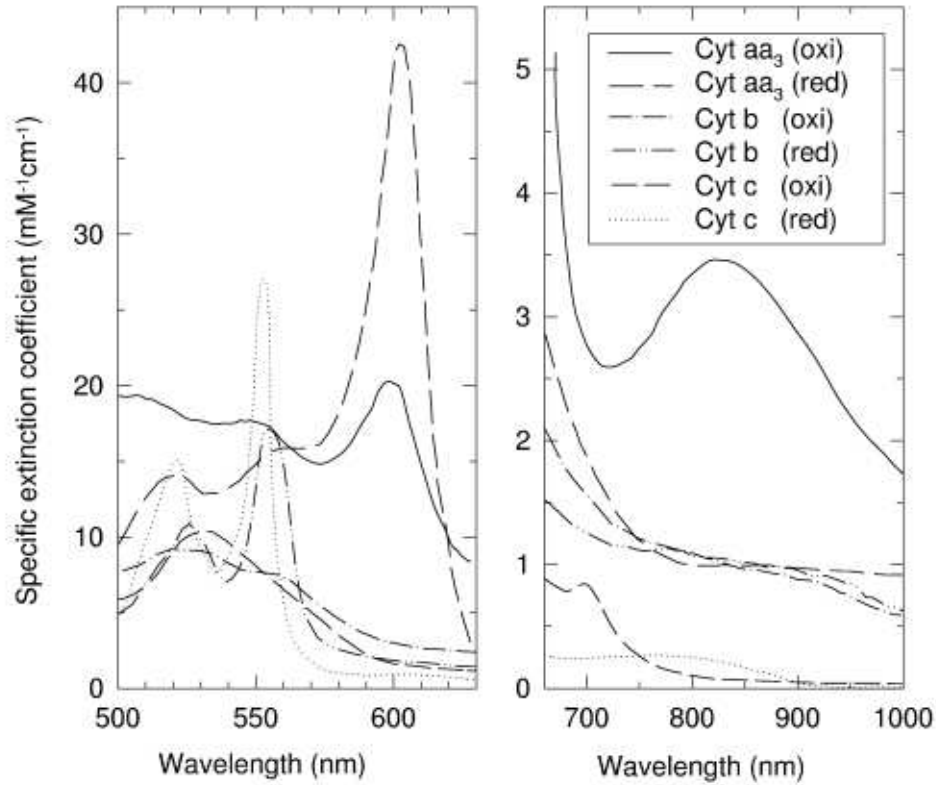


FIG. 1.2 – Les coefficients d'extinction spécifiques du cytochrome aa<sub>3</sub>, cytochrome b<sub>5</sub> et c. Extrait de Cope [4].

$n$  des chromophores :

$$\log \frac{I(\lambda_j, t)}{I_0(\lambda_j, t)} = \sum_{i=1}^n c_i(t) \varepsilon_i(\lambda_j) L \quad (1.13)$$

Le résultat est un système surdéterminé de  $m$  équations linéaires qui peut être résolu par exemple à l'aide d'une méthode de décomposition en valeurs singulières [17].

### 1.2.2 Cas d'un milieu à la fois absorbant et diffusant

Le tissu biologique étant un milieu à la fois absorbant et diffusant le rayonnement optique va interagir avec le milieu suivant deux processus : *l'absorption* qui est directement liée aux concentrations des chromophores et *la diffusion* qui produit aussi une atténuation du rayonnement optique mais indépendamment des concentrations des chromophores. Comme en général on ne peut

pas séparer les atténuations correspondant à chacun des deux processus, la loi de Beer-Lambert mise sous la forme 1.13 ne peut pas être utilisée pour déterminer les concentrations des chromophores<sup>6</sup> et le résultat immédiat est l'impossibilité de quantifier les mesures oxymétriques d'un tissu biologique. Nous verrons dans les sections suivantes qu'un objectif moins ambitieux comme *la quantification des variations des concentrations des chromophores* est un but plus accessible.

### Mesures des variations temporelles des concentrations des chromophores

Considérons un ensemble de photons ayant emprunté des chemins de différentes longueurs entre un point d'émission et un autre de détection. La relation entre l'intensité lumineuse  $I_0(\lambda)$  correspondante aux photons injectés dans le milieu purement diffusant et l'intensité  $I(\lambda)$  mesurée au point de détection lorsque un absorbant de concentration  $c$  est *distribué de manière homogène* dans le milieu, est donnée par la loi de Beer-Lambert mise sous la forme :

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \int_0^{\infty} P(L)e^{-\mu_a(\lambda)L} dL \quad (1.14)$$

où  $P(L)$  est la probabilité qu'un photon parcourt un chemin de longueur  $L$  entre la source et le détecteur lorsque le milieu est purement diffusant. Cette fonction normalisée,

$$\int_0^{\infty} P(L)dL = 1 \quad (1.15)$$

permet de définir la longueur moyenne des trajectoires des photons entre la source et le détecteur :

$$\bar{L} = \int_0^{\infty} P(L)LdL \quad (1.16)$$

Dans les conditions où la concentration d'absorbant est suffisamment petite de sorte que  $\mu_a L \ll 1$ , l'équation 1.14 peut être mise sous la forme :

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \int_0^{\infty} P(L)[1 - \mu_a(\lambda)L]dL = I_0(\lambda)[1 - \mu_a(\lambda)\bar{L}] \quad (1.17)$$

---

<sup>6</sup>En fait les photons vont emprunter des chemins de différentes longueurs entre un point d'émission et l'un de détection, ainsi que pratiquement, l'équation 1.5 reste valable dans les conditions où elle est écrite pour chaque photon.

où en termes d'atténuation lumineuse :

$$A(\lambda) = \frac{1}{\ln 10} \cdot \mu_a(\lambda) \cdot \bar{L} \quad (1.18)$$

Cette relation peut aisément être généralisée au cas où la petite variation de la concentration du chromophore de  $c$  à  $c + \delta c$  entre les instants  $t$  et  $t + \delta t$ , produit une variation du coefficient d'absorption de  $\mu_a$  à  $\mu_a + \delta\mu_a$ . Dans ce cas, on peut exprimer la variation de l'atténuation lumineuse entre les instants  $t$  et  $t + \delta t$  par :

$$\delta A(\lambda) = A(\lambda, t + \delta t) - A(\lambda, t) = \log \left[ \frac{I(\lambda, t + \delta t)}{I(\lambda, t)} \right] = \delta c \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot r_{sd} \cdot DPF(\lambda) \quad (1.19)$$

Dans l'équation 1.19,  $r_{sd}$  est la distance géométrique entre le point source et le point de détection, tandis que  $DPF^7$  est le *facteur différentiel de la longueur des trajectoires des photons*. Le  $DPF$  est une fonction dépendante des propriétés d'absorption et de diffusion du milieu et représente le rapport d'entre la longueur moyenne des trajectoires des photons et la distance géométrique entre la source et le détecteur<sup>8</sup>. En fait en prenant un facteur  $DPF$  égal à l'unité on retrouve une équation de type 1.9 page 11 trouvée pour le cas des milieux purement absorbants non diffusants.

L'équation 1.19 peut être généralisée aisément au cas des milieux diffusants contenant plusieurs types de chromophores. Considérons que dans le milieu diffusant il y ait un nombre  $n$  de chromophores caractérisés par leurs absorbances  $\varepsilon_i$ , et leurs concentrations à l'instant  $t$ ,  $c_i$ . A l'instant  $t + \delta t$  leur concentrations deviendront  $c_i + \delta c_i$ . Ainsi, la généralisation de l'équation 1.19 est possible en remplaçant la quantité  $\delta c \cdot \varepsilon$  par la somme  $\sum_{i=1}^n \delta c_i \varepsilon_i$ , l'équation obtenue ayant  $n + 1$  inconnues ( $n$  variations des concentrations plus le  $DPF$ ). En faisant des mesures pour  $m$  longueurs d'onde différentes, il en résulte le système d'équations :

$$\delta A(\lambda_j) = \sum_{i=1}^n \delta c_i \cdot \varepsilon_i(\lambda_j) \cdot r_{sd} \cdot DPF(\lambda_j), \quad j = 1..m \quad (1.20)$$

<sup>7</sup>Differential Pathlength Factor

<sup>8</sup>On peut aussi définir mathématiquement le facteur DPF comme  $DPF = \frac{1}{r_{sd}} \cdot \frac{\partial A}{\partial \mu_a}$

Malheureusement, le fait que le facteur  $DPF$  soit une fonction de la longueur d'onde fait que le système 1.20 est un système de  $m$  équations *non linéaires sous déterminé* qui ne peut pas être résolu. C'est pour cela qu'en vue de la détermination des variations temporelles des concentrations des chromophores la connaissance de la dépendance du facteur  $DPF$  avec la longueur d'onde est vitale.

### **Possibilités de mesure du facteur $DPF$ et de la saturation cérébrale en oxygène**

Conformément à l'équation 1.19 la détermination du facteur  $DPF$  apparaîtrait assez facile : il faut tout simplement augmenter le coefficient d'absorption du milieu d'une quantité connue  $\delta\mu_a$  et il faut mesurer la variation de l'atténuation. Cette méthode peut être utilisée en ajoutant dans le milieu une concentration connue d'une composante absorbante. In vivo ce n'est pas facile à faire car il est très difficile de contrôler l'augmentation de la concentration de la composante absorbante dans le tissu qui nous intéresse.

Les scientifiques ont développé plusieurs méthodes de détermination du facteur  $DPF$ , comme la méthode du temps de vol des photons [1],[6] ou des méthodes aux traceurs [5]. La première méthode est la plus simple qui existe pour la mesure du  $DPF$  et consiste juste dans la mesure du temps de vol des photons entre source et détecteur. Cette méthode exige malheureusement une géométrie expérimentale semi-infinie et suppose que les tissus ont des propriétés optiques homogènes sur une région de l'espace assez grande. Les méthodes aux traceurs, contrairement à la méthode précédente utilise le rayonnement optique en continu. Considérons un milieu trouble contenant en plus de chromophores connus, un chromophore supplémentaire, de concentration connue qui présente un élément distinctif à une certaine longueur d'onde et qui, en l'absence de diffusion a une amplitude  $\zeta$  par unité de concentration. Ainsi, l'effet des diffusions multiples sera la multiplication du facteur  $DPF$  par  $\zeta$ , c'est-à-dire :  $DPF(\lambda) \cdot \zeta$ . En mesurant l'amplitude d'un élément distinctif, on va pouvoir mesurer le  $DPF$ . Cependant, même si cette méthode est très simple, elle présente des désavantages : il faut connaître la concentration d'absorbant ajouté et d'autre part on obtient le  $DPF$  à une seule longueur d'onde.

Malheureusement il semble que pour le cas que nous intéresse (géométrie expérimentale à sondes

optique aiguilles) il n'y aucune possibilité, ni expérimentale, ni théorique (nous ne sommes pas dans un régime de diffusion) de déterminer la dépendance du  $DPF$  avec la longueur d'onde. Le résultat immédiat est l'impossibilité de déterminer des *variations quantitatives temporelles des concentrations des chromophores* même pas pour le cas particulier où le  $DPF$  ne dépend pas de la longueur d'onde. Néanmoins, dans ce cas particulier on peut extraire la valeur de la saturation cérébrale en oxygène dans l'hypothèse qu'entre les instants  $t$  et  $t + \delta t$  la  $S_cO2$  reste inchangée. Envisageons donc qu'entre les instants  $t$  et  $t + \delta t$  il se produit une variation de l'atténuation lumineuse  $\delta A(\lambda)$ , atténuation due uniquement à une modification du contenu en sang du tissu et supposons que les seuls chromophores endogènes du tissu sont l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée. Cette atténuation peut s'exprimer mathématiquement par :

$$\delta A(\lambda) = \delta c_{HbO2} \varepsilon_{HbO2}(\lambda) r_{sd} DPF + \delta c_{Hb} \varepsilon_{Hb}(\lambda) r_{sd} DPF \quad (1.21)$$

Cette équation ne permet pas l'estimation quantitative des variations de concentrations des hémoglobines, mais nous permet d'évaluer les quantités  $\delta c_{HbO2} \cdot r_{sd} \cdot DPF$  et  $\delta c_{Hb} \cdot r_{sd} \cdot DPF$  et à l'aide de l'équation 1.11 page 13 d'extraire la saturation cérébrale en oxygène :

$$S_cO2(t) = S_cO2(t + \delta t) = \frac{\delta c_{HbO2} \cdot r_{sd} \cdot DPF}{\delta c_{HbO2} \cdot r_{sd} \cdot DPF + \delta c_{Hb} \cdot r_{sd} \cdot DPF} \quad (1.22)$$

Bien sûr, les simulations numériques de Monte Carlo peuvent être une solution pour l'étude de la dépendance du facteur  $DPF$  avec la longueur d'onde. En s'ajustant pratiquement à toutes les conditions expérimentales, les simulations de Monte Carlo nous donnent des informations sur la distribution des chemins des photons entre le point source et le point de détection dans les conditions où *on connaît déjà les propriétés optiques du milieu*. Les simulations nous permettent d'extraire les valeurs du  $DPF$  pour différents milieux modèles et d'adapter les résultats ainsi obtenus pour le cas du tissu biologique vivant. Ainsi, en partant de la connaissance des valeurs absolues de la concentration des hémoglobines, des nombreux auteurs ont proposé différentes techniques spectroscopiques pour des évaluations quantitatives d'autres paramètres hémodynamiques comme

le débit [8] et le volume [22] sanguin cérébral.

### 1.3 Milieux d'absorbance compartimentée

*Dans les sections précédentes il a été tacitement accepté que les chromophores sont répartis uniformément dans le milieu. Ceci ne correspond pas du tout à une situation réelle parce que le sang, principal absorbant présent dans le tissu biologique n'est pas distribué de manière homogène mais est compartimenté en artères et veines qui peuvent avoir des diamètres variant entre quelques microns jusqu'à quelques millimètres (pour les humains). La question qui se pose est comment peut-on utiliser dans ce cas la loi de Beer-Lambert ?*

#### 1.3.1 Possibilités d'adaptation de la formulation pour le cas des milieux d'absorbance localisée

A notre connaissance, il existe dans la littérature quelques modèles assez bien mis au point étudiant la propagation du rayonnement optique en milieux diffusants dans lesquels les chromophores sont localisés dans des compartiments. Même si les premières études de spectroscopie d'absorption en conditions de localisation de l'absorbance remontent à l'année 1956 [7], ce problème a connu un regain d'intérêt assez récemment en relation avec les applications biomédicales. On peut citer dans cette direction les travaux de Liu et al [12], Firbank et al [10], Verkruysse et al [19], Sterenborg et al [18].

Les modèles théoriques proposés suggèrent la possibilité que la formulation utilisée dans le cas des milieux d'absorbance distribuée de manière homogène reste valable avec certaines conditions pour le cas d'un confinement de l'absorbance [12],[10]. Généralement ces conditions sont liées à la valeur du produit entre le coefficient d'absorption du chromophore confiné et la dimension du *paquet* absorbant mais sont indépendantes de la fraction volumique occupée par les paquets absorbants dans le milieu diffusant. La valeur de la fraction volumique occupée par les paquets absorbants va directement modifier la valeur du facteur *DPF*.

Comme exemple, la théorie développée par Liu et al [12] suggère une équivalence entre le forma-



lisme utilisé en condition de compartimentation et celui de la distribution homogène de l'absorbance dans les conditions où la relation ci dessous est remplie :

$$0.5 \times d \times \mu_a^c \ll 0.1 \quad (1.23)$$

où  $d$  est le diamètre des cylindres dans lesquels l'absorbance est confinée et  $\mu_a^c$  le coefficient d'absorption des chromophores confinés dans les paquets. Pour notre domaine spectral d'intérêt, cette condition est applicable seulement pour un confinement du sang dans des vaisseaux sanguins de petit diamètre. Ainsi, pour  $\lambda = 540$  nm, le coefficient d'extinction de l'hémoglobine est approximativement de  $54 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [13] et la concentration typique de l'hémoglobine dans le sang est environ de  $2.3\text{mM}$  ( $150\text{g/l}$ ) [4]. Dans ces conditions, l'équation 1.23 est valable pour des diamètres de vaisseaux sanguins inférieurs à  $7 \mu\text{m}$ . Comme chez le rat, la dimension typique des artères pénétrant le cortex est environ de  $40 \mu\text{m}$  [9], il en résulte qu'en principe, dans notre domaine spectral d'intérêt il faudrait s'attendre à un comportement de l'atténuation lumineuse différent du cas homogène.

Au lieu de construire un modèle de propagation du rayonnement optique en milieux diffusants où l'absorbant est localisé il est sûrement plus convenable de corriger le coefficient d'absorption effectif du milieu de façon à en déduire de manière plus précise les concentrations de chromophores.

Ainsi, Sterenborg et Verkruijsse [19],[18] ont suggéré que toute la formulation utilisé pour les milieux d'absorbance distribuée de manière homogène est applicable aux milieux ayant les chromophores localisés si le coefficient d'absorption effectif du milieu<sup>9</sup> est corrigé avec un facteur tenant compte de la dimension du paquet absorbant et le coefficient d'absorption du chromophore contenu par le paquet :

$$C(\lambda) = \frac{1 - e^{-2\mu_a(\lambda)R}}{2R\mu_a(\lambda)} \quad (1.24)$$

<sup>9</sup>c'est-à-dire le produit entre le coefficient d'absorption des chromophores dans le paquet absorbant et la fraction occupée par les paquets absorbants dans le milieu.

où  $R$  est le rayon des cylindres constituant les paquets absorbants. L'expression corrigée du coefficient d'absorption effectif du milieu va être :

$$\mu_a^{eff}(\lambda) = f_c \cdot C \cdot \mu_a^t(\lambda) + 2.3 \cdot \sum_i c_i \varepsilon_i(\lambda) \quad (1.25)$$

Dans la dernière relation,  $\mu_a^t(\lambda)$  est le coefficient total d'absorption du tissu,  $c_i$  et  $\varepsilon_i(\lambda)$  sont respectivement les concentrations et les coefficients d'absorption des chromophores dispersés de manière homogène et  $f_c$  la fraction volumique occupée par les paquets absorbants dans le milieu.

Supposons qu'on soit dans le cas particulier du tissu cérébral où il n'y a pas de chromophores dispersés de manière homogène (le terme  $\sum_i c_i \varepsilon_i(\lambda)$  de l'équation précédente disparaît) et que les absorbants présents dans les compartiments sont l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée. Dans ce cas, la forme modifiée de l'équation 1.21 page 18 est :

$$\delta A(\lambda) = \delta c_{HbO_2} \varepsilon_{HbO_2}(\lambda) r_{sd} DPF \cdot f_c \cdot C(\lambda) + \delta c_{Hb} \varepsilon_{Hb}(\lambda) r_{sd} DPF \cdot f_c \cdot C(\lambda) \quad (1.26)$$

où le coefficient de correction est évalué à l'aide de la relation 1.24 dans laquelle le coefficient d'absorption  $\mu_a$  est remplacé par le coefficient d'absorption du sang se trouvant dans les compartiments absorbants :

$$\mu_a^{sang} = \ln(10) \cdot c \cdot [\alpha \varepsilon_{HbO_2}(\lambda) + \beta \varepsilon_{Hb}(\lambda)] \quad (1.27)$$

où les paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  satisfont la relation  $\alpha + \beta = 1$  et tiennent compte de la saturation en oxygène dans le compartiment absorbant et  $c = 2.3$  mM est la concentration de l'hémoglobine dans le sang. Une exemple de la dépendance du coefficient de correction avec la longueur d'onde pour différentes dimensions des vaisseaux sanguins est présentée sur la figure 1.3. Dans ces exemples, la saturation de l'hémoglobine dans le sang est supposée comme égale à 60 %.

Nous retenons de ces études théoriques que la formulation utilisée pour une répartition uniforme de l'absorbance en vue de l'extraction des concentrations des chromophores et des études d'oxymétrie cérébrale pourrait être adaptée sous certaines conditions au cas des milieux où l'absorbance est localisée. Malheureusement nous n'avons aucune information sur la possibilité de

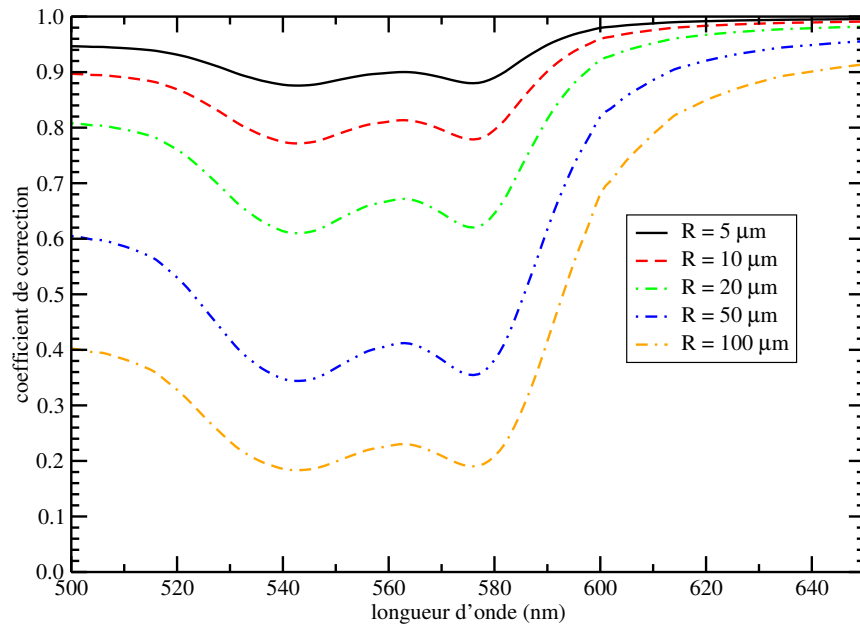


FIG. 1.3 – Les valeurs du coefficient de correction  $C$  défini suivant la formule 1.24 correspondant aux vaisseaux de sang de rayon 5, 10, 20, 50 et 100  $\mu\text{m}$ . Les calculs ont été faits en supposant une saturation du sang de 60%.

généralisation de cette conclusion pour notre cas particulier d'une géométrie à sondes optiques aiguilles dans laquelle le milieu d'intérêt est le cerveau du rat.

### 1.3.2 Mesures des variations temporelles des concentrations des chromophores en conditions de localisation de l'absorbance

Il est bien clair que dans conditions où l'absorbance est localisée la quantification des concentrations des chromophores reste toujours impossible. La question qui se pose est : *est-ce qu'une formulation similaire à celle présentée dans la section 1.2.2 nous permettrait d'extraire les variations temporelles des concentrations des chromophores ?*

Considérons, par simplicité un milieu dans lequel le coefficient d'absorption est le même dans tous les paquets absorbants. Dans ce cas, la loi de Beer-Lambert liant l'intensité lumineuse  $I_0(\lambda)$  correspondante aux photons injectés dans le milieu purement diffusant et l'intensité  $I(\lambda)$  mesurée

au point de détection lorsque dans le milieu il y a des paquets absorbants est :

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \int_0^\infty \int_0^\infty P(L_c, L_b) e^{-\mu_a^c(\lambda)L_c - \mu_a^b(\lambda)L_b} dL_c dL_b \quad (1.28)$$

Dans cette équation  $P(L_c, L_b)$  est la probabilité qu'un photon parcourt une trajectoire de longueur  $L_c$  dans les paquets absorbants et  $L_b$  dans le milieu les entourant entre le point d'émission et de détection, et  $\mu_a^c(\lambda)$  et  $\mu_a^b(\lambda)$  sont respectivement les coefficients d'absorption des chromophores dans les paquets absorbants et dans le milieu les entourant. Considérant que le milieu dans lequel se trouvent les paquets absorbants n'est pas absorbant ( $\mu_a^b(\lambda) = 0$ ) on peut évaluer de manière analogue au cas de l'absorbance homogène que la variation de l'atténuation lumineuse entre les instants  $t$  et  $t + \delta t$  produite par une faible variation de la concentration des chromophores dans les paquets absorbants est :

$$\delta A(\lambda) = \frac{1}{\ln 10} \times \delta \mu_a^{eff}(\lambda) \cdot \frac{r_{sd}}{f_c} \cdot DPF_c(\lambda) \quad (1.29)$$

où  $f_c$  représente la fraction volumique occupée par les paquets absorbants dans le milieu et  $\mu_a^{eff}(\lambda) = \mu_a^c(\lambda) \cdot f_c$  le coefficient effectif d'absorption du milieu.

Comme dans le cas où l'absorbance est répartie uniformément dans le milieu, la connaissance de la dépendance du facteur  $DPF_c$  avec la longueur d'onde est toujours vitale pour faire de mesures quantitatives des concentrations des chromophores. Malheureusement cette dépendance est toujours inconnue et les possibilités d'être mesurée expérimentalement plus limitées.

Néanmoins, nous attendons une dépendance du facteur  $DPF_c$  avec la concentration des chromophores différente entre le cas du milieu d'absorbance compartimentée de celui de la distribution homogène. En particulier on attend une tendance du facteur  $DPF_c$  à ne plus dépendre de la concentration des chromophores à partir d'une certaine valeur de la concentration. Nous justifions cela par le fait qu'il y aura toujours des photons arrivant au détecteur sans croiser les paquets absorbants. Comme résultat nous attendons à ce que l'atténuation lumineuse atteigne une valeur de saturation dépendant de la fraction occupée par les paquets absorbants dans les milieux.

### 1.3.3 Modèle de simulation numérique de Monte Carlo

Due au manque de modèles théoriques d'étude de la propagation de la lumière en milieux d'absorbance compartimentée, les simulations numériques de Monte Carlo représentent un outil efficace de compréhension et d'interprétation des résultats expérimentaux. Cependant, la mise en oeuvre d'un tel programme de simulation numérique est une tâche assez difficile. Premièrement l'existence de plusieurs types de "particules" à la fois absorbantes et diffusantes (d'une part les paquets absorbants (les vaisseaux sanguins) qui sont eux même des structures diffusantes et d'autre part les autres constituants du tissu cérébral) implique l'utilisation d'algorithmes de programmation complexes ayant comme résultat l'augmentation du temps de calcul et la baisse de l'exactitude des résultats. Deuxièmement l'implémentation du programme de simulation est limitée par le manque d'informations sur la fonction de phase, l'orientation et la distribution spatiale des vaisseaux sanguins.

En raison de cela nous proposons un modèle de simulation numérique de Monte Carlo basé sur des principes présentés dans différentes études ([21], [16], [20]) dans lequel on introduit comme particularité la localisation spatiale des chromophores en compartiments cylindriques.

Dans la littérature (voir par exemple les références [12] et [10]) les simulations numériques tenant compte de la présence de deux types d'absorbants sont très simples : on prend une géométrie bi-dimensionnelle et on fixe la position spatiale des absorbants. La réalité est bien plus complexe. Le premier pas d'une simulation numérique de Monte Carlo est d'établir la longueur du pas des paquets de photons, or cette longueur dépend des propriétés optiques du milieu, c'est-à-dire des coefficients d'absorption et de diffusion. Comme il y a deux types de diffuseurs nous allons avoir des coefficients optiques caractéristiques pour les deux milieux ! Quel est dans ce cas la formule qui nous permet calculer le pas du photon ? Nous supposons tout simplement que la probabilité qu'un photon croise un vaisseau sanguin est égale à la fraction volumique que les vaisseaux occupent dans le tissu ainsi le type de particule que le photon va croiser est tiré au sort et on établit

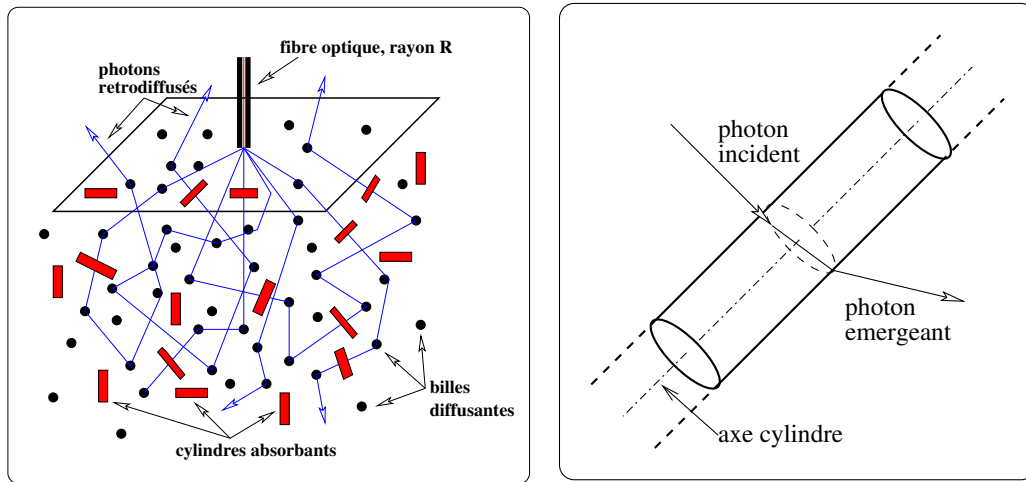


FIG. 1.4 – La propagation des photons dans le milieu de point de vue de la simulation numérique de Monte Carlo. Comme on peut observer, nous supposons que les photons arrivent toujours perpendiculairement sur l'axe des cylindres.

la longueur du pas des paquets de photons à l'aide d'une équation de type :

$$l = -\frac{\ln \xi}{\mu_t} \quad (1.30)$$

$\xi$  étant un nombre aléatoire qui prend des valeurs uniformément entre 0 et 1, tandis que,  $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ . La motivation de cette approche s'appuie sur les études de Liu et al [12]. En fait, Liu dans son modèle de propagation de la lumière en milieu d'absorbances compartimentées montre que la probabilité qu'un photon croise un paquet absorbant est proportionnelle à la fraction volumique occupée par ces paquets, le facteur de proportionnalité étant égal à l'unité si la valeur du paramètre de Mie<sup>10</sup> est proche de 1. Le cas où le paquet de photons ne croise pas de vaisseau sanguin est simple parce qu'on est dans la situation d'une simulation de Monte Carlo traditionnelle : nous établissons la direction de diffusion à l'aide d'une fonction de phase Henyey-Greenstein et on modifie le nombre

<sup>10</sup>Le paramètre de Mie est défini par le rapport entre l'indice de réfraction du paquet absorbant et l'indice du milieu l'entourant

de photons du paquet en le multipliant par la quantité :

$$\varrho = \frac{\mu_s}{\mu_s + \mu_a} \quad (1.31)$$

connue dans la littérature comme *albédo* [16]. Une valeur d'albédo  $\varrho = 1$  correspond au milieu purement diffusant, tandis que  $\varrho = 0$  au milieu purement absorbant. Nous choisissons comme fonction de phase une fonction de phase Henyey-Greenstein pour décrire la diffusion sur les structures tissulaires entourant les vaisseaux de sang non seulement à cause de sa simplicité mathématique mais aussi parce qu'elle décrit de manière satisfaisante la diffusion dans le tissu biologique [23],[15] :

$$p(\theta) = \frac{1}{4\pi} \cdot \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g\cos\theta)^{3/2}} \quad (1.32)$$

La situation semble être plus compliquée si les paquets de photons croisent les vaisseaux sanguins, car la diffusion est fonction de l'angle d'incidence des photons sur les vaisseaux. Par simplicité nous supposons que les photons arrivent perpendiculairement à l'axe des vaisseaux sanguins (voir la figure 1.4 page précédente). Nous justifions cela par le fait que les photons arrivant avec des angles d'incidence grands sur les cylindres parcourent des trajectoires longues dans les vaisseaux et leur chance d'être absorbés est très grande. En fait, par un simple calcul on peut montrer qu'environ 95% des photons d'un paquet arrivant avec un angle d'incidence de  $20^\circ$  sur un vaisseau sanguin de diamètre  $100 \mu\text{m}$  sont absorbés<sup>11</sup>. C'est pour cela que nous supposons que les photons arrivant à des angles d'incidences supérieures à  $30^\circ$  sont complètement perdus et la direction des autres photons est pratiquement perpendiculaire à l'axe du vaisseaux. Nous justifions la dernière affirmation par le fait que la longueur des trajectoires des photons dans le vaisseau lorsque les photons arrivent perpendiculairement à l'axe (figure 1.5 page suivante) et lorsque les photons arrivent sur angles d'incidence inférieures à  $30^\circ$  sont comparable au diamètre des vaisseaux.

A partir de ces suppositions on peut calculer la direction de diffusion des photons en utilisant une fonction de phase de Mie pour des cylindres infiniment longs, et le nouveau nombre des

<sup>11</sup>Calcul fait pour  $\lambda=540 \text{ nm}$ , une concentration des hémoglobines dans le sang de  $2.3 \text{ mM}$  et un indice de réfraction relatif des vaisseaux sanguins de  $1.16$ .

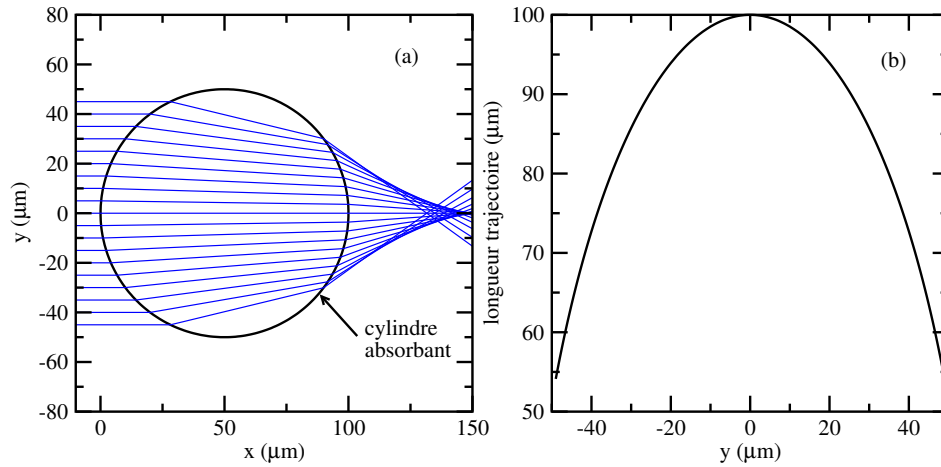


FIG. 1.5 – Les trajectoires des photons par un vaisseau de sang de  $100 \mu\text{m}$  en diamètre (a) et la dépendance de la longueur des trajectoires des photons dans le vaisseau en fonction de la position d’incidence (b). Les représentations correspondent à un indice de réfraction relatifs des vaisseaux sanguins de 1.16.

photons du paquet par multiplication par  $e^{-2\mu_a^{sang}d}$ , où  $d$  est la longueur de la trajectoire des photons dans le cylindre et  $\mu_a^{sang}$  le coefficient d’absorption du sang dans les vaisseaux sanguins.

Plusieurs détails sur la réalisation du programme de simulation de Monte Carlo sont présentés dans l’annexe A.

## 1.4 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons vu comment on peut extraire des informations concernant les valeurs des concentrations des chromophores présents dans un milieu diffusant à partir des mesures de l’atténuation du rayonnement optique. En particulier, nous nous sommes intéressé à la possibilité d’extraire les concentrations des chromophores présents dans le tissu biologique (hémoglobine oxygénée et désoxygénée) et de mesurer la saturation cérébrale en oxygène.

Nous sommes arrivés à la conclusion (pour le cas des milieux diffusants où l’absorbance est répartie uniformément et aussi pour le cas des milieux où l’absorbance est confinée) que les concentrations des chromophores qui nous intéresse ne peuvent pas être quantifiées, l’étude de leurs variations temporelles semblant être un but plus accessible.

Dans les chapitres suivants nous allons voir en quelle mesure les limitations dans la quantifi-



cation des concentrations peuvent restreindre les études d'oxygénation cérébrale et comment on peut utiliser les éléments théoriques présentées afin d'extraire un maximum d'informations sur l'hémodynamique cérébrale, in vivo, chez le rat.

## Bibliographie

- [1] S.R. Arridge, M. Cope, and D.T. Delpy. The theoretical basis for determination of pathlengths in tissue : temporal and frequency analysis. *Phys.Med.Biol.*, 37 :1531–1560, 1992.
- [2] S. Chandrasekhar. *Radiative transfer*. Dover, New York, 1960.
- [3] W.F. Cheong, S.A. Prahl, and A.J. Welch. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE J.Quantum Electronics*, 26 :2166–2185, 1993.
- [4] M. Cope. *The developement of a near infrared spectroscopy system and its application for non invasive monitoring of cerebral blood and tissue oxygenation in the newborn infant*. PhD thesis, University of London, 1991.
- [5] M. Cope and D.T. Delpy. System for long-term measurement of cerebral blood and tissue oxygenation on newborn infants by near infrared transillumination. *Med.Biol.Eng.Comput.*, 26 :289–294, 1988.
- [6] D.T. Delpy, M.Cope, P.van.der Zee, S.R.Arridge, S.Wray, and J. Wyatt. Estimation of optical pathlength through tissue from direct time of flight measurement. *Phys.Med.Biol.*, 33 :1433–1442, 1988.
- [7] L.N.M. Duysens. The flattening of the absorption spectrum of suspensions as compared to that of solutions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 9 :1–12, 1956.
- [8] A.D. Edwards, C. Richardson, P. van der Zee, C.E. Elwell, J.S. Watt, M. Cope, D.T. Delpy, and E.O.R. Reynolds. Measurement of haemoglobin blood flow by near infrared spectroscopy. *J.Appl.Physiol.*, 75 :1884 :1889, 1993.
- [9] C.E. Elwell. *The physical principles of near infrared spectroscopy*. Hamamatsu Photoncs, 1995.
- [10] M. Firbank, E. Okada, and T. Delpy. Investigation of the effect of discrete absorbers upon the measurement of blood volume with near infrared spectroscopy. *Phys.Med.Biol.*, 42 :465–477, 1997.

- 
- [11] B. Gelebart. *Réfectance résolue dans le temps et dans l'espace appliquée à l'étude de milieux stratifiés*. PhD thesis, Université Paris Nord, 1998.
- [12] H. Liu, A.H. Hielsher, S.L. Jacques, and F.K. Kittel. Influence of blood vessels on the measurement of hemoglobin oxygenation as determined by time reflectance spectrophotometry. *Med.Phys.*, 22 :1209–1217, 1995.
- [13] OMLC. <http://omlc.ogi.edu>. Technical report, OMLC, 2001.
- [14] M.S. Patersson, B. Chance, and B.C. Wilson. Time resolved reflectance and transmittance for the noninvasive measurement of tissue optical properties. *Appl.Opt.*, 28 :2331–2336, 1989.
- [15] S.A. Prahl. *Light Transport in Tissue*. PhD thesis, University of Texas at Austin, 1988.
- [16] S.A. Prahl, M. Keijzer, S.L. Jacques, and A.J. Welch. A Monte Carlo model of light propagation in tissue. *SPIE Institute Series*, IS 5 :102–111, 1989.
- [17] WH Press, SA Teukolsky, W.T. Vetterling, and B.P. Flannery. *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, 1992.
- [18] R.L.P.van Vee and H.J.C.M. Sterenborg. Correction for inhomogeneously distributed absorbers in spatially resolved diffuse reflectance spectroscopy. *Proc.SPIE*, 4431 :192–194, 2001.
- [19] W. Verkrusse, G.W. Lucassen, J.F. deBoer, D.J. Smithies, J.S. Nelson, and M.J.C. vanGemert. Influence of blood vessels on the measurement of hemoglobin oxygenation as determined by time reflectance spectroscopy. *Med.Phys.*, 22 :1209–1217, 1995.
- [20] L. Wang and S.L. Jacques. Hybrid model of Monte Carlo simulation and diffusion theory for light reflectance by turbid media. *J.Opt.Soc.Am. A*, 10 :1746–1752, 1993.
- [21] L.W. Wang, S.L. Jacques, and L. Zheng. Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. *Computer Methodes and Programs in Biomedicine*, 47 :131–146, 1998.

- 
- [22] J.S. Wyatt, M.Cope, D.T. Delpy, C.E. Richardson, A.D. Edwards, S.Wray, and E.O.R. Reynolds. Quantification of cerebral blood volume in human infants by near infrared spectroscopy. *J.Appl.Physiol.*, 68 :1086 :1091, 1990.
- [23] A.N. Yaroslavsky, I.V. Yaroslavsky, T. Goldbach, and H.J. Schwarzmaier. Different phase fonction approximations to determine optical properties of blood : a comparation. *Proc. SPIE*, 2982 :324–330, 1997.

---

### Spectrométrie en milieux diffusants au moyen de sondes optiques aiguilles : dispositif expérimental, méthodes, matériels

---

#### Sommaire

---

<b>2.1 Dispositif expérimental</b> . . . . .	<b>33</b>
2.1.1 Principes de base . . . . .	33
2.1.2 La source lumineuse . . . . .	35
2.1.3 Les sondes optiques . . . . .	35
2.1.4 L'estimation du volume exploré par le rayonnement optique . . . . .	36
2.1.5 Les spectromètres . . . . .	38
2.1.6 Traitement des données . . . . .	41
<b>2.2 La préparation des fantômes optiques</b> . . . . .	<b>42</b>
2.2.1 Le calcul des propriétés de diffusion et du facteur d'anisotropie d'un milieu modèle . . . . .	43
2.2.2 L'absorption du milieu modèle . . . . .	45
2.2.3 La préparation des fantômes optiques d'absorbance localisée . . . . .	45
2.2.4 La préparation des fantômes optiques contenant du sang . . . . .	48

2.2.5 Milieux modèles à base de microsphères de latex : de la théorie à la pratique . . . . .	49
<b>2.3 Techniques et protocoles biologiques . . . . .</b>	<b>53</b>
2.3.1 Le modèle animal, le protocole et le dispositif expérimental . . . . .	53
2.3.2 Injection d'un produit de contraste . . . . .	56
2.3.3 Vélométrie Doppler . . . . .	57
<b>2.4 Conclusions . . . . .</b>	<b>58</b>
<b>Bibliographie . . . . .</b>	<b>59</b>

*Dans le chapitre précédente nous avons décrit les bases théoriques qui nous permettent de comprendre les principales problèmes liés à la spectrométrie d'absorption en milieux diffusants. Dans ce chapitre nous verrons en détail quelles sont les dispositifs expérimentaux, les instruments, les matériels et les méthodes que nous avons utilisés. Un accent particulier aura mis sur la manière de préparation des fantômes optiques et la présentation du modèle animal et des protocoles expérimentaux utilisés pour les expériences in vivo.*

## **2.1 Dispositif expérimental**

### **2.1.1 Principes de base**

La figure 2.1 montre le schéma de principe du dispositif expérimental utilisé pour des études sur l'atténuation lumineuse en milieux diffusants modèles et aussi dans des études d'hémodynamique cérébrale in vivo.

Le rayonnement optique provenant d'une source de lumière blanche est injecté dans une fibre optique multimode (1). L'autre extrémité de la fibre optique est plongée dans le milieu d'intérêt (milieu modèle où tissu vivant). Une deuxième fibre multimode (2) qui constitue avec la fibre 1 la sonde optique a pour but de collecter la lumière retrodiffusée par le milieu et de la diriger vers un spectromètre à réseau équipé à une caméra CCD. Le spectromètre est contrôlé à l'aide d'un logiciel installé sur un ordinateur. Le logiciel enregistre les données correspondantes aux spectres d'absorption. Ultérieurement, après l'acquisition des données, à l'aide d'un autre

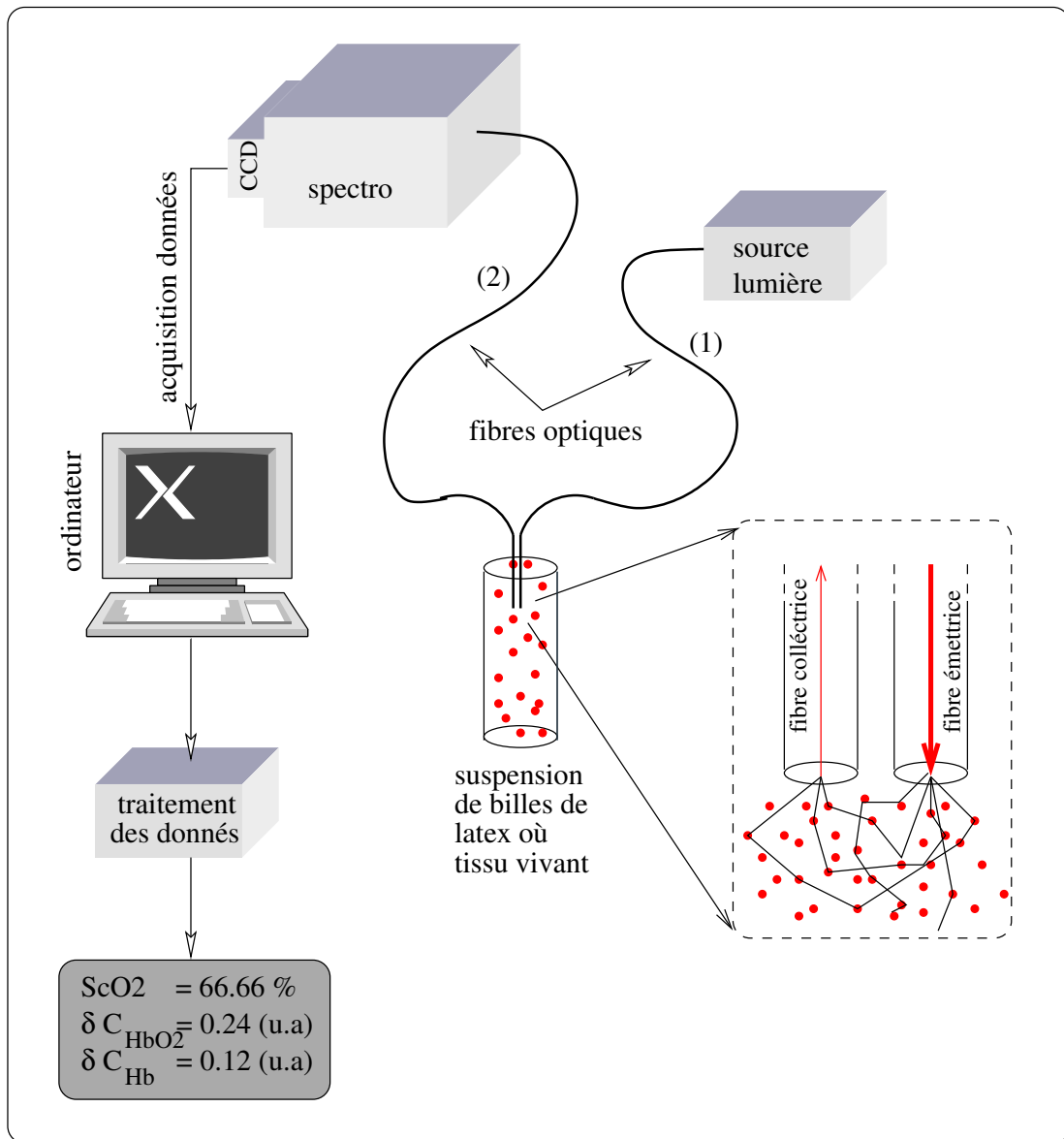


FIG. 2.1 – Le dispositif expérimental utilisé pour les études de spectrophotométrie en milieu trouble à l'aide de sondes optiques aiguilles

logiciel les concentrations des chromophores sont extraites. Détaillons à présent notre dispositif expérimental.

### 2.1.2 La source lumineuse

Le rayonnement optique est fourni par une source de lumière blanche à halogène produite par *Oriel* (modèle 77501). Le bloc de la source contient une ampoule de puissance 100 W et dimension du filament  $2.3 \times 4.2$  mm, son système électronique d'alimentation stabilisée ainsi qu'un système condenseur constitué d'une lentille asphérique et une lentille plan-convexe ayant comme but de faire injecter les faisceaux lumineux provenant de l'ampoule dans une fibre optique positionnée à la sortie du système.

L'arrangement optique du modèle de source stabilisée 77501 est présentée dans la figure 2.2. La puissance optique mesurée à la sortie d'une fibre optique de  $200 \mu\text{m}$  en diamètre et ouverture

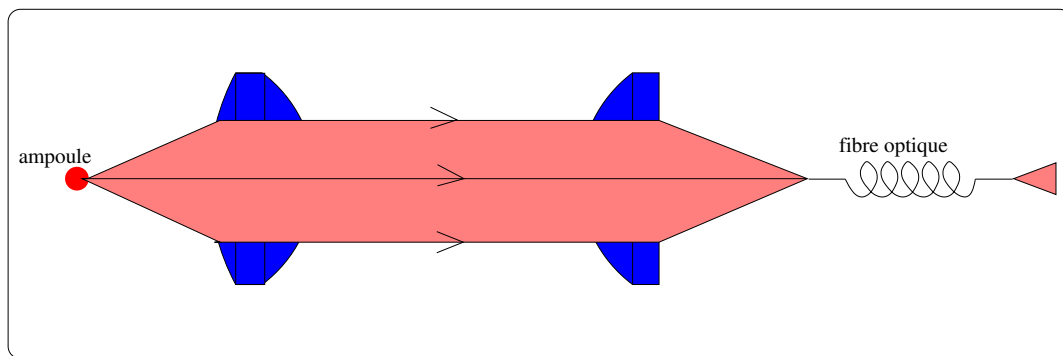


FIG. 2.2 – L'arrangement optique du modèle de source stabilisée *Oriel* 77501 : une lentille asphérique collecte la lumière provenant de la lampe. Une deuxième lentille, plan-convexe forme l'image du filament sur l'extrémité de la fibre optique émettrice.

numérique 0.37 couplée à cette source de lumière blanche est environ de 2 mW dans la bande spectrale 500-620 nm.

### 2.1.3 Les sondes optiques

Les fibres optiques utilisées pour la fabrication des sondes sont des fibres multimode, en verre. Leur coeur de diamètre 100 ou  $200 \mu\text{m}$  et ouverture numérique 0.37 est entouré d'un gain en plastique translucide. Les extrémités des fibres sont dénudées par l'élimination du gain sur une longueur environ de 1 cm et taillés. Ensuite, pour fabriquer une sonde optique les extrémités de deux fibres sont collées de sorte que la distance entre fibres est égale à leur diamètre. Ainsi on



obtient des sondes optiques aiguilles, de petite taille, à bonne résolution spatiale, adaptées à des explorations locales des milieux diffusants.

Un schéma d'une telle sonde est présentée dans la figure 2.3. Afin d'assurer un positionnement

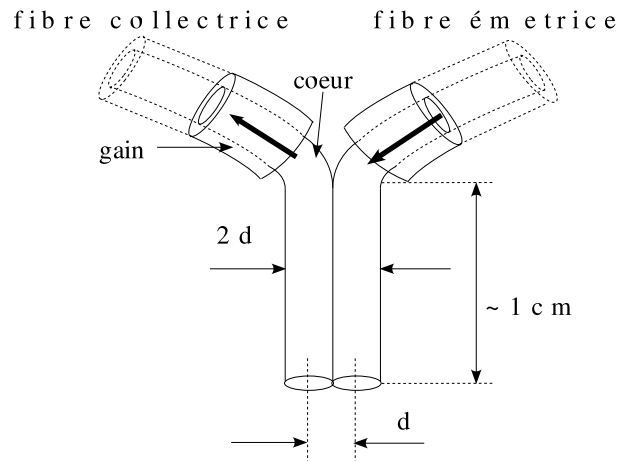


FIG. 2.3 – Sonde comprenant deux fibres optiques accolées.

précise des fibres devant les fentes d'entrée dans la source lumineuse et dans le spectromètre, l'extrémité des sondes optiques est fixée au moyen de supports aux fibres optiques. Le support présenté dans la figure 2.4 peut accommoder deux fibres optiques, de sorte que les deux soient éclairées à la fois quand sont positionnées devant la source lumineuse.

L'utilité des sondes optiques caractérisées par une petite distance entre les fibres émettrices et détectrices dans une géométrie en rétrodiffusion a été prouvée dans des expérimentations basées sur la mesure de la réflectance [16],[14],[15] et aussi sur la fluorescence des milieux diffusants [17],[1].

#### 2.1.4 L'estimation du volume exploré par le rayonnement optique

Dans les expérimentations de spectrophotométrie en milieu biologique la connaissance du volume sondé par la lumière est essentielle. De nombreuses études ont montré que la région du milieu exploré par les photons entre le point d'émission et le point de détection a la forme d'un fuseau ressemblant à une banane [7],[6]. Dans un régime de faible absorption et dans les conditions d'une expérimentation avec une seule source et un seul détecteur Feng et al [8] dérivent la fonction

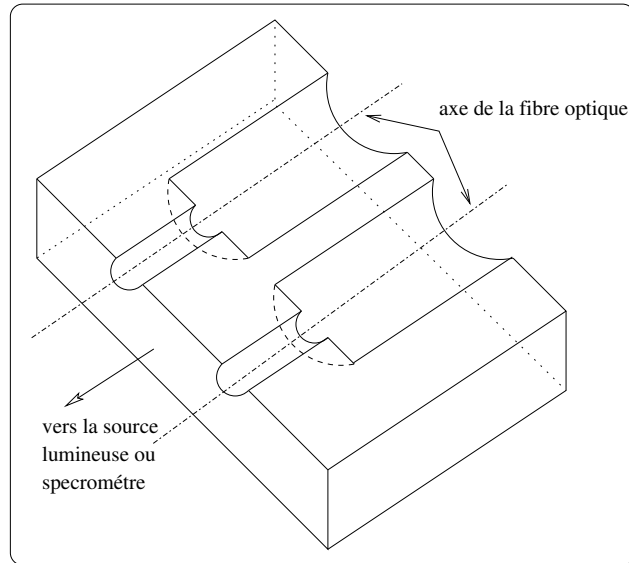


FIG. 2.4 – Le support utilisé pour la fixation des fibres optiques devant la source lumineuse. La distance entre les fibres doit être suffisamment petite de sorte que la puissance lumineuse injectée dans les fibres soit la même.

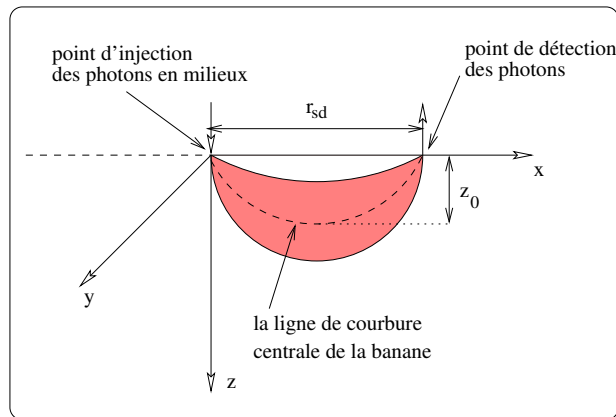


FIG. 2.5 – Les trajectoires des photons détectés se trouvent dans une forme géométrique qui ressemble à une banane.

de distribution spatiale des photons et trouvent que la ligne de courbure centrale de la banane située dans le plan  $y = 0$  dont les extrémités sont le point source et le point de détection peut s'approximer

par :

$$z_0(x) \simeq \left\{ \frac{1}{8} \left( \left( \left[ x^2 + (r_{sd} - x)^2 \right]^2 + 32x^2(r_{sd} - x)^2 \right) \right)^{1/2} - x^2 - (r_{sd} - x)^2 \right\}^{1/2} \quad (2.1)$$

La valeur maximale de  $z_0$  qui est atteinte pour  $x = r_{sd}/2$  nous donnera une estimation de la profondeur de pénétration des photons dans le milieu :

$$z_0^{max} \simeq \frac{r_{sd}}{\sqrt{8}} \quad (2.2)$$

#### *Exemple de calcul du volume exploré par les photons*

Supposons qu'on est dans une géométrie expérimentale à fibres optiques aiguilles dans laquelle la distance entre la fibre émettrice et la fibre détectrice est égale au diamètre des fibres optiques constituant la sonde et que l'équation 2.2 est applicable. Dans un premier cas, où le diamètre des fibres optiques est  $100 \mu\text{m}$  on peut estimer que la profondeur maximale de pénétration des photons est de l'ordre à  $0.1 \text{ mm}$ , d'où un volume exploré par les photons d'environ  $0.002 \text{ mm}^3$ . Dans le cas des fibres de  $200 \mu\text{m}$  en diamètre, la profondeur maximale de pénétration qu'on peut estimer est d'environ  $0.3 \text{ mm}$ , et donc un volume exploré par les photons détectés d'environ  $0.025 \text{ mm}^3$ .

Cependant, la relation 2.2 est valable dans un régime de validité de l'équation de diffusion et les calculs présentés auparavant ne sont pas donc valables dans une géométrie à fibres optiques aiguilles. Dans une telle situation, des simulations numériques de Monte Carlo nous ont permis à montrer que les volumes explorés par les photons sont plus grands. Ainsi, pour un milieu non absorbant, caractérisé par une longueur effective des trajectoires des photons  $l^* = 1.2 \text{ mm}$  nous avons trouvé que les photons vont explorer un domaine spatial environ de  $0.18 \text{ mm}^3$  lorsque on utilise la sonde composée de fibres optiques de  $100 \mu\text{m}$  en diamètre et  $1.12 \text{ mm}^3$  lorsque les sondes sont fabriquées de fibres optiques de  $200 \mu\text{m}$  en diamètre.

### **2.1.5 Les spectromètres**

#### **Le spectromètre Princeton Instrument 320PI**

##### *Montage optique*

Le spectromètre *Princeton Instrument 320PI* est un spectromètre à réseau équipé à une caméra CCD (*Princeton Instrument, EEV 226x1024*) d'haute sensibilité, refroidie par effet Peltier. Sa configuration optique de type Czerny-Turner est présentée dans la figure 2.6.

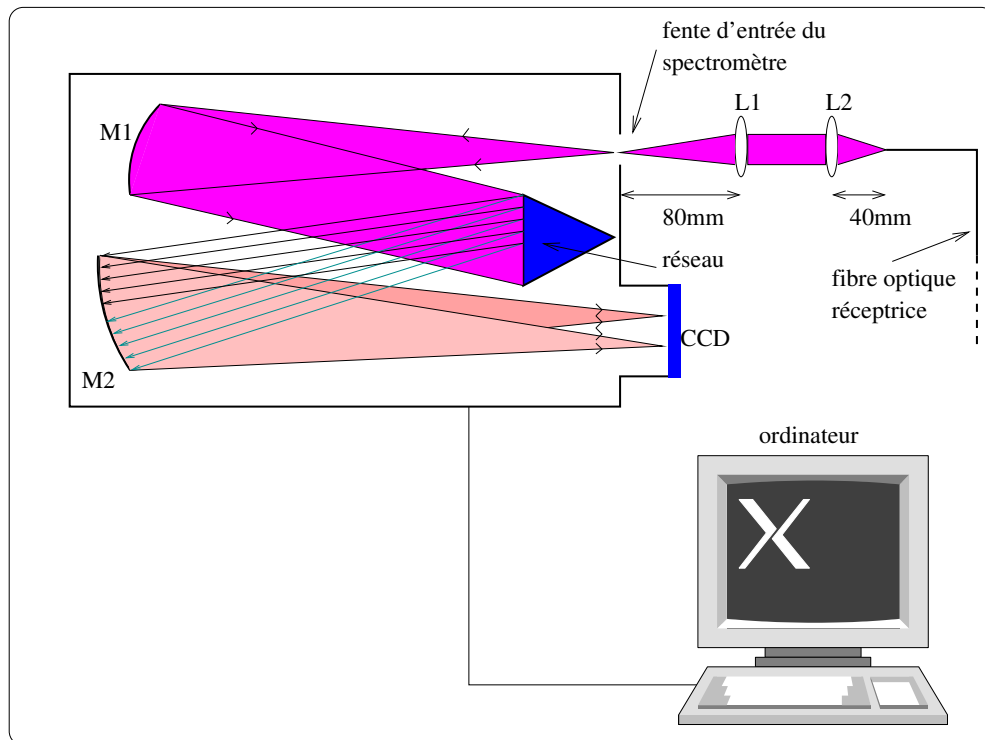


FIG. 2.6 – Le schéma optique du spectromètre *Princeton Instrument 320PI*.

Un ensemble de deux lentilles achromatiques de distance focale respectivement de 40 et 80 mm forment l'image d'un objet situé dans le plan focal de la lentille  $L_2$  dans le plan de la fente d'entrée du spectromètre et permettent d'adapter l'ouverture numérique du faisceau issu de la fibre optique à celle du spectromètre. Puis, le spectromètre, grâce aux miroirs toriques  $M_1$  et  $M_2$  et d'un réseau de diffraction crée l'image de la fente sur le CCD. L'utilisation d'une caméra CCD bidimensionnelle (1024x256 pixels) offre la possibilité de définir une région d'intérêt (R.O.I.) représentant l'image spectroscopique de la fibre optique dans laquelle est moyenné le signal provenant d'un certain nombre de pixels en hauteur et en longueur d'onde. Ainsi il est possible d'une part d'enregistrer simultanément plusieurs spectres et d'autre part d'améliorer le rapport signal/bruit.

#### *Résolution et pilotage*

La résolution spectrale du spectromètre *Princeton Instrument 320PI* est environ de 2-3 nm pour le réseau de diffraction qui nous offre la possibilité d'enregistrer spectres dans le domaine spectral 500-620 nm. Sa résolution temporelle est donnée par le temps de transfert des charges

électriques accumulées au niveau des pixels, le temps de conversion du signal analogique en signal numérique et le temps d'exposition. Le choix du temps d'exposition se fait de sorte que le maximum de signal reçu par un pixel de la caméra CCD soit environ de 30000 coups. Ainsi nous avons estimé un temps d'exposition environ de 300ms, d'où une valeur estimée de la résolution temporelle du spectromètre *Princeton Instrument 320PI* de l'ordre à 1-2 Hz.

Le spectromètre et la caméra CCD sont pilotés à l'aide du programme *WinSpec* via un contrôleur. Afin d'afficher la courbe d'intensité spectrale ( $I=I(\lambda)$ ) le spectromètre est calibré en préalable à l'aide d'une lampe spectrale à néon.

### Le spectromètre Avantes USB2000

#### Montage optique

Le schéma du spectromètre *Avantes USB2000* est présenté dans la figure 2.7. La lumière retro-

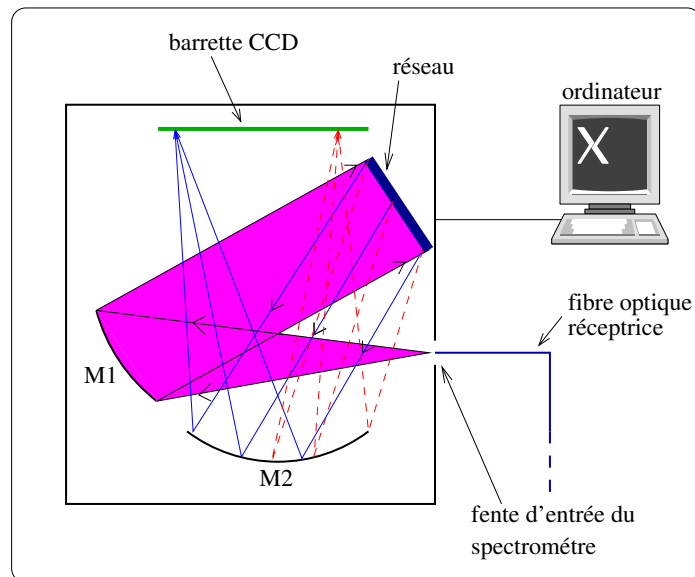


FIG. 2.7 – Le schéma optique du spectromètre *Avantes USB2000*.

diffusée par le milieu d'étude injectée dans le spectromètre est collimatée par le miroir sphérique  $M_1$  qui renvoie un faisceau de rayons parallèles vers le réseau de diffraction. La lumière diffractée par ce réseau est ensuite focalisée par le deuxième miroir sphérique  $M_2$  sur une caméra CCD linéaire (2048 pixels).

### *Pilotage et résolution*

Après le transfert des charges électriques, le signal analogique est converti en signal numérique et transmis à l'ordinateur via le port USB et le traitement des données est fait à l'aide du logiciel *OOIBASE32* qui connaissant la courbe d'étalonnage du spectromètre affiche la dépendance entre l'intensité lumineuse et la longueur d'onde. La gamme spectrale de fonctionnement du spectromètre donnée par la position spatiale et la dimension de la barrette CCD est 365-910 nm. Sa résolution spectrale est limitée par la largeur de la fente d'entrée. Ainsi, pour une fente de 100  $\mu\text{m}$  on peut s'évaluer une résolution spatiale environ de 10 nm.

### **Le choix du spectromètre**

Le choix du spectromètre se fait suivant les particularités des expérimentations. Le spectromètre Avantes a l'avantage de la portabilité de l'instrumentation à cause de sa petite dimension. Il exige seulement un ordinateur possédant un port USB, tandis que le spectromètre Princeton utilise un contrôleur pour le pilotage du système et l'enregistrement des données. D'autre part, le spectromètre Princeton offre la possibilité d'enregistrer simultanément plusieurs spectres, possède une plus grande dynamique, un bruit plus faible et a l'avantage de l'automatisation des enregistrements.

#### **2.1.6 Traitement des données**

Le logiciel de pilotage *WinSpec* enregistre les spectres dans un format spécifique (SPE), ainsi que afin de traiter numériquement les données il faut les convertir en format ASCII. La conversion des données ainsi que le traitement numérique est fait à l'aide du logiciel *FITOFINVIVO* que nous avons réalisé. Le logiciel, (créé en Visual Basic) effectue en gros l'ajustement numérique des courbes expérimentales pour calculer les concentrations des absorbants par l'utilisation d'un algorithme de décomposition en valeurs singulières [18]. Le logiciel est capable de réaliser le calcul des concentrations pour un maximum de cinq espèces absorbantes, en réalisant un ajustement

numérique des fonctions de la forme :

$$\mathbf{y}(\lambda) = \sum_{i=1}^5 \xi_i(\lambda) \cdot c_i \quad (2.3)$$

où  $\xi_i$  est un vecteur qui contient le produit du coefficient d'extinction et la longueur moyenne des trajectoires des photons pour les longueurs d'onde correspondants,  $c_i$  sont les concentrations à déterminer tandis que  $\mathbf{y}$  est un vecteur qui contient les valeurs des rapports de spectres d'intensité mesurées. Des détails sur des aspects mathématiques et de programmation utilisées pour la réalisation du logiciel FITOFINVIVO sont présentées dans les annexes.

## 2.2 La préparation des fantômes optiques

*Dans cette section nous présentons la manière de réalisation des milieux artificiels (fantômes optiques) dans lesquels la propagation de la lumière se fait de manière similaire à la propagation en milieu biologique.*

Cette similarité a lieu lorsque les coefficients optiques caractérisant le fantôme optique (les coefficients de diffusion et d'absorption et le facteur d'anisotropie) sont identiques aux coefficients optiques caractérisant le tissu vivant. Ainsi, suivant la gamme spectrale nous devons préparer des milieux caractérisés par  $\mu_a \in (0.5, 5) \text{ cm}^{-1}$ ,  $\mu_s \in (0.2, 400) \text{ cm}^{-1}$  et  $g \in (0.8, 0.99)$  [3] dans le domaine visible et proche infrarouge.

En fonction du but des expériences les fantômes optiques se présentent soit sous forme solide soit sous forme liquide. Les fantômes solides sont en général utilisés pour modéliser des tissus complexes où il faut tenir compte de leur structure géométrique réelle. Parce que notre attention sera focalisée sur des zones de dimension relativement petite du cerveau sans une structure géométrique spéciale nous nous intéressons de la préparation d'une fantôme liquide.

L'approche direct pour modeler les propriétés optiques des tissus est de reproduire les propriétés de diffusion et d'absorption indépendamment, en mélangeant des proportions relevantes de milieu purement diffusant, non absorbant dans la région spectrale d'intérêt et de milieu purement absorbant. La compartimentation de l'absorbance se fait en ajoutant dans le milieu diffusant de pe-

tits cylindres absorbants. Nous détaillons la manière de fabrication d'un fantôme optique constitué d'une suspension de microbilles de polystyrène dans l'eau.

### 2.2.1 Le calcul des propriétés de diffusion et du facteur d'anisotropie d'un milieu modèle

Les milieux diffusants les plus utilisés pour la réalisation des fantômes optiques sont les émulsions intralipides et les suspensions de sphères de polystyrène. Les intralipides sont en fait des gouttes de graisse dispersées dans l'eau. Bien que telles suspensions sont utilisées largement, la réalisation d'une suspension avec les paramètres désirés est très difficile à cause des difficultés liées à la caractérisation des dimensions des gouttes. Les suspensions de billes de latex sont meilleures dans le sens qu'elles peuvent être obtenues avec une faible dispersion de la taille et que plusieurs tailles sont disponibles<sup>1</sup>. En plus, des études expérimentales ont prouvées leur stabilité en termes de propriétés physiques et optiques [9],[10]. L'indice de réfraction de billes de polystyrène vaut à 1.55-1.59 [12],[22].

Pour prévoir les propriétés de diffusion d'un tel milieu diffusant constitué d'une suspension de petites particules on peut utiliser des calculs basés sur la théorie de Mie. Conformément à cette théorie, dans le cas où les particules diffusants sont des sphères, le coefficient de diffusion et le facteur d'anisotropie  $g$  du milieu peuvent être calculés à l'aide des formules [2] :

$$\left\{ \begin{array}{l} \mu_s = n_s \times \frac{\lambda^2}{2\pi n_{objet}^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1)(|a_n|^2 + |b_n|^2) \\ g = \frac{\lambda^2 n_s}{2\pi n_{objet}^2 \mu_s} \left[ \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \Re e(a_n b_n^*) + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{n(n+1)} \Re e(a_n a_{n+1}^* + b_n b_{n+1}^*) \right] \\ a_n = \frac{\psi_n(\alpha)\psi'_n(m\alpha) - m\psi_n(m\alpha)\psi'_n(\alpha)}{\xi_n(\alpha)\psi'_n(m\alpha) - m\psi_n(m\alpha)\xi'_n(\alpha)}, \quad b_n = \frac{m\psi'_n(m\alpha)\psi_n(\alpha) - \psi_n(m\alpha)\psi'_n(\alpha)}{m\psi'_n(m\alpha)\xi_n(\alpha) - \psi_n(m\alpha)\xi'_n(\alpha)} \\ m = \frac{n_{milieu}}{n_{objet}}, \quad x = \frac{2\pi a n_{objet}}{\lambda} \end{array} \right. \quad (2.4)$$

<sup>1</sup>Néanmoins il faut noter que l'utilisation des microsphères de latex de même diamètre ne fournit pas toujours la fonction de phase qu'on veut, les suspensions avec une distribution correctement choisie des diamètres semblant de fournir une meilleure fonction de phase [11].



où  $a$  est le rayon de la particule sphérique,  $\lambda$  la longueur d'onde dans le vide,  $\psi_n, \psi'_n, \xi_n, \xi'_n$  fonctions Ricatti-Bessel d'ordre 1 or 2,  $n_{objet}$  l'indice de l'objet,  $n_{milieu}$  l'indice du milieu dans lequel se trouve le diffuseur et  $n_s$  la densité volumique des sphères diffusantes. Dans nos manipulations

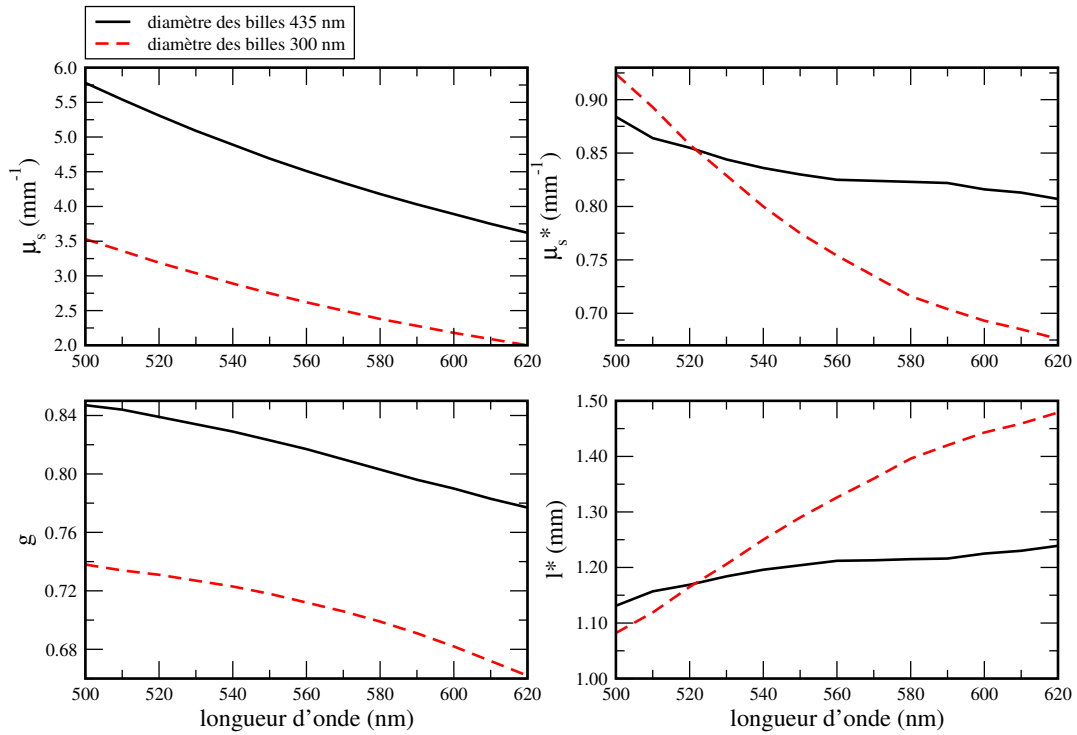


FIG. 2.8 – Les propriétés de diffusion de deux suspensions de billes de latex, l'une préparée avec de billes de 435 nm et l'autre avec de billes de 300 nm en diamètre trouvées par un calcul de Mie. Les densités des particules dans les deux cas sont 0.05765 et respectivement 0.16977 particules/ $\mu\text{m}^3$ .

nous utilisons de billes de polystyrène de 435 ou de 300 nm en diamètre dispersées de manière homogène dans l'eau. En faisant varier la fraction volumique occupée par les billes on fabrique des suspensions avec les propriétés de diffusion désirées. Dans les graphiques présentées sur la figure 2.8, les dépendances de  $\mu_s, \mu_s^*, g$  et  $l^*$  avec la longueur d'onde sont trouvées par un calcul de Mie, en adaptant le code de calcul de Bohren et al [2]. Les suspensions sont préparées de sorte que la fraction volumique occupée par les microsphères soit 0.24%.

### 2.2.2 L'absorption du milieu modèle

La modélisation de l'absorption se fait par la coloration du milieu diffusant avec un colorant ayant son spectre d'absorption dans le domaine spectral d'intérêt. Nous utilisons comme colorant le Bleu d'Evans qui est une poudre très soluble dans l'eau et qui a son spectre d'absorption dans le domaine visible, avec a pic d'absorption à 611 nm (voir la figure 2.9). Ce colorant a été utilisé

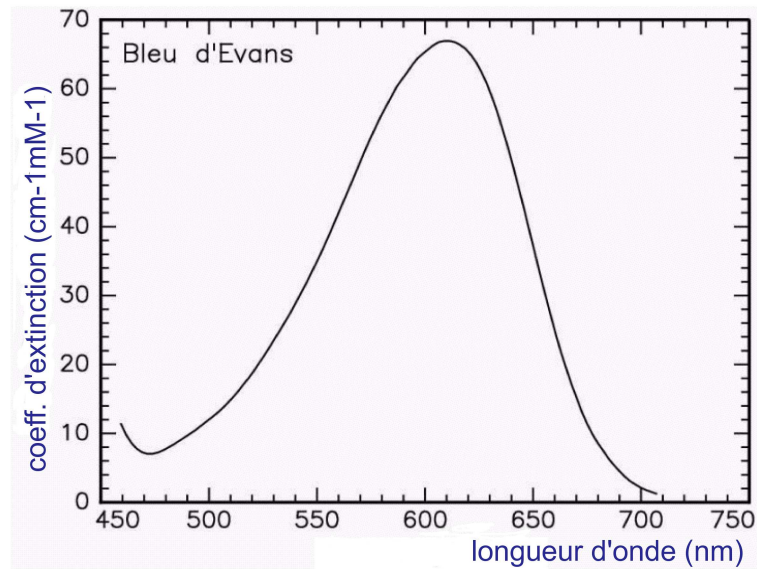


FIG. 2.9 – Le coefficient d'extinction spécifique du Bleu d'Evans trouvé par une expérience de spectroscopie conventionnelle en milieux limpides..

pour plus de 80 ans dans des applications médicales comme traceur en vue de la détermination du volume sanguin.

### 2.2.3 La préparation des fantômes optiques d'absorbance localisée

Pour modéliser l'absorbance dans un milieu modèle où les chromophores sont localisés il faut utiliser un matériel ayant des dimensions et des propriétés optiques comparables aux vaisseaux sanguins. D'une part il est possible d'utiliser des tubes transparentes minces dans lesquels on introduit du sang ou un colorant (habituellement d'encre) et d'autre part on peut utiliser des fils d'absorbance comparable à celle du sang. L'utilisation des tubes présente le désavantage d'une fabrication difficile et d'une durée de vie courte des milieux modèles ainsi réalisés. D'autre part, le

désavantage des fils absorbants est leur incapacité de reproduire de manière précise le coefficient d'absorption du sang dans le domaine spectral d'intérêt. Nous avons réalisé les milieux d'absorbance localisée en ajoutant dans la suspension diffusante un fil de polyamide coloré de diamètre  $100\ \mu\text{m}$ , coupé dans des petits morceaux d'environ 1 mm en longueur. Pour assurer une distribution spatiale homogène des cylindres absorbants l'ensemble est mélangé de manière continue à l'aide d'un agitateur magnétique.

### L'absorption du fil de polyamide

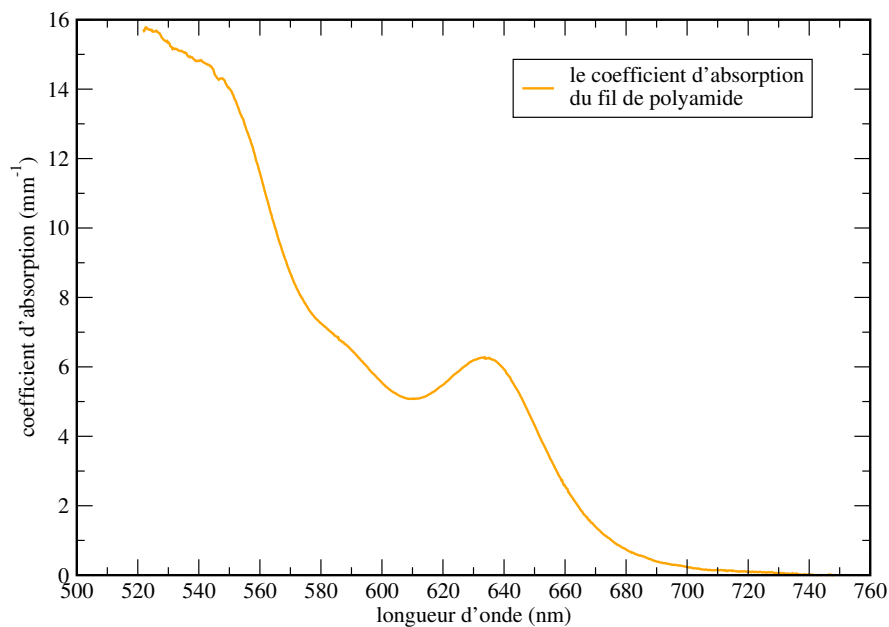


FIG. 2.10 – Le coefficient d'absorption du fil de polyamide trouvé par l'éclairage du fil fondue entre deux plaques distantes de 0.1 mm, chauffées à  $210^{\circ}$ .

Les valeurs du coefficient d'absorption du fil de polyamide dans le domaine spectral 520-760 nm sont présentées dans la figure 2.10. Pour les évaluer, plusieurs méthodes ont été utilisées. La première technique a consisté dans l'éclairage du fil directement à l'aide d'une fibre optique de  $100\ \mu\text{m}$  en diamètre avec un faisceau de lumière blanche et l'analyse de la fraction correspondante aux rayons n'ayant pas subi des changements de direction notables du à la dispersion par effet de lentille. Une deuxième méthode a été d'éclairer le fil fondu entre deux plaques distantes de 0.1 mm, chauffées à  $210^{\circ}\text{C}$ . Le spectre de la figure 2.10 est trouvé utilisant la dernière méthode. Il est

en fait identique à celui trouvé par la première technique.

### Les propriétés de diffusion du fil de polyamide

Les cylindres absorbants ont des coefficients de diffusion différents de zéro, ainsi que le coefficient de diffusion et le facteur d'anisotropie du fantôme doivent se calculer à partir des relations :

$$\mu_s(\lambda) = \mu_s^{spheres}(\lambda) + \mu_s^{cylindres}(\lambda) \quad (2.5)$$

et respectivement :

$$g(\lambda) = \int_{4\pi} p(\theta, \lambda) \cos \theta d\Omega \quad (2.6)$$

où la nouvelle fonction de phase caractérisant le fantôme est [11] :

$$p(\theta, \lambda) = \frac{p^{spheres}(\theta, \lambda)\mu_s^{spheres} + p^{cylindres}(\theta, \lambda)\mu_s^{cylindres}}{\mu_s^{spheres}(\lambda) + \mu_s^{cylindres}(\lambda)} \quad (2.7)$$

Dans ces relations les coefficients de diffusion et les fonctions de phase caractérisant la suspension de billes de latex sans cylindres absorbants ( $\mu_s^{spheres}(\lambda)$  et  $p^{spheres}(\theta, \lambda)$ ) et la suspension de cylindres dans l'eau ( $\mu_s^{cylindres}(\lambda)$  et  $p^{cylindres}(\theta, \lambda)$ ) se trouvent par un calcul de Mie<sup>2</sup>. Parce que  $\mu_s^{cylindres}(\lambda) \neq 0$  quand  $\mu_a^{cylindres} = 0$  il est difficile de fabriquer un fantôme complètement non absorbant caractérisé par un coefficient de diffusion donné par la relation 2.5. C'est pour cela que pour faire des études faisables sur l'atténuation lumineuse en milieux d'absorbance localisée il faut choisir les cylindres absorbants de sorte que les valeurs de  $\mu_s^{cylindres}(\lambda)$  soient petites devant  $\mu_s^{spheres}(\lambda)$ . Les valeurs du coefficient de diffusion de la suspension de fils de polyamide dans l'eau trouvés par un calcul de Mie pour trois fractions volumiques occupées par les cylindres dans le milieu (0.0255, 0.0497 et 0.0947) en fonction de la longueur d'onde sont présentées dans la figure 2.11 page suivante.

Il est donc bien claire que la contribution de la diffusion de la lumière sur les cylindres absorbants à l'intensité recueillie peut être importante. C'est pour cela que pour tirer des conclusions pertinentes

<sup>2</sup>Ceci en supposant que la lumière arrive perpendiculairement à l'axe du cylindre. Si on moyenne sur les angles d'incidences vraisemblable que les oscillations du coefficient de diffusion visible sur la figure 2.11 vont disparaître.

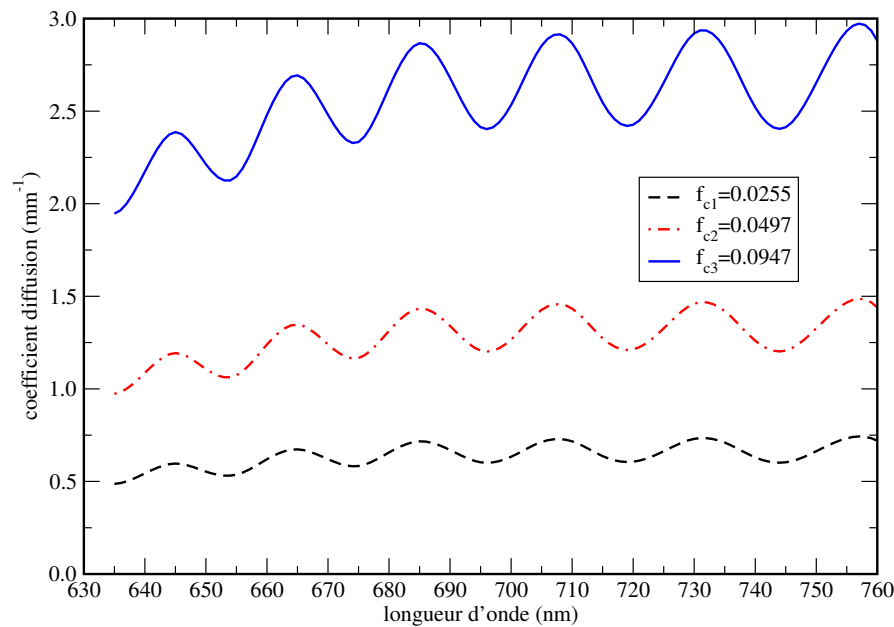


FIG. 2.11 – Les valeurs du coefficient de diffusion de la suspension de fils de polyamide dans l'eau trouvés par un calcul de Mie pour trois fractions volumiques occupées par les cylindres dans le milieu (0.0255, 0.0497 et 0.0947) en fonction de la longueur d'onde.

sur l'effet de la localisation de l'absorbance sur l'estimation des concentrations des chromophores il faut toujours compléter les résultats expérimentaux avec de simulations numériques de Monte Carlo.

#### 2.2.4 La préparation des fantômes optiques contenant du sang

Afin de mieux modéliser les propriétés d'absorption d'un fantôme optique et aussi pour une meilleure compréhension et interprétation des résultats expérimentaux *in vivo*, une bonne connaissance des propriétés optiques du sang est essentielle. Dans ce but nous avons tenté de réaliser des fantômes constitués de sang de rat mélangé à une suspension diffusante de billes de polystyrène. Malheureusement, la réalisation des échantillons contenant du sang s'est avérée très difficile.

Premièrement il faut tenir compte du fait que les propriétés optiques du sang sont influencées par un grand nombre de paramètres anatomiques, physiologiques et biochimiques [13],[5]. Ainsi, *les propriétés d'absorption du sang* sont déterminées par le niveau de la saturation en oxygène de l'hémoglobine mais aussi par les concentrations des globules rouges et les *propriétés de diffusion*

dépendent généralement du taux d'hématocrite et du taux d'hémolyse fixé par l'osmolarité.

Deuxièmement il faut aussi tenir compte d'autres phénomènes comme la sédimentation, l'agrégation, la coagulation ou la déformation des cellules [21],[20],[19],[23].

Dans une expérimentation où on utilise du sang il est très difficile de contrôler toutes ses propriétés. Par conséquent, les résultats rapportés dans la littérature sont parfois incohérents, moins concluants et n'arrivent pas à expliquer des différents aspects comme par exemple l'effet de l'hémolyse sur la valeur du coefficient d'absorption du sang [19], [23], [21].

Les expériences de spectrométrie à fibres aiguilles impliquent un contact direct entre la sonde et le milieu modèle. La variabilité des résultats de nos manipulations nous ont conduit à la conclusion que ce contact peut avoir comme résultat une perturbation des spectres enregistrés à cause de la tendance des hématies de se coller sur l'extrémités des fibres optiques. Bien sur on peut éviter ce contact par le positionnement de la sonde optique juste au-dessus de la surface de l'échantillon. Malheureusement les résultats sont encore incohérents, l'intensité du signal recueilli étant fortement déterminée par la distance sonde optique - surface échantillon, distance qui ne peut pas être bien contrôlable.

Ainsi, à cause de toutes ces complications les mesures portant sur la spectrométrie d'échantillons contenant du sang ne peuvent pas nous conduire à une meilleure caractérisation des propriétés d'absorption optique des hématies mais peuvent nous aider de mieux comprendre et interpréter des certaines résultats de mesures in vivo.

### **2.2.5 Milieux modèles à base de microsphères de latex : de la théorie à la pratique**

Bien que les possibilités théoriques de fabrication d'un milieu modèle avec les paramètres optiques désirés semblent d'être un but aisément à attendre, afin de faire de la spectrométrie en milieux diffusants à l'aides des sondes optiques aiguilles il faut bien connaître dans quelle mesure les différentes particularités expérimentales peuvent jouer un rôle important dans l'interprétation et la compréhension des résultats ainsi obtenus. Particulièrement nous nous intéressons d'effet de la taille géométrique du fantôme et des dimensions des diamètres des fibres optiques constituant les sondes sur les mesures et de la stabilité des propriétés optiques des fantômes.

### L'effet de la taille géométrique du milieu modèle

Nos milieux modèles étaient compris dans des tubes cylindriques transparents d'environ 10 mm en diamètre et 50 mm en hauteur. Comme ces flacons sont assez petits il est possible que fonction des coefficients d'absorption et de diffusion les photons puissent arriver au niveau de la surface de séparation fantôme optique - flacon et soient perdus. Dans la figure 2.12 nous présentons la dépendance de l'intensité lumineuse recueillie par les fibres optiques de 100 et 200  $\mu\text{m}$  en diamètre, dans les conditions où la dimension spatiale du fantôme était respectivement  $10 \times 50$  mm (diamètre  $\times$  hauteur) et  $30 \times 100$ .

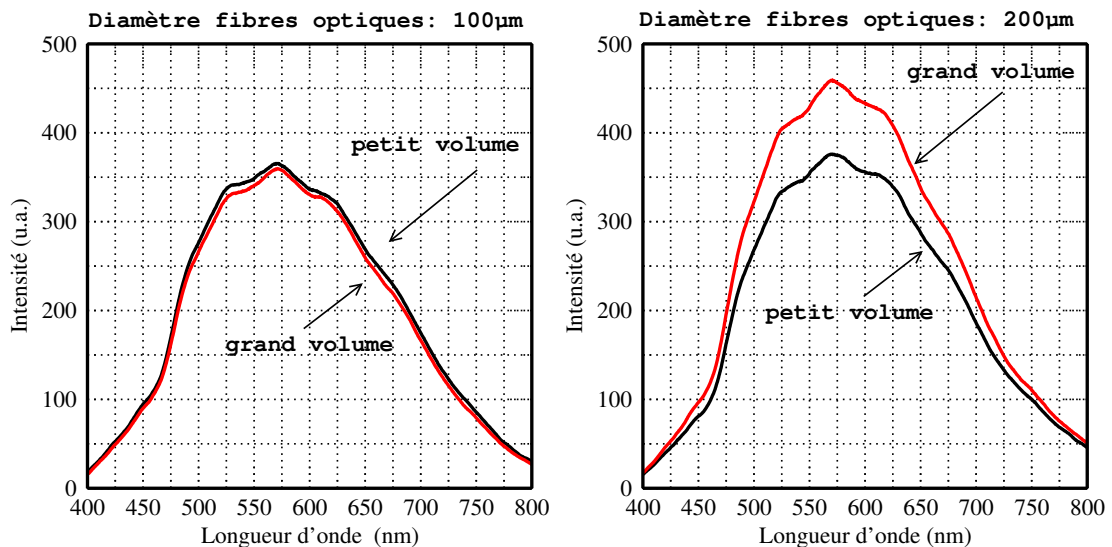


FIG. 2.12 – La dépendance de l'intensité lumineuse (unité arbitraires) avec la longueur d'onde pour les cas où les sondes optiques sont constituées des fibres optiques collées plongées dans des volumes différents de suspensions purement diffusantes. Les suspensions sont de microsphères de latex de 300 nm en diamètre de concentration 0.24% dans l'eau.

Dans le cas des fibres de 100  $\mu\text{m}$  en diamètre parce que les photons détectés ayant parcouru un chemin plus court, la taille géométrique du fantôme optique ne joue pas un rôle essentiel sur la forme ou l'amplitude du signal recueilli. Dans l'autre cas la situation n'est pas la même : il y a un décalage aussi au niveau de l'intensité recueillie mais aussi au niveau de la forme du spectre. En fait, des simulations numériques de Monte Carlo montrent que dans une géométrie infinie, la longueur moyenne du trajet des photons entre la fibre émettrice et réceptrice est de l'ordre à 10 mm pour les sondes constituées des fibres de 200  $\mu\text{m}$  en diamètre et environ de 5 mm pour les

fibres de 100  $\mu\text{m}$  en diamètre.

C'est pour cela que nous suggérons que dans les expériences de spectrométrie de large bande en conditions de faible absorbance, il faut faire attention à la taille géométrique du fantôme et afin d'éviter ses effets c'est mieux de choisir des domaines spectrales moins larges et les plus grandes dimensions possibles des échantillons<sup>3</sup>. Dans le domaine spectral qui nous intéresse (500-620 nm) la taille géométrique d'échantillon semble de ne pas distordre la forme des spectres.

### **L'effet de la dimension des fibres optiques**

Dans la figure 2.13 page suivante nous présentons la dépendance de l'atténuation du rayonnement optique définie conformément à la relation 1.6 avec la longueur d'onde mesurée à l'aide des sondes optiques constituées de fibres de 100 et 200  $\mu\text{m}$  en diamètre. Les distances entre les fibres optiques constituant les sondes sont respectivement de 100 et 200  $\mu\text{m}$ .  $I_0(\lambda)$  correspond à l'intensité lumineuse retrodiffusée par une suspension de microsphères de latex dans l'eau (300 nm en diamètre et concentration 0.24%) tandis que  $I(\lambda)$  correspond à l'intensité retrodiffusée par la même suspension dans laquelle on disperse de manière uniforme Bleu d'Evans (concentration du colorant 0.1 g/l).

Comme nous pouvons constater les différences entre les atténuations du rayonnement optique obtenues avec les deux types de sondes ne diffèrent pas trop, l'écart entre les deux courbes étant approximativement constant sur toute la plage de longueurs d'onde. Cet écart peut s'expliquer par le fait que le fantôme dans lequel les expériences ont été réalisés est de petit volume. Par suite, nous pouvons conclure que l'effet de l'utilisation des sondes à fibres optiques de 100  $\mu\text{m}$  or 200  $\mu\text{m}$  va être seulement au niveau de l'intensité lumineuse recueillie (il n'y a pas de déformation de spectres enregistrés due au diamètre des fibres optiques). Cette variation d'intensité pourrait aussi être attribuable aux fluctuations de l'intensité de la source lumineuse.

---

<sup>3</sup>Par exemple, l'utilisation des milieux de grande dimension dans les cas où l'espèce absorbante est le sang met des problèmes liés à une oxygénation uniforme de l'hémoglobine or de sédimentation.



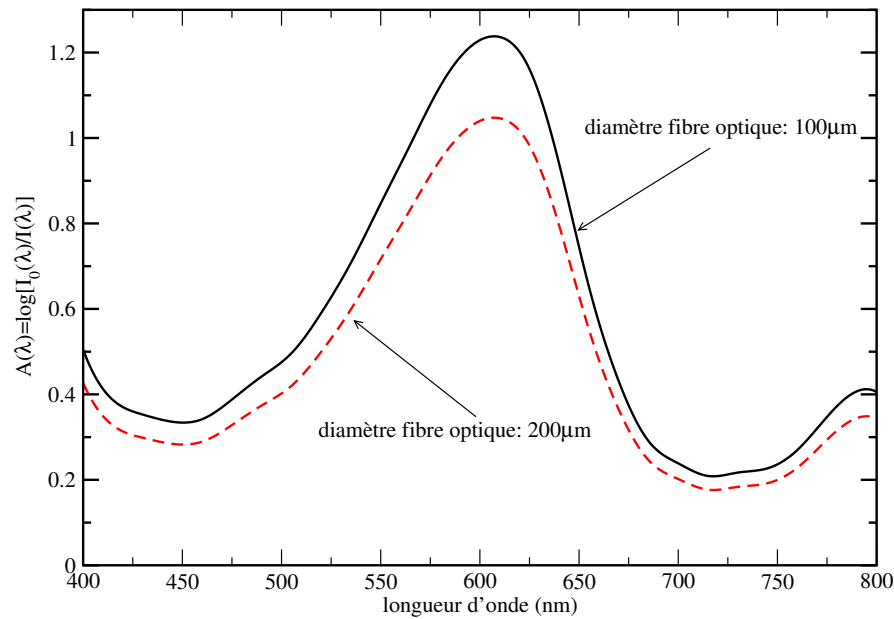


FIG. 2.13 – La dépendance de l'atténuation lumineuse avec la longueur d'onde pour les cas des sondes optiques constituées de fibres optiques collées, de diamètres 100 et 200  $\mu\text{m}$ .

### La stabilité des propriétés optiques des milieux modèles

Le désavantage des fantômes optiques à base de billes de latex réside dans leur très probable agrégation qui peut avoir lieu au cours du temps. Suite aux agrégations des centres diffusants de large dimension sont créés, d'où une modification des propriétés de diffusion du milieu. De plus, nous avons constaté que les agrégations sont favorisées de manières différentes suivant que les suspensions de billes de latex sont faites dans l'eau ou dans du sérum physiologique. Finalement, il semble que le Bleu d'Evans lui-même peut induire des effets d'agrégation (ou désagrégation) des microsphères de polystyrène.

## **2.3 Techniques et protocoles biologiques utilisés dans les études d'hémodynamique cérébrale**

### **2.3.1 Le modèle animal, le protocole et le dispositif expérimental**

Dans nos études nous avons utilisé un modèle de rat anesthésié, ventilé mécaniquement et soumis aux différents niveaux successifs d'hypoxémie. Ce modèle d'animal existant au sein du laboratoire de *RMN Bioclinique* de Grenoble, a été réalisé sur de rats (femelles de race Wistar) anesthésiés à l'halothane, ventilés mécaniquement. L'anesthésie est maintenue tout au long de l'expérimentation à l'aide d'un bolus intrapéritonéal de thiopental. La température de l'animal mesurée continuellement à l'aide d'une sonde rectale est maintenue constante à 37-38°C à l'aide d'une couverture chauffante placée sous l'abdomen.

Généralement la durée d'une expérimentation est de quelques heures. La première heure est affectée pour la chirurgie et la calibration des appareils, puis la manipulation (environ 2 heures). Finalement, les rats sont euthanasiés par injection d'une surdose de thiopental. Le dispositif expérimental utilisé pour les études d'hémodynamique cérébrale, in vivo, chez le rat est présenté dans la figure 2.14.

#### **La ventilation**

Les animaux sont ventilés mécaniquement avec un mélange gazeux d'oxygène et de protoxyde d'azote. La fréquence ventilatoire est ajustée de sorte que la pression partielle artérielle en dioxyde de carbone (la  $PaCO_2$ ) reste constante à environ 35 mmHg [4]. Afin de diminuer les mouvements de la tête de l'animal dus à la ventilation il a fallu que les éléments de trachéotomie soit fixés avec la table d'expérience.

#### **La chirurgie**

Les rats subissent plusieurs interventions chirurgicales. Premièrement la trachéotomie en vue de contrôler artificiellement la ventilation. Deuxièmement, la mesure des différentes paramètres physiologiques exige des chirurgies ayant comme but l'insertion de deux cathéters :

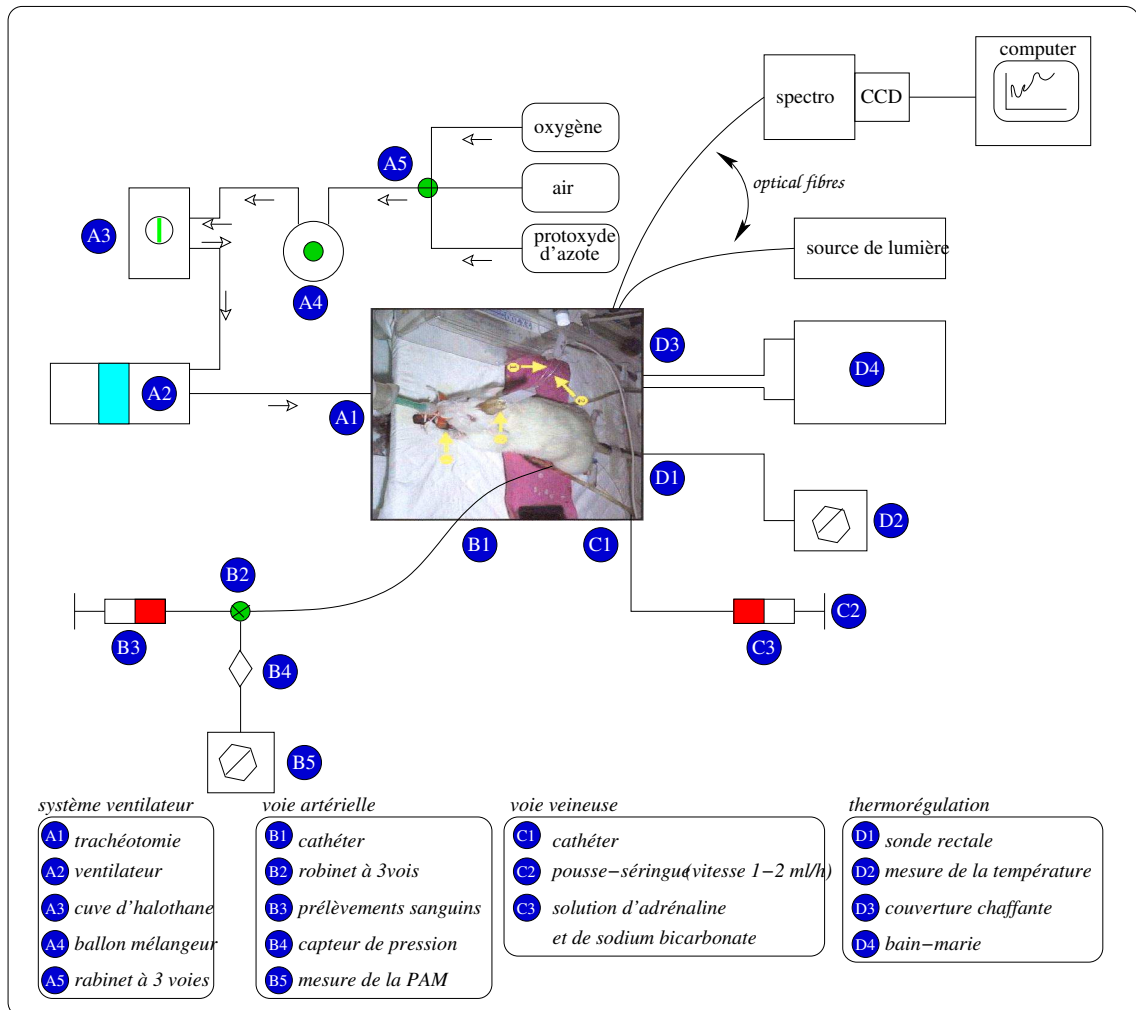


FIG. 2.14 – Le dispositif expérimental utilisé pour des études d'hémodynamique cérébrale, in vivo, chez le rat. Dans toutes les expérimentations in vivo le rat est placé sur l'abdomen.

- ✗ un cathéter inséré dans l'artère fémorale gauche pour la mesure continue de la pression artérielle moyenne (PAM) et pour le prélèvement du sang artériel (0.1 ml pour chaque prélèvement) nécessaire pour l'analyse du gaz du sang ( $PaO_2$ ,  $PaCO_2$ ,  $SaO_2$ ,  $pH$  artériel ( $pHa$ ),  $SvO_2$  etc). Un nombre de maximum 10 prélèvements ont été fixés pour éviter la diminution du taux d'hémoglobine (l'anémie).
- ✗ un cathéter inséré dans la veine fémorale gauche pour l'injection d'adrénaline ( $1.5\mu\text{m/ml}$ ), du bicarbonate du sodium ( $0.025\text{ mmol/ml}$ ) à une vitesse de 1-2 ml/h tout au long de l'expérimentation et des bolus optiques.

Troisièmement, lors des expériences d'ischémie les rats subissent un accident vasculaire cérébral. Ceci est provoqué par l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne.

### **L'implantation des sondes optiques**

Le positionnement de la sonde optique dans la zone cérébrale à explorer se fait par l'intermédiaire des *canules de microdialyse* de type *CMA* produites par *PhyMed*. Ces canules, de diamètre intérieure 0.8 mm et externe de 1 mm sont introduites dans le cerveau par des trous faits dans l'os crânien à l'aide d'un foret à une profondeur dépendant de la zone d'intérêt qu'on veut étudiée (cortex ou striatum). Pour une bonne fixation, les canules sont enrobées avec du ciment dentaire.

Les sondes optiques sont insérées dans les canules de microdialyse ainsi que leur extrémités soient à environ 1 mm sous la canule. Un adhésif est utilisé pour fixer la sonde dans la canule.

### **Le protocole expérimental**

Généralement, le protocole expérimental est constitué de six paliers d'oxygénation, de 10-15 minutes chacun :

- ✗ un palier de départ de 35% de la fraction inspirée en oxygène (la  $FiO_2$ ) qui nous permet d'effectuer une période de contrôle avant de diminuer la  $FiO_2$ , et ayant comme but la stabilisation hémodynamique du rat et la saturation complète de l'hémoglobine.
- ✗ un deuxième palier de normoxie ( $FiO_2$  à 21%)
- ✗ un palier d'hypoxémie légère ( $FiO_2$  à 15%)
- ✗ un palier d'hypoxémie modérée ( $FiO_2$  à 12%)
- ✗ un palier d'hypoxémie sévère ( $FiO_2$  à 10%)
- ✗ la réoxygénation aux conditions d'hyperoxie ( $FiO_2$  à 35%)

### 2.3.2 Injection d'un produit de contraste

Dans un but exploratoire, quelques expériences de spectrophotométrie in vivo ont été réalisées chez le rat lors de l'injection de produits de contraste à intraveineuse.

En fait, l'utilisation des traceurs dans les études d'hémodynamique cérébrale est une technique bien connue. Par exemple en RMN s'utilise comme traceurs des produits paramagnétiques et en radiographie des traceurs absorbant les rayons X. Cette technique est basée sur l'injection d'un certain produit dans un volume tissulaire d'intérêt, dans une quantité qui peut être contrôlée. Dans notre cas l'injection du produit de contraste dans la circulation sanguine a comme effet une modification temporaire des propriétés optiques du cerveau dans la zone sondée. Dans nos expérimentations nous avons utilisée comme produits de contraste *le sérum physiologique* et un colorant, *le bleu d'Evans*.

#### Le sérum physiologique

*Le sérum physiologique* est de l'eau contenant du NaCl en concentration de 0.9 g/100 ml. Il n'absorbe pas la lumière dans le domaine 500-620 nm et comme résultat sa présence dans une certaine zone du tissu a comme effet la diminution de manière temporaire de l'absorbance optique dans les vaisseaux sanguine traversés et donc une diminution de l'absorbance des tissus traversés par ces vaisseaux. Cette diminution de l'absorbance du tissu dans une zone sondée est fonction de la quantité de sérum physiologique injectée, de volume sanguine dans cette zone et va dépendre bien sur de flux sanguin.

#### Le Bleu d'Evans

*Le Bleu d'Evans* (ou "azovan blue") est un colorant ayant une forte affinité pour l'albumine du sang de sorte qu'il ne quitte les compartiments sanguins que très lentement. Il n'est pas détruit dans le sang et ne pénètre pas les cellules. Grâce à ces propriétés il est utilisé dans les applications biomédicales pour mesurer le volume sanguin. Nous utilisons le Bleu d'Evans en quelques études d'hémodynamique cérébrale. Le Bleu d'Evans a un pic d'absorption à 611 nm (voir la figure 2.9 page 45), son coefficient d'extinction à cette longueur d'onde étant  $68 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ,

c'est-à-dire environ de 6-7 fois plus forte que celle de l'hémoglobine à la même longueur d'onde, ainsi qu'il est possible d'envisager des études ayant comme but la évidence du passage d'un bolus de Bleu d'Evans au niveau cérébral même dans les conditions d'une faible concentration du colorant. Typiquement, on injecte 0.2 ml solution de Bleu d'Evans 0.4%.

Les injections des *bolus optiques* (sérum physiologiques où Bleu d'Evans) ont été réalisées généralement à la fin du palier d'hyperoxie juste avant l'euthanasie à l'aide d'un cathéter dans la veine fémorale gauche.

### 2.3.3 Vélocimétrie Doppler

L'interaction entre le rayonnement optique et le tissu biologique se fait d'une part avec des structures immobiles, mais d'autre part avec des globules rouges (*RBC*) qui sont mobiles. Suite à l'interaction avec les *RBC* circulant dans le système vasculaire la fréquence du rayonnement diffusé est décalée de la fréquence du rayonnement monochromatique incidente par effet Doppler, décalage qui dépend de la vitesse des hématies et qui est proportionnel au volume total de *RBC* en mouvement dans la zone explorée. Le produit de la vitesse des *RBC* avec la fraction des *RBC* en mouvement correspond au débit sanguin cérébral, paramètre physiologique essentiel qu'il est très intéressant de corrélérer aux évolutions temporelles de la saturation en oxygène.

Cette mesure est effectuée au moyen d'un appareil commercial (modèle 4000P *PERIMED*, Suède) mis en oeuvre par les biologistes du laboratoire de *RMN Bioclinique*. Cet appareil comprend une sonde de 500  $\mu\text{m}$  de diamètre constituée d'une fibre utilisée pour injecter la lumière dans le tissu (780 nm) et deux autres pour collecter le rayonnement diffusé. L'appareil affiche directement le débit sanguin, le taux de globules rouges en mouvement et la vitesse des globules rouges mesurés avec une résolution spatiale d'environ 1  $\text{mm}^3$  et une résolution temporelle de 300 ms [4]. Afin de comparer les valeurs du débit sanguin cérébral avec celles de la saturation en oxygène la sonde Doppler et la sonde optique sont introduites par la même canule de sorte qu'elles sondent des zones proches avec des coefficients optiques comparables.

## 2.4 Conclusions

Dans ce chapitre nous avons présenté les équipements, les techniques et les méthodes utilisées dans la spectrométrie des milieux diffusants à l'aide des sondes optiques aiguilles. Nous avons choisi pour la réalisation des fantômes optiques les suspensions de billes de polystyrène à cause de la possibilité de les fabriquer avec une petite variation de leur dimension et comme absorbant le Bleu d'Evans d'une part parce que il a son spectre d'absorption dans la gamme spectrale d'intérêt (500-620 nm) et d'autre part parce que il peut être utilisé comme produit de contraste dans les expérimentations *in vivo*, n'ayant aucun effet physiologique négatif. Aussi, nous avons présenté le protocole expérimental et les équipements annexes utilisés dans les études d'hémodynamique cérébrale. Toutes les techniques et les dispositifs présentés sont utilisés dans les études de spectrométrie des milieux diffusants du chapitre suivant.

## Bibliographie

- [1] S. Avrillier, E. Tinet, D. Ettore, J.M. Tualle, and B. Gelebart. Influence of the emission-reception geometry in laser-induced fluorescence spectra from turbid media. *Appl.Opt.*, 37 :2781–2787, 1998.
- [2] C.F. Bohren and D.R. Huffman. *Absorption and Scattering by Small Particles*. John Wiley and Sons Inc, New York, 1998.
- [3] W.F. Cheong, S.A. Prahl, and A.J. Welch. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE J.Quantum Electronics*, 26 :2166–2185, 1993.
- [4] Cecile Dolbec. *Réactivité cérébrovasculaire à l'hypoxémie : applications à un modèle de tumeur intracérébrale chez le rat*. PhD thesis, Université Joseph Fourier Grenoble I, 2001.
- [5] J. Dufaux, P. Snabre, and G. Guiffant. Le voyage des globules rouges. *Pour la science*, 297 :80–85, 2002.
- [6] C.E. Elwell. *The physical principles of near infrared spectroscopy*. Hamamatsu Photoncs, 1995.
- [7] S. Feng, F. Zeng, and B. Chance. Monte Carlo simulations of photon migration path distributions in multiple scattering media. *Proc. SPIE*, 1888 :78–89, 1993.
- [8] S. Feng, F. Zeng, and B. Chance. Photon migration in the presence of a single defect : a perturbation analysis. *Appl.Opt.*, 34(19) :3826–3837, 1995.
- [9] M. Firbank and D.T. Delpy. A design for a stable and reproducible phantom for use in near infrared imaging and spectroscopy. *Phys.Med.Biol.*, 38 :847 :853, 1993.
- [10] M. Firbank, M. Oda, and D.T. Delpy. An improved design for a stable and reproducible phantom material for use in near infrared spectroscopy and imaging. *Phys.Med.Biol.*, 40 :955 :961, 1995.



- 
- [11] B. Gélébart, E. Tinet, J.M. Tualle, and S. Avrillier. Phase function in tissue phantoms : a fractal approach. *Pure Appl.Opt.*, 5 :377–388, 1996.
- [12] P. Kaplan, M.Kao, A.Yodh, and D.Pine. Geometric constraints for the design of diffusing-wave spectroscopy. *Appl.Opt.*, 32(21) :3828–3836, 1993.
- [13] H. Li, L. Lin, and S. Xie. Refractive index of human whole blood with different types in the visible and near infrared ranges. *SPIE.Proc.*, 3914 :517–521, 2000.
- [14] J.R. Mourant, I.J. Bigio, D.A. Jack, T.M. Johnson, and H.D. Miller. Measuring absorption coefficients in small volumes of highly scattering media : source-detector separations for which path lengths do not depend on scattering properties. *Appl.Opt.*, 36 :5655–5661, 1997.
- [15] J.R. Mourant, J. Boyer, A. Hielscher, and I.J. Bigio. Influence of the scattering phase function on light transport measurements in turbid media performed with small source-detector separations. *Opt.Lett.*, 21 :546–548, 1996.
- [16] Kimizo Ono. Fiber optic spectrophotometry system for in vivo tissue diagnosis. *Appl.Opt.*, 30 :98–105, 1991.
- [17] B.W. Pogue and G. Burke. Fiber optic bundle design for quantitative fluorescence measurement from tissue. *Appl.Opt.*, 37 :7429–7436, 1998.
- [18] WH Press, SA Teukolsky, W.T. Vetterling, and B.P. Flannery. *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, 1992.
- [19] A. Roggan, M. Friebel, K. Doershel, A. Hahn, and G. Mueller. Optical properties of circulating human blood in the wavelength 400-2500 nm. *J.Biomed.Opt.*, 4(1) :47–53, 1999.
- [20] S.V. Tsinopoulos, E.J. Sellountos, and D. Polyzos. Light scattering by aggregated red blood cells. *Appl.Opt.*, 41(7) :1408–1417, 2002.
- [21] V. Tuchin. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*. SPIE Press, 2002.

- 
- [22] V.Sankaran, J.Walsh, and D.Maitland. Polarized light propagation in biological tissue and tissue phantoms. *Proc.SPIE*, 4001 :54–62, 2000.
- [23] A.N. Yaroslavski, I.V. Yaroslavski, T. Goldbach, and H.J. Schwartzmaier. The optical properties of blood in the near infrared spectral range. *SPIE*, 2678 :314–324, 1996.

---

# Spectrométrie en milieux diffusants à l'aide des sondes optiques aiguilles. Applications

---

### Sommaire

---

<b>3.1 Spectrométrie en milieux diffusants en conditions d'une distribution homogène des chromophores . . . . .</b>	<b>63</b>
3.1.1 Configuration expérimentale et méthode de travail . . . . .	64
3.1.2 Résultats expérimentaux . . . . .	64
3.1.3 Calcul de la longueur des trajectoires des photons par simulations numériques de Monte Carlo . . . . .	66
3.1.4 Discussions . . . . .	68
<b>3.2 Application : étude de l'oxygénation cérébrale, in vivo, chez le rat, au cours d'une hypoxémie progressive . . . . .</b>	<b>71</b>
3.2.1 Montage expérimental. Méthode de travail . . . . .	71
3.2.2 Résultats expérimentaux . . . . .	72
3.2.3 Conclusions . . . . .	87
<b>3.3 Spectrométrie en milieux diffusants en conditions d'une distribution non homogène des chromophores . . . . .</b>	<b>91</b>

3.3.1	Configuration expérimentale et méthode de travail . . . . .	91
3.3.2	Résultats expérimentaux . . . . .	92
3.3.3	Simulations de Monte Carlo en conditions d'absorbance localisée . . . . .	96
3.3.4	L'effet d'utilisation d'un facteur correctif . . . . .	98
3.3.5	Conclusions . . . . .	101
<b>3.4</b>	<b>Conclusions . . . . .</b>	<b>102</b>
	<b>Bibliographie . . . . .</b>	<b>103</b>

*Ce chapitre, essentiellement expérimental est divisé en trois parties. Dans une première partie nous présenterons des résultats issus des expériences et des simulations numériques sur les possibilités offertes par la spectrométrie en milieux diffusants à l'aide des sondes optiques aiguilles de quantifier les concentrations des chromophores. Comme application des ces études dans la deuxième partie nous présenterons quelques études d'hémodynamique cérébrale, in vivo, chez le rat. Nous reviendrons dans la troisième partie sur la spectrométrie en milieux diffusants à l'aide des sondes optiques aiguilles, cette fois dans les conditions d'une localisation spatiale des chromophores et nous nous intéresserons de l'impact du confinement du sang sur l'estimation du volume sanguine cérébral.*

### **3.1 Spectrométrie en milieux diffusants en conditions d'une distribution homogène des chromophores**

Dans les milieux diffusants, le trajet de la lumière est une variable aléatoire, dont la répartition statistique dépend de la géométrie utilisée et des propriétés optiques du milieu étudié. En particulier, la longueur moyenne du trajet des photons est affectée par le coefficient d'absorption. Comme résultat, nous attendons que l'atténuation de la lumière n'est pas proportionnelle au coefficient d'absorption dans les milieux très absorbants ce qui a pour effet de distordre les spectres d'absorption. Pour préciser l'effet de la nature aléatoire du trajet emprunté par la lumière sur les spectres d'absorption dans le cas d'une géométrie à sondes optiques aiguilles nous étudions l'atténuation de la lumière dans des milieux caractérisés par des différentes longueurs effectives de diffusion

$l^* = 1/\mu_s^*$  et d'absorption  $l_a = 1/\mu_a$ .

### 3.1.1 Configuration expérimentale et méthode de travail

Dans ce but nous effectuons des mesures de l'intensité lumineuse retrodiffusée par des milieux modèles à l'aide du dispositif expérimental présenté dans la figure 2.1 page 34. Nous avons préparé deux types d'échantillons. Le premier contenait seulement de billes de latex, de sorte que l'échantillon soit parfaitement diffusant, complètement non absorbant dans la gamme du domaine spectral visible. Le diamètre des billes de latex est 435 nm. A l'aide d'un calcul de Mie on évalue pour une longueur d'onde de 620 nm un facteur d'anisotropie  $g = 0.77$  et une longueur réduite moyenne de diffusion des photons  $l^* = l(1 - g)$  de 2.4, 1.2, 0.6 et 0.3 correspondant à quatre valeurs des concentrations volumiques des billes de latex de 0.12, 0.24, 0.48 et 0.96% respectivement. Le deuxième type d'échantillons a été identique au premier, sauf qu'on a ajouté dans la suspension diffusante un colorant (Bleu d'Evans). Pour chacune de quatre valeurs du parcours libre moyen effectif des photons  $l^*$  que nous avons considéré on a mesuré l'atténuation du rayonnement optique, atténuation définie comme  $\log I_0(\lambda)/I(\lambda)$  où  $I(\lambda)$  et  $I_0(\lambda)$  sont respectivement les intensités mesurées lorsque la sonde optique est plongée dans la suspension de billes de latex avec et sans colorant.

### 3.1.2 Résultats expérimentaux

Pour chaque longueur d'onde les valeurs de l'atténuation sont représentés graphiquement en fonction du coefficient d'absorption  $\mu_a$  du colorant (voir la figure 3.1 page suivante). La variation du coefficient d'absorption est faite par la variation de la longueur d'onde entre 620 et 690 nm.

Premièrement il faut noter que l'atténuation du rayonnement optique ne varie pas linéairement avec le coefficient d'absorption du milieu  $\mu_a$ . C'est lorsque  $l_a < l^*$  que la statistique des chemins empruntés par les photons est la plus fortement perturbée par l'absorption et que l'on observe la plus forte baisse de la sensibilité de l'atténuation au coefficient d'absorption. On peut alors conclure que dans les conditions où le milieu est fortement absorbant et  $l_a < l^*$  la variation de l'atténuation ne dépend que très peu de variations du coefficient d'absorption.

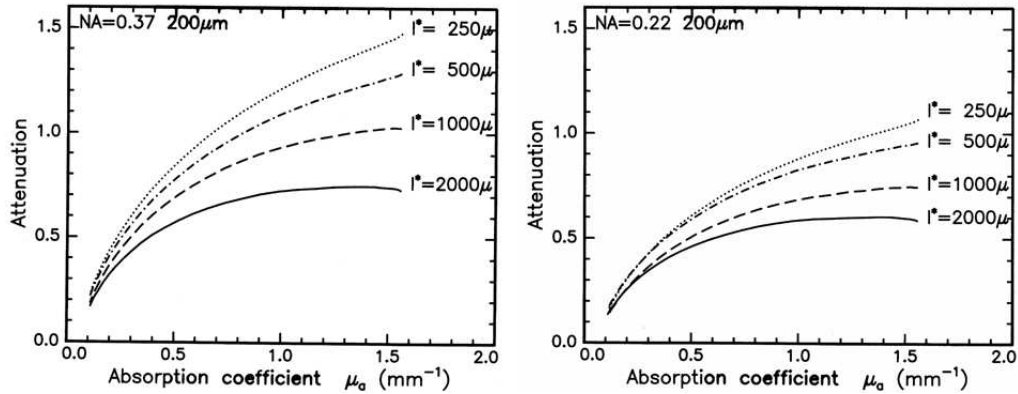


FIG. 3.1 – Variations de l'atténuation du rayonnement optique pour différentes valeurs du  $l^*$  en fonction du coefficient d'absorption du Bleu d'Evans dans une géométrie retro-diffusante. Les fibres optique sont collées chaque d'elles ayant un diamètre de  $200 \mu\text{m}$ . Dans un premier cas (à gauche) l'ouverture numérique des fibres a été 0.37 tandis que dans le deuxième cas 0.22 (à droite) [1]

Deuxièmement, lorsque  $l^* < l_a$  l'atténuation varie très vite avec le coefficient d'absorption. Dans ce cas l'atténuation est pratiquement proportionnelle au coefficient d'absorption, le facteur de proportionnalité étant dépendant de l'ouverture numérique des fibres optiques. Il en résulte donc que dans les conditions où  $l^* < l_a$  les spectres d'absorption *ne sont pas distordus* à cause de la diffusion.

Nos résultats sont en bonne corrélation avec les résultats obtenus de Kohl et al [13] dans un régime de validité de l'approximation de la diffusion. En fait, Kohl montre que le facteur  $DPF \propto \frac{\partial A}{\partial \mu_a}$  est proportionnel à l'inverse du facteur  $D_s$ , (où  $D_s = \partial A / \partial \mu_s$ ). Notre expérimentation vérifie de manière qualitative leur supposition : pour un coefficient d'absorption donné on observe une croissance du  $DPF$  avec la baisse du  $l^*$ . Cette chose apparaît plus claire en analysant l'estimation semi quantitative de la variation du  $\frac{\partial A}{\partial \mu_s^*}$  en fonction de  $\frac{\partial A}{\partial \mu_a}$  pour le cas de la sonde à fibres optiques d'ouverture numérique 0.37 du tableau 3.1.2 page suivante. Les valeurs présentées correspondant à la valeur du coefficient d'absorption  $\mu_a = 0.5 \text{ mm}^{-1}$ .

Troisièmement, si on compare les valeurs obtenus pour les cas des deux types de sondes optiques (ouvertures numériques 0.37 et 0.22) on peut observer que en général l'atténuation est plus petite pour la petite valeur de l'ouverture numérique. Cela nous suggère que la longueur des tra-

$\frac{\partial A}{\partial \mu_s^*}$ (mm)	$\frac{\partial A}{\partial \mu_a}$ (mm)
0.150	0.75
0.085	0.85
0.050	1.0

TAB. 3.1 – Estimation semi quantitative de la variation du  $\frac{\partial A}{\partial \mu_s^*}$  en fonction de  $\frac{\partial A}{\partial \mu_a}$  pour le cas de la sonde à fibres optiques d'ouverture numérique 0.37. Les estimations ont été faites pour un coefficient d'absorption  $\mu_a=0.5 \text{ mm}^{-1}$ .

jectoires des photons est plus petite pour NA=0.22 que pour NA=0.37. L'explication pourrait être mise sur le fait que pour les petites valeurs de l'ouverture numérique on collectera davantage de photons subissant peu des diffusions, mais aux larges angles de diffusion.

Afin de confirmer les résultats expérimentaux nous avons réalisé des calculs des longueurs moyennes des trajectoires des photons par simulations numériques de Monte Carlo.

### 3.1.3 Calcul de la longueur des trajectoires des photons par simulations numériques de Monte Carlo

Les simulations numériques qu'on a réalisé correspondent à la géométrie expérimentale de la figure 2.1 où la sonde optique est composée des fibres optiques de diamètre  $200 \mu\text{m}$  et la distance de séparation entre les fibres est égale à leur diamètre. La longueur moyenne des trajectoires des photons est calculée en suivant la trajectoire du chaque photon dans le milieu diffusant entre le point d'injection et le point de détection. Les simulations ont été effectuées pour des valeurs du coefficient d'absorption du milieu dans la gamme 0 à  $2.0 \text{ mm}^{-1}$ . Les photons injectés dans le milieu à l'aide de la fibre émettrice sont diffusés par les billes de polystyrène en directions données par la fonction de phase de Henyey-Greenstein. Une liste complète des paramètres des simulations est présentée dans le tableau 3.2 page suivante et les dépendances de  $\bar{L}$  de la longueur d'onde dans la figure 3.2 page suivante.

Considérons le cas où la suspension diffusante est caractérisée par une fraction volumique occupée par les billes de polystyrène de 0.24%. Dans ce cas, conformément aux résultats de la sous section précédente, la proportionnalité entre l'atténuation lumineuse et le coefficient d'absorption

Paramètre de la simulation	Valeurs
<i>photons lancés</i>	$3\text{-}5 \times 10^6$
<i>rayon fibres optiques</i>	100 $\mu\text{m}$
<i>ouverture numérique fibres optiques</i>	0.37
<i>distance source-détecteur</i>	0.2 mm
<i>coefficient d'absorption du milieu</i>	$\mu_a = 0, 0.5, 1.0, 2.0 \text{ mm}^{-1}$
<i>coefficient de diffusion du milieu</i>	donné par un calcul de Mie
<i>coefficient d'anisotropie g</i>	donné par un calcul de Mie
<i>diamètre des billes de latex</i>	435 nm
<i>concentration volumiques des billes de latex</i>	0.24%
<i>indice de réfraction de billes de latex</i>	1.55

TAB. 3.2 – Les principales paramètres de la simulation numérique de Monte Carlo utilisée pour les calculs des longueurs des trajectoires des photons dans un milieu diffusant.

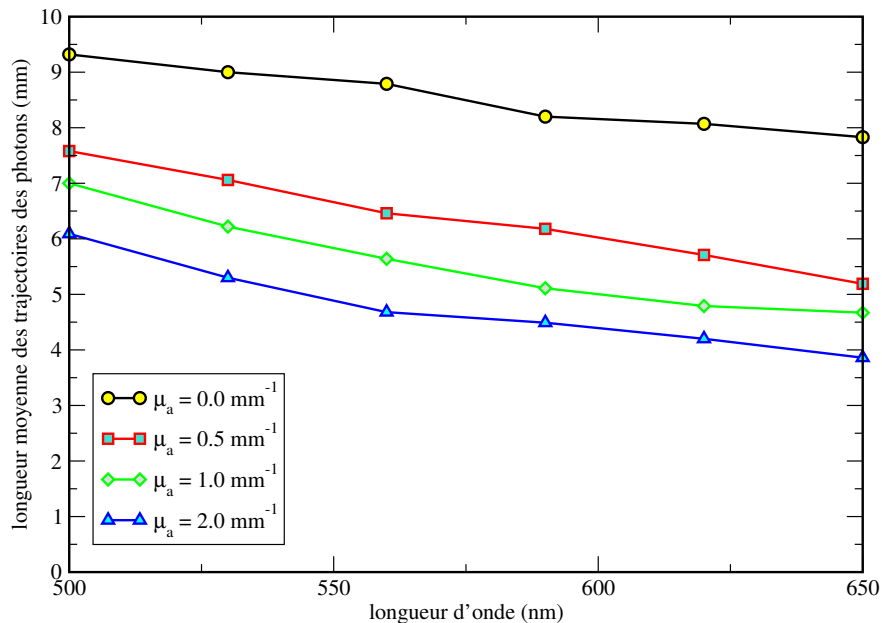


FIG. 3.2 – Les longueurs moyenne des trajectoires des photons fonction de la longueur d'onde pour différent valeurs du coefficient d'absorption. Le milieu est caractérisé par une fraction volumique occupée par les billes de polystyrène de 0.24%, tandis que la valeur de la longueur effective des trajectoires des photons  $l^*$ , est établie utilisant un calcul de Mie.

a lieu si le coefficient d'absorption est inférieure à  $0.83 \text{ mm}^{-1}$ . En quelle mesure les simulations numériques la confirment ? Dans le tableau 3.3 nous présentons des variations relatives de la longueur moyenne des trajectoires des photons  $\bar{L}$  sur trois domaines spectrales. On constate que les simulations confirment au moins qualitativement les résultats des expériences. Les simulations



Domaine Spectral	$\delta\bar{L}$ ( $\mu_a = 0.0 \text{ mm}^{-1}$ )	$\delta\bar{L}$ ( $\mu_a = 0.5 \text{ mm}^{-1}$ )	$\delta\bar{L}$ ( $\mu_a = 1.0 \text{ mm}^{-1}$ )	$\delta\bar{L}$ ( $\mu_a = 2.0 \text{ mm}^{-1}$ )
500-650 nm	15%	24%	33%	36%
500-620 nm	13%	20%	31%	31%
530-590 nm	10%	12%	23%	27%

Tab. 3.3 – Les variations des longueurs des trajectoires des photons sur différentes domaines spectrales pour différentes valeurs du coefficient d'absorption du milieu. Résultats extraits de la figure 3.2.

suggèrent que  $\bar{L}$  décroît de manière monotone avec la longueur d'onde et que la variation de  $\bar{L}$  sur un domaine spectral est moins importante quand il est moins large, d'où la conclusion qu'il faut réduire le domaine spectral jusqu'à la plus petite taille possible. La raison pour la quelle nous optons pour le domaine 500-620 nm est que dans ce domaine on retrouve les pics d'absorption des plusieurs enzymes respiratoires ([3],[11]), du Bleu d'Evans ([6],[16]) et les absorbances des hémoglobines ([18],[3]) ont des formes bien distinctes de manière qu'on peut aisément reconnaître à partir de l'étude de l'atténuation lumineuse les états oxygénés et désoxygénés du tissu. Il faut aussi remarquer l'existence d'un décalage important entre les variations de  $\bar{L}$  lorsque  $\mu_a=0.5 \text{ mm}^{-1}$  et lorsque  $\mu_a=1.0 \text{ mm}^{-1}$ . Ainsi, les simulations de Monte Carlo suggèrent que *la dépendance du  $\bar{L}$  de  $\lambda$  est moins forte si  $l^* < l_a$* . Ceci conduit à une corrélation des résultats des simulations numériques avec les conclusions des expériences lorsque  $\delta\bar{L}(\lambda, \lambda + \delta\lambda)$  est suffisamment petit.

Dans les paragraphes suivants nous supposerons que dans les conditions où  $l^* < l_a$ ,  $\bar{L}$  est indépendant de  $\lambda$  sur le domaine spectrale 500-620 nm.

### 3.1.4 Discussions

Le résultat principal des expériences et des simulations ( $A \propto \mu_a$  lorsque  $l^* < l_a$ ) a une importance pratique particulière parce que nous offre la possibilité d'utiliser la loi de Beer-Lambert sous la forme 1.5, valable pour le cas des milieux limpides dans le cas des milieux diffusants pour extraire les variations des concentrations des chromophores. Justifions à présent cette affirmation.

Soit  $I_0$  le nombre de photons injectés dans le milieu arrivant à la fibre réceptrice lorsque le milieu diffusant est non absorbant,  $I$  lorsque le milieu est à la fois absorbant et diffusant est soit  $I_i$  le nombre de photons ayant parcourus la trajectoire  $i$  de longueur  $L_i$  entre le point d'émission et

de détection. Ainsi, on peut écrire :

$$\frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} = \frac{\sum_i I_i(\lambda) e^{-\mu_a(\lambda) L_i}}{I_0(\lambda)} \quad (3.1)$$

Comme  $l^* < l_a$  et comme généralement  $l^*$  et  $L_i$  ont le même ordre de grandeur (confirmé par simulation numérique), il est raisonnable de considérer que  $\mu_a L_i < 1$  ainsi que on peut développer en série  $e^{-\mu_a L_i}$  de sorte que :

$$\frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} = \frac{\sum_i I_i(\lambda) (1 - \mu_a(\lambda) L_i)}{I_0(\lambda)} = \frac{\sum_i I_i(\lambda)}{I_0(\lambda)} - \mu_a(\lambda) \frac{\sum_i I_i(\lambda) L_i}{I_0(\lambda)} = 1 - \mu_a(\lambda) \bar{L}$$

Il en résulte :

$$\frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} = e^{-\mu_a(\lambda) \bar{L}} \quad (3.2)$$

Cette relation est pratiquement identique à la relation 1.5 page 10 dans laquelle le  $L$  représentant la distance géométrique entre la source et le détecteur est remplacé par la longueur moyenne des trajectoires des photons  $\bar{L}$ .

Parce que in vivo il n'est pas possible de mesurer  $I_0(\lambda)$  (cela correspond à une situation où le tissu cérébral est complètement vidé de son sang) il faut le remplacer par l'intensité mesurée dans un milieu de référence. Soit  $I_0^{ref}(\lambda)$  l'intensité mesurée dans un milieu modèle de référence caractérisé par un  $l^*$  comparable au  $l_{cerveau}^*$  de sorte qu'on est toujours dans une situation où  $l^* < l_a$ . Comme entre  $I_0(\lambda)$  et  $I_0^{ref}(\lambda)$  il y a la relation de proportionnalité :

$$I_0(\lambda) = \alpha \times I_0^{ref}(\lambda)$$

il en résulte qu'on peut utiliser la relation 3.2 pour exprimer l'atténuation de l'intensité lumineuse

dans le cerveau par rapport à l'intensité dans un milieu de référence par :

$$A(\lambda_j) = \log \frac{I_0^{réf}(\lambda_j)}{I_0(\lambda_j)} = \sum_i \alpha \times \mu_{ai}(\lambda_j) \times \bar{L} \quad (3.3)$$

Cette équation nous montre que la relation entre  $A(\lambda)$  et  $\mu_a(\lambda)$  est linéaire et on peut envisager la détermination des concentrations des chromophores en se trouvant dans le tissu par la mesure de l'intensité lumineuse retrodiffusée par le tissu et de l'intensité retrodiffusée par un milieu de référence. Si la condition  $l^* < l_a$  est remplie pour le cas du tissu cérébral, alors on peut envisager des calculs des variations des concentrations des hémoglobines et de la saturation cérébrale en oxygène. Conformément à Cope [3] la concentration moyenne de l'hémoglobine dans le cerveau est environ de  $84 \mu\text{M}$ . Considérant que l'hémoglobine est complètement oxygénée, nous estimons une valeur maximale du coefficient d'absorption sur le domaine 500-620 nm de  $0.46 \text{ mm}^{-1}$ , d'où une longueur d'absorption environ de 2.2 mm. Comme généralement, le coefficient effectif de diffusion du cerveau estimé par plusieurs auteurs ([3],[2],[19]) dans les domaines spectrales visible et proche infrarouge varie de 1 à  $4 \text{ mm}^{-1}$  ( $l^* = \overline{0.25, 1} \text{ mm}$ ) il résulte qu'il est possible d'envisager des études d'oxymétrie cérébrale, in vivo, à l'aide d'un système spectrométrique à fibres aiguilles. D'autre part, afin d'étudier le passage d'un bolus de colorant au niveau cérébral, on a injecté une solution de Bleu d'Evans en concentration de 0.4 % dans la circulation sanguine. En partant du fait que le volume sanguin du rat est environ de 50-70 ml/kg, son poids corporel environ de 200-250 g et que la valeur maximale du coefficient d'extinction du Bleu d'Evans est environ de  $68.5 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ , on peut facilement évaluer un maximum du coefficient d'absorption environ de  $0.1 \text{ mm}^{-1}$ , d'où une valeur de la longueur d'absorption de  $\sim 10 \text{ mm}$ . Une étude de l'évolution temporelle de la concentration locale du colorant au niveau cérébrale est donc possible.

## 3.2 Application : étude de l'oxygénation cérébrale, in vivo, chez le rat, au cours d'une hypoxémie progressive

*Afin d'évaluer la sensibilité de notre montage de spectrométrie nous nous focalisons l'attention sur le tissu cérébral en présentant quelques études d'hémodynamique cérébrale, in vivo, chez le rat. En particulier, nous testons notre méthode par des études de l'évolution temporelle de la saturation cérébrale en oxygène au cours de l'hypoxémie et par la comparaison des valeurs de la  $S_{cO_2}$  avec les valeurs du débit sanguin cérébral mesurés par vélocimétrie Doppler. Aussi, nous présentons des résultats envisageant des possibilités d'utilisation de la méthode dans des études sur les réactions hémodynamiques dues à l'injection d'un traceur optique, la mise en évidence d'une ischémie et des variations de l'absorbance optique dues aux variations d'état rédox des cytochromes.*

### 3.2.1 Montage expérimental. Méthode de travail

On se reportera à la figure 2.14 page 54 pour une illustration du dispositif expérimental et à la section 2.3.1 pour le protocole biologique.

Les concentrations des chromophores sont extraites par l'ajustement numérique des courbes expérimentales de la forme :

$$\log \left( \frac{I_0(\lambda_i, t)}{I(\lambda_i, t)} \right) = [\varepsilon_{HbO_2}(\lambda_i)C_{HbO_2}(t) + \varepsilon_{Hb}(\lambda_i)C_{Hb}(t) + \varepsilon_{BE}(\lambda_i)C_{BE}(t)] \times K + B \quad (3.4)$$

où  $K$  est une constante tenant compte de la longueur des trajectoires des photons ainsi que de la proportionnalité entre le  $I_0(\lambda)$  mesuré dans le milieu modèle et le  $I_0(\lambda)$  mesuré dans le cerveau vidé de son sang,  $B$  est une ligne de base faiblement variable avec la longueur d'onde et  $B = a\lambda + b$ <sup>1</sup>. Le terme  $\varepsilon_{BE}(\lambda_i)C_{BE}(t)$  tenant compte de la présence du colorant est utilisé pour des ajustements seulement dans les cas où l'injection du Bleu d'Evans est faite. Dans la procédure d'ajustement numérique nous n'avons pas pris en compte l'absorption des enzymes respiratoires en raison de

<sup>1</sup>La seule justification de cette approche est le fait que la courbe expérimentale  $\log(I_0(\lambda)/I(\lambda))$  s'ajuste bien par une expression de type 3.4.

la variabilité des résultats sur leurs spectres d'absorption. En fait, conformément à Hoshi et al [11], l'introduction d'un terme supplémentaire tenant compte de l'existence des cytochromes dans la relation 3.4 n'améliore pas l'ajustement des courbes expérimentales de manière significative. L'intensité  $I_0(\lambda)$  est mesurée en plongeant la sonde optique dans une suspension de microbilles de polystyrène de diamètre 435 nm et caractérisée par  $l^* = 0.25$  mm.

Dans la figure 3.3 nous présentons des exemples issus de l'ajustement des courbes expérimentales par l'expression 3.4.

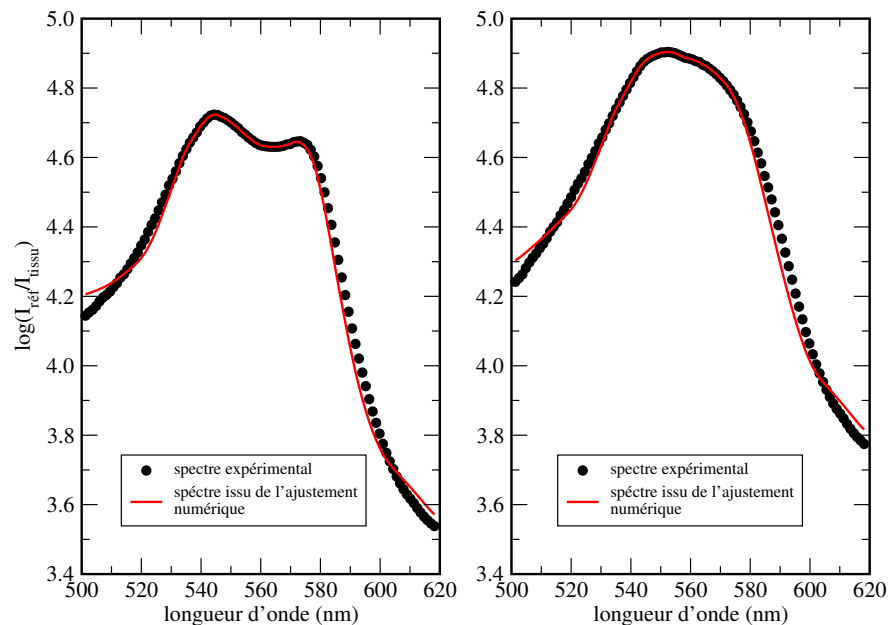


FIG. 3.3 – Des courbes typiques de l'atténuation lumineuse. Le  $I_{ref}$  est l'intensité lumineuse retro-diffusée par le milieu de référence tandis que  $I_{tissu}$  dans le tissu cérébral.

### 3.2.2 Résultats expérimentaux

Dans la figure 3.4 nous présentons un résultat typique de calcul de la  $ScO_2$  au niveau cérébral au cours d'un protocole expérimental complet : une très raisonnable valeur de 70% pendant la normoxie, poursuivie par une baisse jusqu'au 35% pendant le palier d'hypoxémie sévère, retour à la normale et finalement baisse à 5% de la  $ScO_2$  à la mort. Ceci est un cas presque parfait. Malheureusement comme on va voir plus loin, cette situation n'as été observée que très rarement. Des résultats statistiques sur les calculs de  $ScO_2$  au niveau des deux hémisphères cérébraux sont

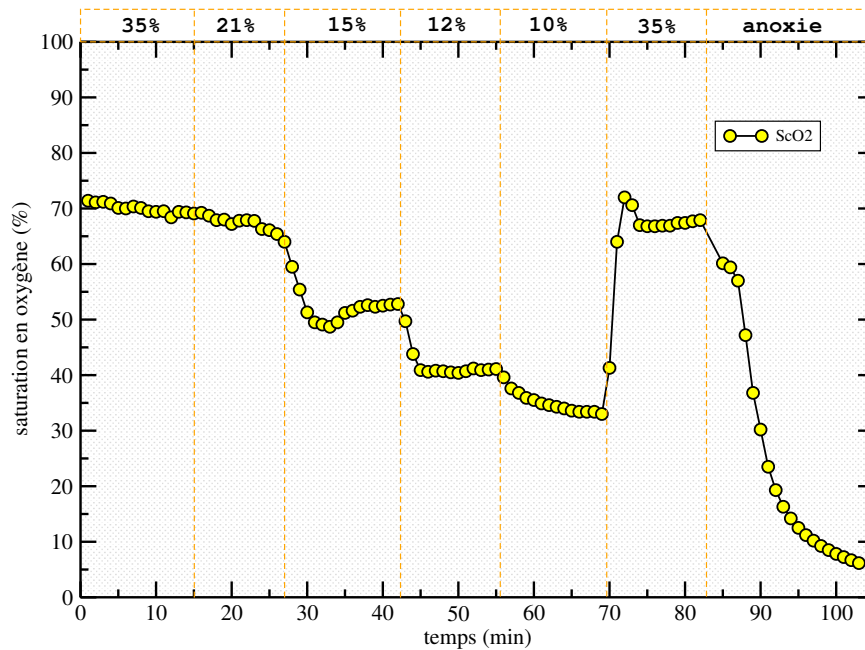


FIG. 3.4 – La variation de la saturation en oxygène au cours de l'hypoxémie progressive. Les valeurs obtenus pendant la normoxie et à la mort de l'animal sont tout à fait raisonnables et correspondent aux résultats trouvés dans la littérature.

présentés dans la figure 3.5.

En principe, on peut analyser ces résultats en plusieurs manières. Premièrement, en étudiant la cohérence des valeurs de la saturation cérébrale en oxygène avec la fraction d'oxygène inspirée par les animaux, deuxièmement par la corrélation des valeurs de la  $ScO_2$  avec les valeurs du débit sanguin cérébral trouvés par vélocimétrie Doppler et finalement en comparant les valeurs de la  $ScO_2$  avec les valeurs de la saturation artérielle ( $SaO_2$ ) et veineuse ( $SvO_2$ ) issues des prélèvements sanguins.

### Étude de la $ScO_2$ au cours d'une hypoxémie progressive

L'évolution qualitative de la  $ScO_2$  est cohérente avec l'évolution attendue, les paliers d'oxygénation correspondant à la  $FiO_2$  inspirée par les animaux étant très nettes. Néanmoins, il faut noter que le système de mélange des gaz contrôlant la  $FiO_2$  n'est pas capable de nous fournir des valeurs fiables de la  $FiO_2$  entre les paliers d'oxygénation, ainsi que on ne peut pas faire une comparaison continue des valeurs de la  $ScO_2$  avec les valeurs de la  $FiO_2$ .

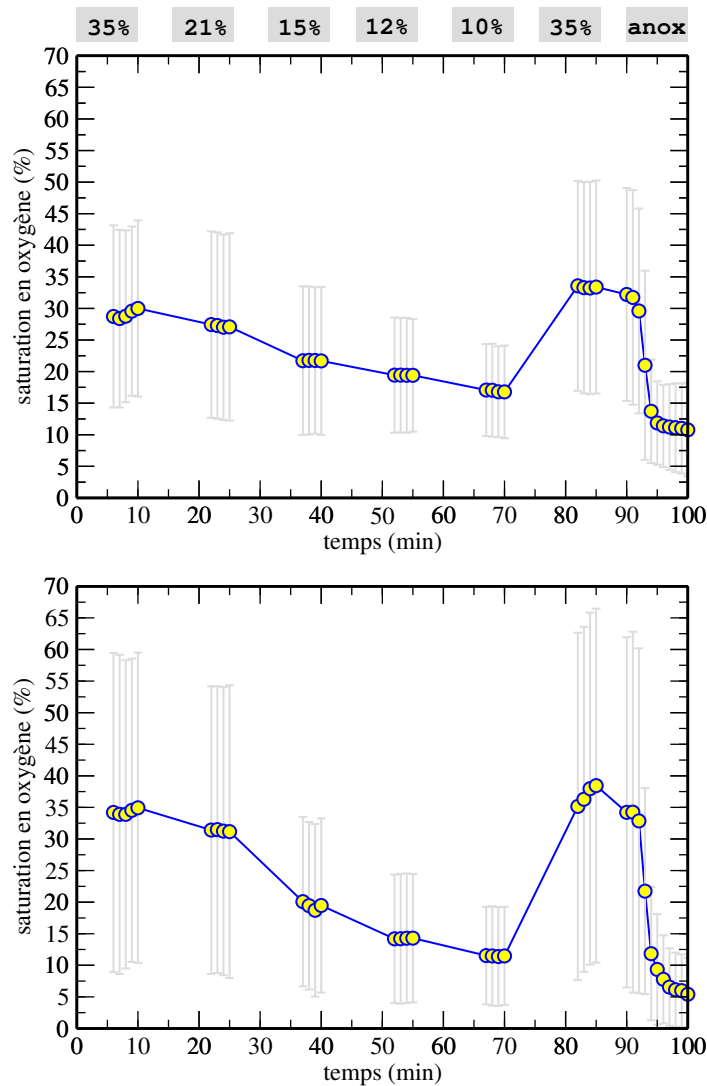


FIG. 3.5 – Les évolutions des saturations en oxygène au niveau des deux hémisphères cérébrales (hémisphère droit en haut et gauche en bas). Les résultats présentés correspond à une moyenne sur 10 animaux.

Du point de vue quantitatif les résultats ne sont pas toujours fiables. Comme on peut constater, il n'y a pas de différences notables entre les valeurs des  $ScO_2$  au niveau des deux hémisphères cérébraux mais les valeurs absolues de la  $ScO_2$  sont critiquables. Tout d'abord le niveau trop bas pendant la normoxie et la très grande variation des résultats d'un rat à l'autre. Il est totalement vrai que le nombre de *variables* qui entre en jeu est très grand. En fait, les mesures par spectrophotométrie in vivo pourraient être influencées par les variations du taux d'hématocrite dans la

zone explorée. Bien que dans nos études les variations du taux d'hématocrite sont restées dans leur limites physiologiques au cours de différents paliers d'oxygénation, le taux d'hématocrite peut varier d'un animal à l'autre suivant la position des sondes optiques (donc d'un hémisphère à l'autre)<sup>2</sup>. Ces aspects pourraient expliquer dans une certaine mesure les résultats obtenus. De plus, à côté des aspects liés à l'influence du taux d'hématocrite sur les valeurs de la  $ScO_2$  il faut aussi retenir que la présence des gros vaisseaux sanguins à proximité des sondes optiques peut avoir des influences très importantes sur le signal lumineux recueilli.

Un autre aspect à remarquer est que généralement les courbes expérimentales ne peuvent pas être ajustées numériquement surtout sur les paliers appauvris en oxygène. Cela peut être expliquée par le fait que les propriétés de diffusion du tissu cérébral change quand ceci est faiblement oxygéné. Ceci est un effet déjà observé par plusieurs chercheurs mais encore inexplicé [3], [9]. Une source des variations du coefficient de diffusion du tissu cérébral pourrait être la variation de la densité des globules rouges donc du volume sanguin cérébral : une croissance du volume sanguin cérébral conduit à une augmentation du coefficient de diffusion. Malheureusement l'effet de l'augmentation du  $\mu_s$  sur la valeur du coefficient d'absorption ne peut pas être précisé.

### **Comparaison $ScO_2$ - $SaO_2$ - $SvO_2$**

L'analyse du gaz du sang nous permet d'extraire les valeurs de la saturation veineuse et artérielle. Bien que le nombre de prélèvements sanguins autorisé par le protocole biologique ne permet pas d'avoir une comparaison continue entre les valeurs de la saturation cérébrale et les valeurs de la saturation veineuse et artérielle durant l'hypoxémie, cependant l'analyse à seulement quelques valeurs des saturations nous permet d'arriver à des conclusions importantes.

Dans la figure 3.6 nous présentons les évolutions de la  $SaO_2$ ,  $SvO_2$  et  $ScO_2$  fonction de la fraction inspirée en oxygène où la saturation artérielle en oxygène est mesurée par l'analyse du gaz du sang prélevé de l'artère fémorale, la saturation veineuse est mesurée par l'analyse du gaz du sang prélevé du sinus veineux cérébral et la saturation tissulaire (cérébrale) en oxygène par notre méthode spectrophotométrique.

---

<sup>2</sup>Il est bien connu que le taux d'hématocrite est plus bas dans les micro vaisseaux cérébraux (~31%) que dans les gros vaisseaux sanguins (~43%) [5]



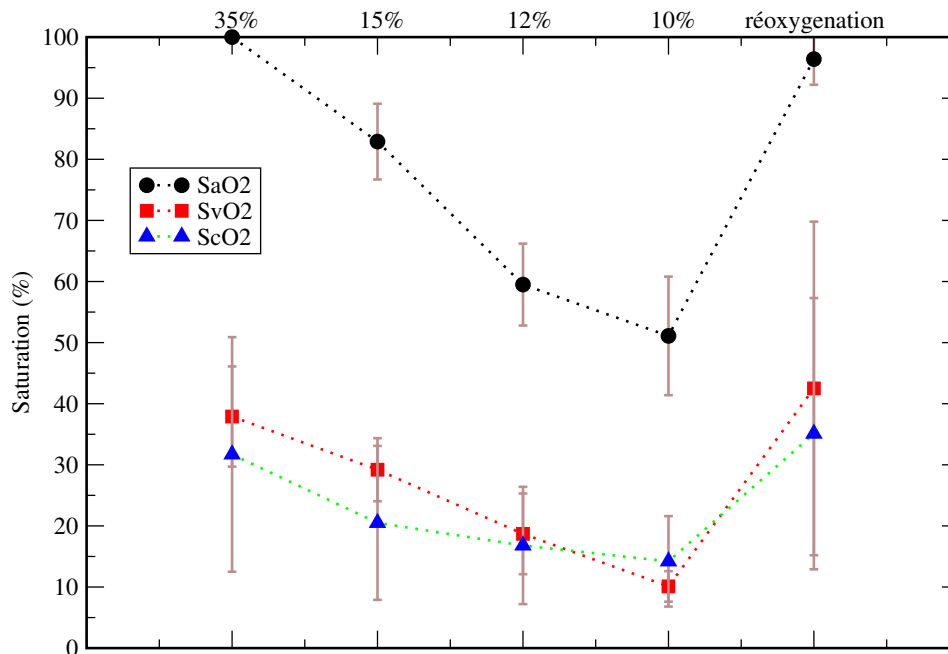


FIG. 3.6 – Les évolutions des saturations en oxygène du sang artérielle et veineux trouvés par l'analyse du gaz du sang et de la saturation cérébrale en oxygène trouvée par spectrométrie optique au cours d'une hypoxémie progressive. Les résultats sont moyennes sur 10 animaux.

L'analyse des dépendances nous montre que les valeurs de la  $ScO_2$  sont très proches de celles de la  $SvO_2$ , malgré à une variabilité en général plus importante pour la  $ScO_2$ . Cela nous suggère que les mesures de  $ScO_2$  reflètent sans doute davantage la saturation du compartiment veineux. C'est un résultat peut être logique tenant compte du fait que la fraction volumique occupée par le compartiment veineux dans le cerveau est environ de 70%. La conséquence immédiate est que les valeurs de la  $ScO_2$  pourraient être biaisées. Cependant, dans la comparaison  $ScO_2-SaO_2-SvO_2$  il faut tenir compte du fait que la  $ScO_2$  représente la saturation tissulaire mesurée localement, alors que la  $SaO_2$  est une quantité *systémique* (c'est ce qui sort les poumons) et la  $SvO_2$  est une quantité moyennée sur l'ensemble du cerveau, parce que le sang est prélevé du sinus veineux, qui est une veine collectant une grande partie du sang s'échappant du cerveau. C'est pour cela qu'on ne peut analyser les graphiques de la figure 3.6 que qualitativement. Ainsi, la conclusion qu'on peut tirer est que l'évolution temporelle des valeurs de la  $ScO_2$  durant le protocole expérimental est cohérente avec les évolutions de la  $SaO_2$  et de la  $SvO_2$ , les valeurs de la saturation cérébrale en oxygène reflétant sans doute la répartition artério-veineuse locale.

### Corrélation $ScO_2$ - $DSC$

Les résultats que nous avons obtenu sur les mesures de vélocimétrie Doppler, sont présentés dans la figure 3.7 page suivante, où à coté du débit sanguin qui nous a intéressé nous présentons les résultats obtenus sur les valeurs de la vitesse des  $RBC$  et la fraction volumique qu'elles occupent. On peut constater que pendant le palier de réoxygénation les variations maximales du débit ont été approximativement de 70% avec une baisse moyenne de 5% par rapport à la normoxie, tandis que sur le palier d'hypoxémie sévère les valeurs extrêmes ont été de 95% avec une croissance de 18% par rapport au palier de contrôle.

Dans la figure 3.8 page 79 nous présentons sur le même graphique les valeurs obtenus pour le débit sanguin par  $LDF$  et de la  $ScO_2$  par spectrophotométrie. Dans ce cas, les valeurs de la saturation cérébrale en oxygène sont calculées à partir des variations des concentrations des hémoglobines par rapport aux valeurs correspondantes au palier de contrôle conformément à la relation 1.22 page 18.

Parce que les résultats n'ont pas varié d'un hémisphère à l'autre nous avons fait les moyennes sur les deux. Les résultats sont présentés sous forme de variation pourcentuelle par rapport au palier de contrôle de 35%. Comme on peut la constater le débit sanguin et la  $ScO_2$  varient presque en miroir, ce qui nous avons attendu. Il devient donc très claire le fait qu'au moins des variations de la saturation en oxygène peuvent être calculées in vivo par spectrophotométrie. Cependant, il se peut observer une baisse plus rapide de la  $ScO_2$  que l'augmentation du débit sanguin cérébral ( $DSC$ ) quand la  $FiO_2$  varie de 21% à 15%. On peut trouver plusieurs explications sur cet aspect.

Premièrement, c'est la variabilité plus faible de la réponse de la  $ScO_2$  sous hypoxémie par rapport au  $DSC$  qui peut entrer en jeu (il est bien claire que les valeurs moyennes de la  $ScO_2$  montrent une déviation moins importante que pour le  $DSC$ ).

Deuxièmement, il faut suspecter des facteurs physiologiques entraînant la baisse rapide de la  $ScO_2$  dès 15% de  $FiO_2$ . En fait, cette baisse rapide de la  $ScO_2$  alors que le  $DSC$  ne varie pas de manière significative correspond à une baisse de l'oxygénation du sang induite par l'hypoxémie sans modification de l'extraction de l'oxygène par le tissu. Ce phénomène physiologique

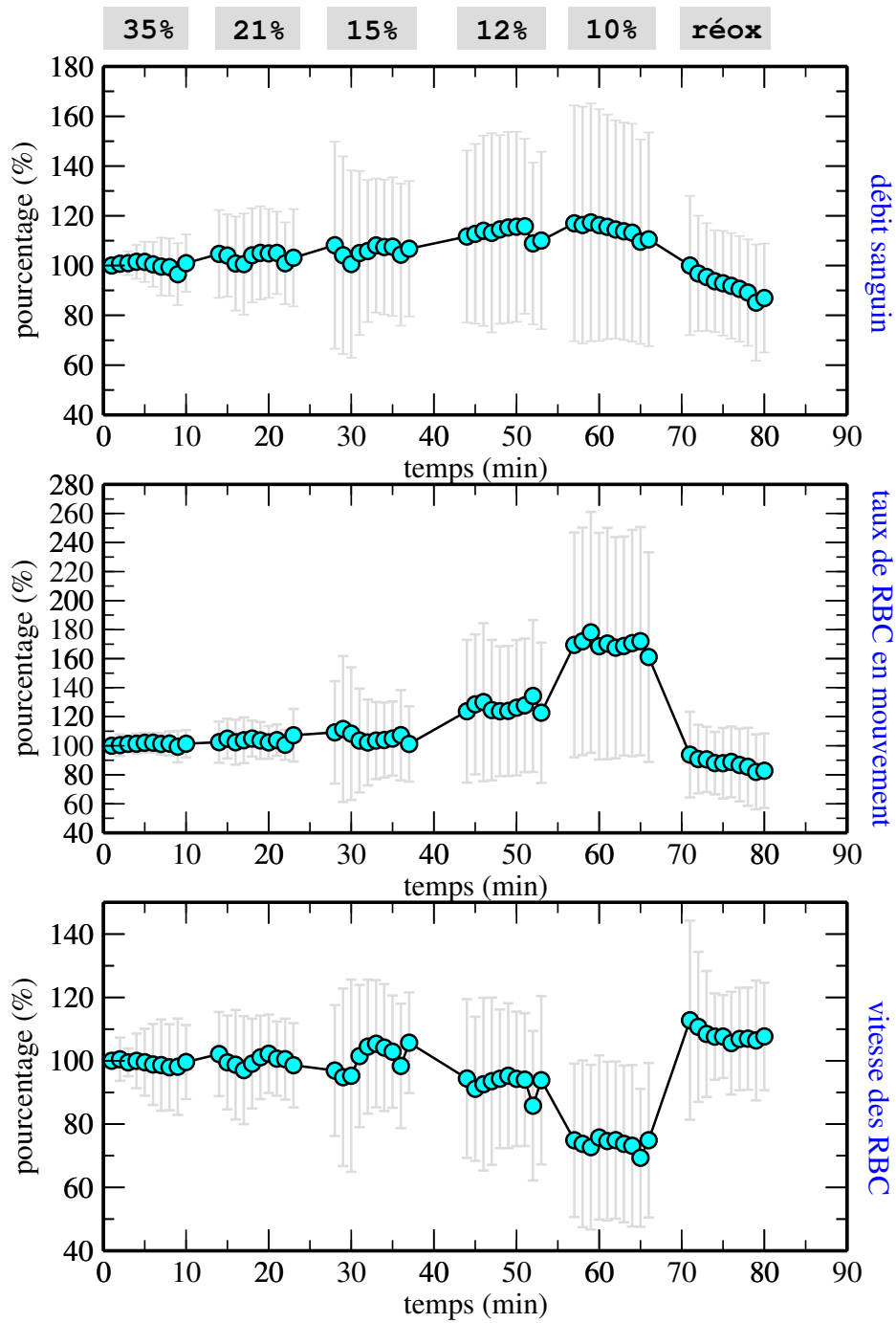


FIG. 3.7 – Les valeurs moyennées du débit sanguin, du taux des RBC en mouvement et de la vitesse des RBC mesurées par LDF pendant l'hypoxémie progressive. Les résultats sont moyennés sur 8 rats sains.

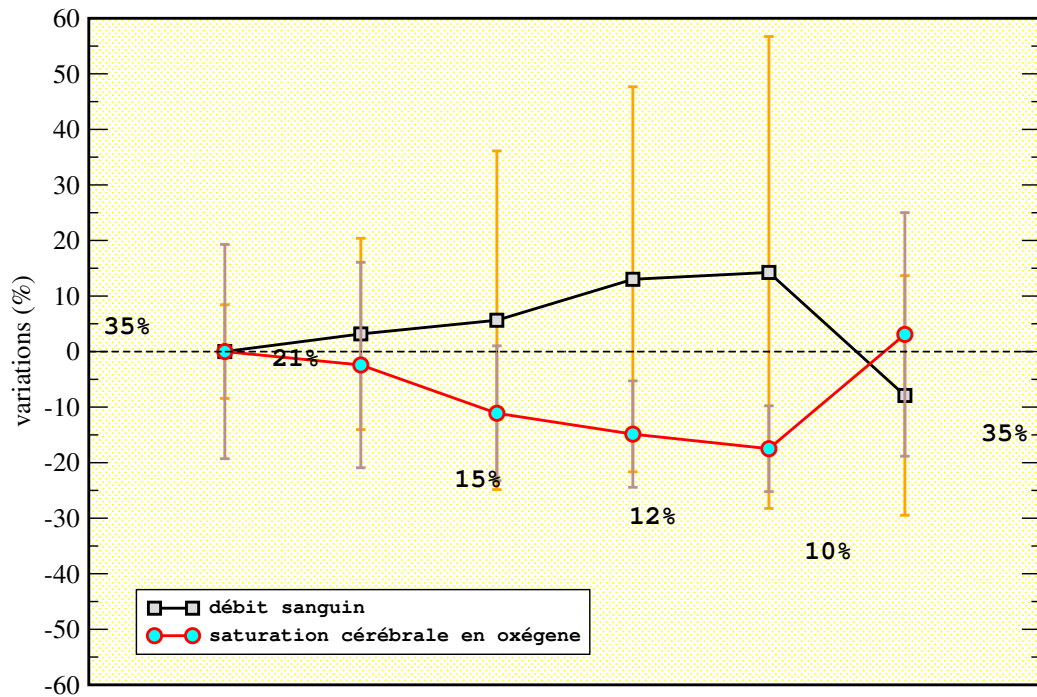


FIG. 3.8 – Les variations des valeurs moyennes du débit sanguin sur chaque palier d'oxygénation et de la saturation en oxygène. Les résultats présentés sont moyennés sur 8 rats et 16 hémisphères par rapport au palier de contrôle de 35% de FiO<sub>2</sub>.

a été observé par plusieurs chercheurs qui l'attribue au fait que l'augmentation du débit sanguin cérébral intervient dès qu'un niveau seuil d'oxygénation du sang est atteint, niveau correspondant au niveau de  $\sim 55$  mmHg de la PaO<sub>2</sub>. Dans nos expérimentations, le niveau de la PaO<sub>2</sub> a été de  $66.7 \pm 7.8$  mmHg pour FiO<sub>2</sub>=15% et  $45.6 \pm 3.1\%$  pour FiO<sub>2</sub>=12%.

### Réactions hémodynamiques à l'injection d'un bolus optique

Un moyen d'étudier l'applicabilité de la spectrométrie à fibres aiguilles et de suivre les réactions hémodynamiques cérébrales provoquées par l'injection d'un bolus optique. Nous présentons dans ce paragraphe des résultats sur l'effet de l'injection du sérum physiologique et du Bleu d'Evans sur l'hémodynamique cérébrale.

#### L'injection du sérum physiologique

L'injection du sérum physiologique dans la circulation sanguine d'un animal à comme résultat l'hémodilution du sang. La faible variation du volume des chromophores induite par la substitution

locale d'une partie des hématies par le sérum détermine une diminution temporaire de l'atténuation du rayonnement optique. Sur la figure 3.9 nous présentons des résultats que nous avons obtenu sur les variations temporelles des concentrations d'*Hb* et d'*HbO2* dans le cerveau d'un rat, variations mesurées par rapport au moment  $t = 0$ . Les résultats correspondent à l'injection de 0.2 ml de sérum physiologique à l'instant  $t \sim 9$  s.

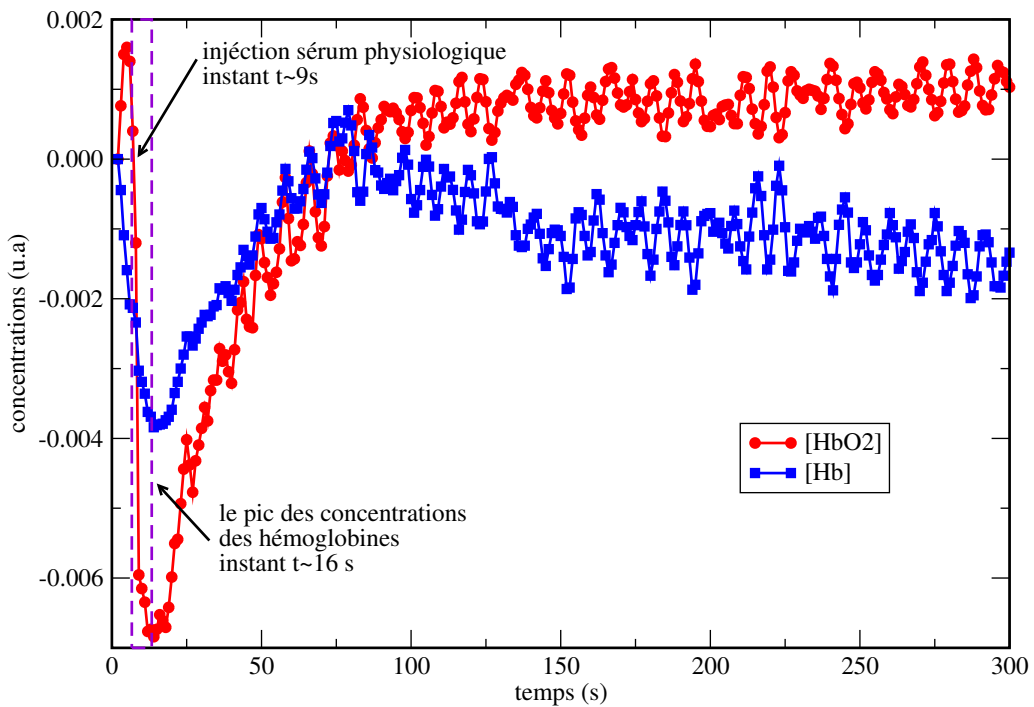


FIG. 3.9 – Les évolutions temporelles typiques des concentrations des hémoglobines après l'injection du sérum physiologique.

Premièrement, on observe l'existence d'une diminution simultanée des concentrations d'*Hb* et d'*HbO2* à quelques secondes après l'injection du sérum (6-7 seconds), d'où une baisse de la concentration en hémoglobine totale. En fait, dans le graphique de la figure l'unité pour la variation de la concentration est  $cm \cdot mM$ . En prenant une valeur de la longueur des trajectoires des photons suggérée par les simulations de Monte Carlo environ de 5 mm (figure 3.2 page 67) on peut estimer une variation maximale de la concentration en hémoglobine totale environ de  $20\mu M$ , et comme la concentration tissulaire du sang est de l'ordre à  $100\mu M$ , on peut évaluer que la variation volumique correspondant à l'hémodilution est inférieure à  $20\%^3$ .

<sup>3</sup>Calculs faits en prenant  $\alpha=1$  dans l'équation 3.3 page 70

Deuxièmement, on observe une augmentation de la saturation en oxygène après la passage du bolus ( $t \sim 80$  s) la concentration d'*Hb* diminuant et la concentration d'*HbO2* augmentant par rapport au moment précédant l'injection du sérum physiologique.

Troisièmement, on observe des fluctuations des concentrations des hémoglobines, de fréquence environ de 0.1 Hz. Ces fluctuations sont d'habitude très faibles. Cependant, parfois (voir la figure 3.9 page précédente) leur régularité est très bien mise en évidence.

On a essayé à trouver explications plausibles des fluctuations. Ainsi, nous avons pensé à un éventuel artefact du au sous-échantillonnage du signal optique : le phénomène de battement entre le rythme cardiaque d'animal ( $\sim 7$  Hz) et la fréquence d'enregistrement ( $\sim 1$  Hz) (une telle hypothèse a été suggérée aussi et dans des autres travaux [20]). D'autre part, on a pense à un possible phénomène de battement entre la fréquence d'échantillonnage et la fréquence de ventilation ( $\sim 1.5$  Hz). Des plus on a cru qu'il est possible que les mouvements respiratoires peuvent produire des déplacements des sondes optiques, d'où une possible variation de la région sondée et donc des variations apparentes des concentrations des chromophores. Cependant, il semble que ces fluctuations des concentrations des hémoglobines ont une nature physiologique. En fait plusieurs études ont été dédié à ce sujet [15],[17]. Bien que toutes ces études mettent en évidence la présence d'oscillations d'amplitude et fréquence variable selon le sujet, leur origine reste encore inexpliquée malgré un nombre important de recherches.

#### *L'injection du Bleu d'Evans*

Sur la figure 3.10 page suivante nous présentons des résultats typiques pour variations des concentrations des hémoglobines et du colorant. Dans ces graphiques, les données sont présentées par rapport au début des enregistrements. L'injection du colorant (0.2 ml à 0.4%) se fait à l'instant  $t \sim 9$  s. Ce qui est à retenir :

Tout d'abord, après approximativement 6-7 secondes de l'injection il y avait une chute des concentrations d'*HbO2* et d'*d'Hb* accompagnée d'un pic de la concentration du Bleu d'Evans et une augmentation de l'oxygénation. Un effet similaire a été pu être observé par Raphael Sablong [20]. La baisse de la concentration en hémoglobine totale montre très probablement une dilution sanguine, ce qui il était attendu et on constate une tendance de retour à la normale après l'injection. D'autre

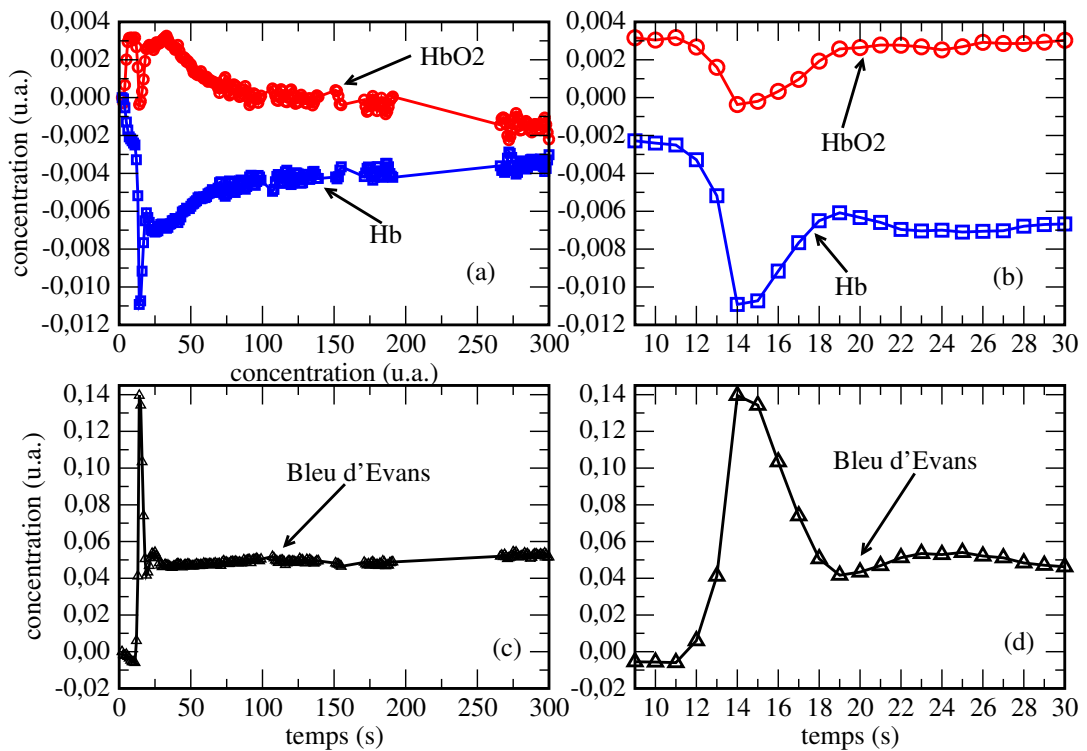


FIG. 3.10 – Les évolutions des concentrations d'HbO<sub>2</sub>, d'Hb et du Bleu d'Evans après l'injection du colorant (rat S71). Les graphiques (b) et (d) sont en fait les graphiques (a) et respectivement (c) représentées entre le moment d'injection ( $t \sim 9$  s) et l'instant  $t = 30$  s.

part la concentration du colorant reste à un niveau approximativement constant, signe qu'il s'est dispersé uniformément dans le cerveau. Cet effet est aussi attendu, parce que on sais que le Bleu d'Evans n'est pas éliminé rapidement de la circulation sanguine. On peut même évaluer la concentration du colorant dans le milieu cérébral à environ  $100 \mu\text{M}$  (on suppose toujours que la longueur moyenne des trajectoires des photons est environ de 5 mm). Ce résultat est en concordance assez bonne avec la valeur théorique de la concentration du colorant répartie dans le volume sanguine du rat ( $\sim 15$  ml) qui est environ de  $140 \mu\text{M}$ . Finalement on observe une augmentation de la saturation en oxygène du milieu, réaction hémodynamique à l'injection d'amplitude plus importante que dans le cas de l'injection du sérum physiologique.

### Dépistage d'une ischémie cérébrale

L'ischémie repose sur l'obstruction d'une artère irriguant le tissu cérébral. La conséquence de l'ischémie est l'interruption de l'alimentation des cellules cérébrales avec du sang et par conséquent un accident vasculaire cérébral peut se produire.

Afin d'étudier la sensibilité de notre système de mettre en évidence une ischémie on a obstrué une artère irriguant un hémisphère cérébral à l'aide d'une sonde introduite par la carotide. Suite à l'obstruction de l'artère le débit sanguin diminuera et nous nous attendons à en voir les effets par comparaison entre les mesures réalisées sur les deux hémisphères cérébraux. Le protocole expérimental a été différent de celui présenté dans le paragraphe 2.3.1 dans le sens que la fraction en oxygène inspirée par les animaux est maintenue constante pendant l'expérience au niveau de 21%. Dans les figures 3.11 et 3.12 nous présentons respectivement des évolutions temporelles typiques de la concentration du Bleu d'Evans (colorant injecté à l'instant  $t=0$  s) et de la saturation cérébrale en oxygène au cours d'un protocole expérimental complet au niveau des deux hémisphères cérébraux, sain et ischémié.

Premièrement, suite à l'injection du colorant il apparaît un petit décalage temporel de l'ordre à 1-2 s entre les moments d'arrivée du colorant dans les zones sondes des deux hémisphères. De plus, l'amplitude du pic de colorant est environ d'un ordre de grandeur plus grand dans l'hémisphère sain que dans l'hémisphère ischémié. Ces sont des preuves que l'ischémie s'est produite et qu'elle a été mise en évidence clairement par spectrophotométrie à sondes optiques aiguillées

Deuxièmement, les différences entre les saturations en oxygène des hémisphères sont nettement visibles. Tout au long de l'expérimentation la  $ScO_2$  dans l'hémisphère sain s'est maintenue approximativement constante ( $\sim 80\%$ ), tandis que dans l'hémisphère ischémié à  $\sim 20\%$ . Cette nette différence est aussi une la preuve de la présence de l'ischémie. Malheureusement ces différences entre les valeurs de la  $SaO_2$  des deux hémisphères n'ont pas été toujours évidentes. Des examens histologiques *post-mortem* nous ont montré cependant que l'ischémie n'a pas été toujours notable, d'où la possible pertinence de nos résultats.



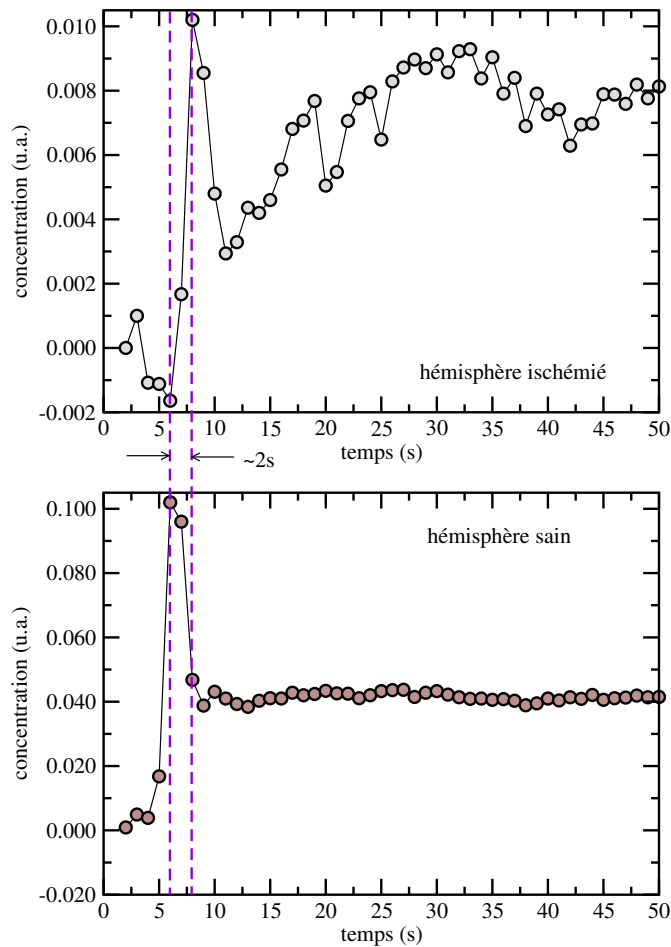


FIG. 3.11 – Les évolutions temporelles typiques de la concentration du Bleu d'Evans au niveau d'hémisphère sain et ischémié.

### Mise en évidence des enzymes respiratoires

L'étude des propriétés des enzymes respiratoires est encore un sujet d'investigations et de discussions. La raison est qu'un enregistrement continu d'état rédox des cytochromes pourrait fournir des informations sur l'état de l'oxygénation intracellulaire. Malheureusement les possibilités pratiques d'étude d'état rédox in vivo des cytochromes sont limités. La différence entre la mesure des concentrations des cytochromes et des hémoglobines est que pratiquement au long des manipulations les concentrations des cytochromes ne varient pas. Les éventuelles modifications de l'absorbance du tissu ne sont pas le résultat de la variation de la concentration des cytochromes mais d'état rédox. C'est pour cela qu'on est intéressé de savoir la différence entre les spectres

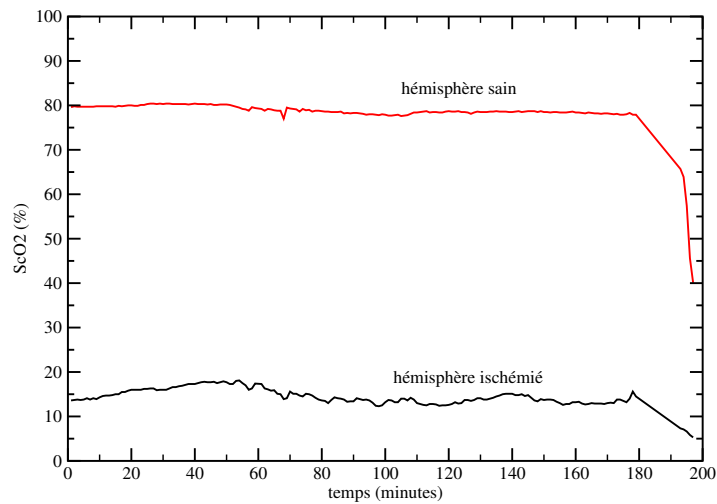


FIG. 3.12 – Valeurs typiques du taux de saturation en oxygène au niveau des deux hémisphères cérébraux. Le sacrifice des animaux est fait par l'injection d'une surdose d'anesthésiant (isoflurane) à l'instant  $t=180$  min.

des états oxydés et réduits des cytochromes n'étant pas intéressé par le spectre absolue de chaque composant.

Dans la figure 3.13 nous présentons des courbes de l'atténuation optique obtenues par expérimentation et par ajustement numérique. Les courbes expérimentaux sont ajustées par une expression de type 3.4 dans laquelle on ne tient pas compte de spectres des cytochromes. Les décalages observé entre les courbes expérimentales et ajustées peuvent être dues aux variations d'état rédox des cytochromes [4], [7], [12]. Ainsi, par comparaison avec les coefficients d'extinction des cytochromes présentés sur la figure 1.2 page 14 on peut conclure que les motifs spécifiques visibles autour de 550 et 610 nm pourraient être attribuables prépondérant aux variations d'état rédox de la cytochrome c, tandis que le motif présent à 505 nm pourrait être du aux variations d'état rédox de la cytochrome c oxydase.

En général cette mise en évidence des cytochromes a pu être faite après l'injection d'anesthésique mais aussi pendant les périodes d'hypoxémie très sévère lorsque le tissu cérébral est très faiblement oxygéné. C'est un résultat attendu, parce que dans les conditions où le tissu est oxygéné, l'absorption de la lumière due aux hémoglobines et au moins d'un ordre de grandeur plus grand que celle correspondant à l'enzyme respiratoire [3]. De plus, Hoshi et al [11] sont arrivés à la

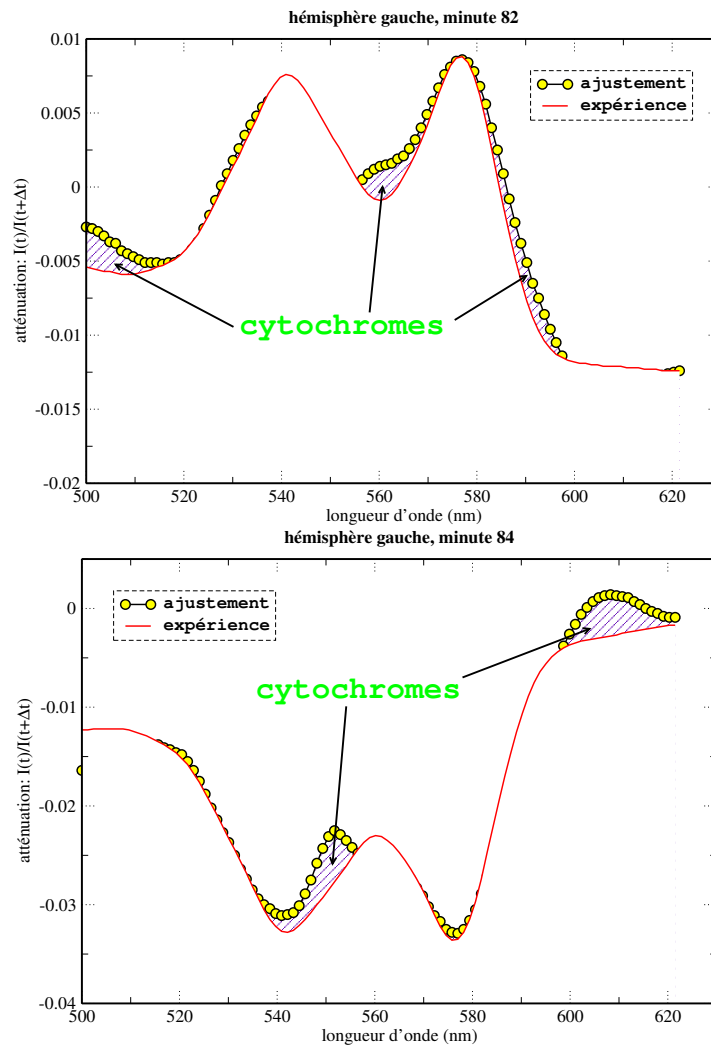


FIG. 3.13 – Décalage entre les spectres expérimentaux et obtenus par ajustement numérique prouvant la capacité du système de mettre en évidence la présence des cytochromes dans l'hémisphère droit du cerveau du rat S53 [12],[11]. La courbe présentée en haut correspond à un processus d'oxygénation du sang tandis que, en bas, les variations d'état rédox des cytochromes sont mises en évidence pendant une déoxygénation.

même conclusion par expérimentations dans la gamme du proche infrarouge.

Ces résultats montrent que notre méthode spectrométrique est suffisamment sensible pour envisager des mesures quantitatives des variations des états rédox des enzymes respiratoires.

### 3.2.3 Conclusions

Nos recherches ont été concentrées sur la mise au point d'un système spectroscopique à fibres optiques aiguilles utilisable pour l'oxymétrie locale cérébrale. Pour la mise au point du système nous avons combiné des expérimentations sur des fantômes optiques, des simulations numériques de Monte Carlo et des expérimentations in vivo dans le cerveau de rats en conditions d'hypoxémie graduée. Les principales conclusions résultant de ces études effectuées sont les suivantes :

- ✘ Pour faire de spectrophotométrie en milieu trouble à l'aide des sondes optiques aiguilles il est préférable que la longueur moyenne effective des photons dans le milieu étudié soit petite, de sorte que le milieu soit fortement diffusant. Ainsi l'atténuation du rayonnement optique ne va pas dépendre des propriétés du milieu : la valeur de l'intensité lumineuse  $I_0$  qui intervient dans la loi de Beer-Lambert ne va pas dépendre de la nature du milieu dans lequel on fait les mesures (tissu biologique ou fantôme optique).
- ✘ Dans le domaine spectral 500-620 nm nous avons confirmé le fait que la longueur de trajectoires des photons peut être considérée comme *relativement indépendante* de la longueur d'onde du rayonnement optique.
- ✘ Concernant les expérimentations in vivo où les animaux ont été soumis aux conditions d'hypoxémie progressive il faut retenir que les ajustements numériques ont été généralement très bons, ce qui prouve que les aspects théoriques et expérimentaux utilisés pour la mise en oeuvre de la méthode ont été corrects. A partir d'ici il faut souligner :

#### ASPECTS POSITIFS

- ✓ La capacité du système à mettre en évidence de façon très nette des paliers d'oxygénation correspondant au  $FiO_2$  inspiré par les animaux .
- ✓ La capacité du système à mettre en évidence des variations d'état rédox de certaines enzymes respiratoires.
- ✓ L'évolution presque symétrique des évolutions temporelles du volume sanguin cérébral mesuré par vélocimétrie laser Doppler et de la saturation en oxygène mesurée par spectrophotométrie d'absorption démontre la capacité du système de mesurer des va-

riations des cromophores avec précision satisfaisante.

- ✓ La capacité du système à mettre en évidence l'arrivée d'un bolus de colorant dans la zone cérébrale sondée, d'où la possibilité de mettre en évidence une éventuelle ischémie. En fait, à cause des variations lentes du bolus on peut même envisager la mise au point d'un système spectrométrique à sondes optiques aiguilles pour la mesure de la fonction d'entrée artérielle.

#### ASPECTS NÉGATIFS

- ✓ Ajustements numériques inexacts apparaissant de manière *aléatoire* qui ne peuvent pas être expliqués (surtout pendant les paliers pauvres en oxygène).
- ✓ Valeurs parfois complètement fausses de la saturation en oxygène, même si les ajustements numériques ont été très bons.

Bien sûr, il y a plusieurs aspects qui peuvent nous expliquer tout ces aspects négatifs : possibles hémorragies, mouvements de la sondes optiques où même de l'animal, le fait que le milieu étudié (le cerveau) a des propriétés optiques différentes des propriétés optiques du milieu modèle de référence, une variation importante probable du  $l^*$  avec la longueur d'onde et finalement *l'in-homogénéité du tissu biologique*.

Dans la figure 3.14 page suivante nous présentons les variations des concentrations des hémoglobines et du volume plasmatique déterminées respectivement par spectrophotométrie optique dans le visible et *RMN*, exprimées en pourcentages de valeurs initiales en fonction du pourcentage d'oxygène inspiré chez le rat. La comparaison indique en fait qu'il y a une sous estimation des variations des concentrations des hémoglobines. La pertinences des mesures *RMN* sont confirmées par les mesures de vélocimétrie Doppler présentés dans le paragraphe 3.2.2, en particulier par les résultats présentés sur la figure 3.7 page 78. Ainsi les mesures *LDF* montrent une variation du taux de *RBC* en mouvement entre les moments correspondants aux paliers de 35% de la *FiO2* et celui de 10% environ de 60-65%, ce qui est en très bonne corrélation avec la variation du volume sanguin cérébral mesurée par *RMN* et présentée dans la figure 3.14.

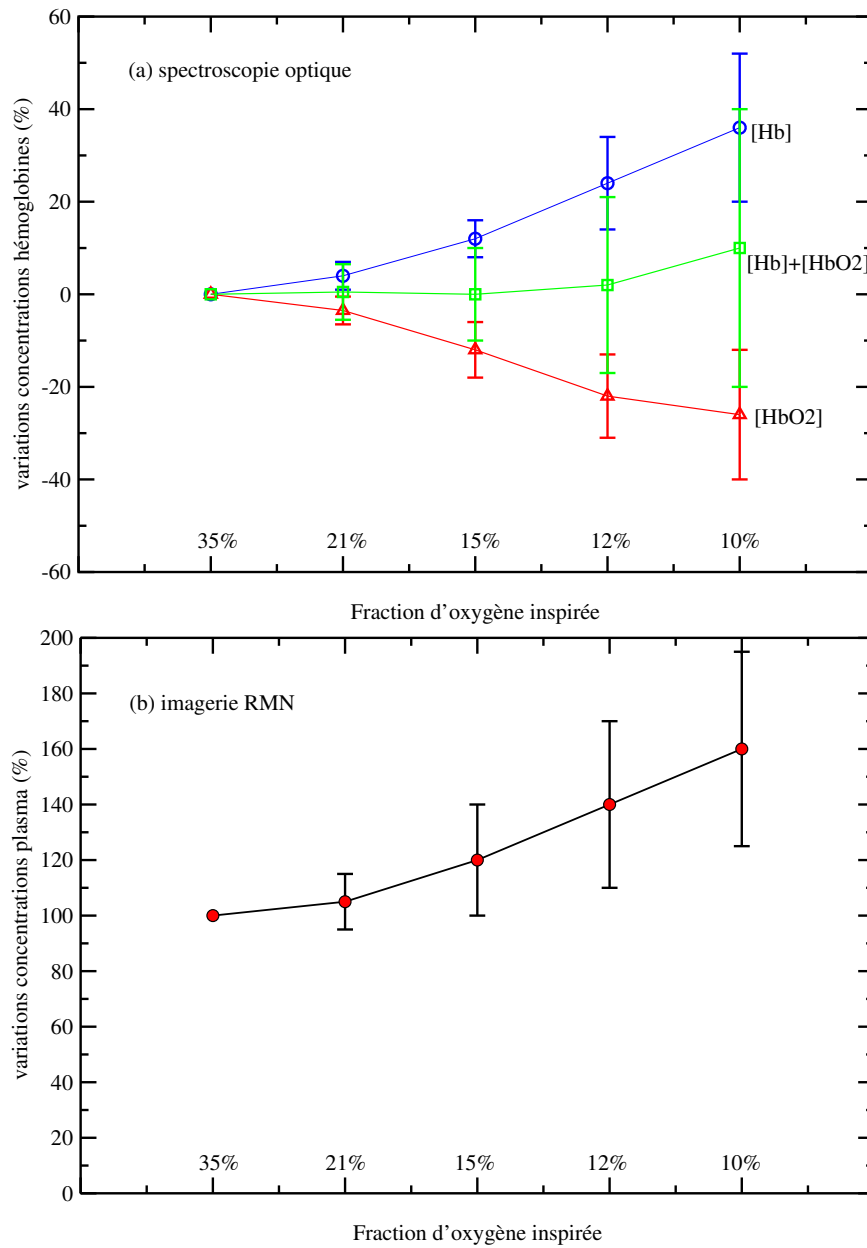


FIG. 3.14 – Variations des concentrations des hémoglobines et du volume plasmatique déterminées respectivement par spectrophotométrie optique dans le visible et RMN. Le cas (a) correspond à une moyenne des mesures spectrophotométriques pour 7 rats tandis que le cas (b) à une moyenne des mesures RMN pour 6 rats.

Comme nous pouvons le constater, les mesures spectrophotométriques nous montrent une variation de la concentration en hémoglobine totale inférieure à 10% pendant la réduction de la fraction inspirée en oxygène de 35% à 10%. Pour les mêmes conditions expérimentales, les me-

sures *RMN* nous montrent une variation du volume sanguin cérébral de 60%. Cependant les deux méthodes ne mesurent pas la même quantité : par spectrophotométrie optique on mesure la concentration des hémoglobines, tandis que par *RMN* on mesure le volume plasmatique dans lequel un produit de contraste est dispersé.

La différence entre les deux mesures pourrait être expliquée si le taux d'hématocrite baissait approximativement de 30%, ce qui semble improbable. Cela veut dire qu'il y a un autre élément qui peut fausser nos résultats : peut être la localisation de l'absorbance optique dans les vaisseaux sanguins.

Dans l'analyse spectroscopique effectuée on a supposé que l'hémoglobine est dispersée de manière homogène dans les tissus. Cependant elle est localisée dans les vaisseaux sanguins où l'absorbance optique est très forte. Ainsi, l'atténuation du rayonnement optique à 550 nm par un vaisseau sanguin ayant un diamètre de 100  $\mu\text{m}$  est de 95%, et encore de 25% pour un diamètre de 10  $\mu\text{m}$ . Cela nous montre qu'à cause de cet effet il est possible que la spectroscopie d'absorption dans le domaine visible sous estime très fortement le volume sanguin cérébral.

Tenant compte des choses présentées ainsi que des aspects suggérés et par d'autres auteurs ([14], [8], [10]) il est apparu utile d'étudier les effets du confinement de l'absorbance sur les mesures spectrophotométriques en milieu diffusant. Le paragraphe suivant est entièrement dédié à ce problème.

### 3.3 Spectrométrie en milieux diffusants en conditions d'une distribution non homogène des chromophores

Pour préciser l'effet de la localisation de l'absorbance sur les spectres d'absorption de la lumière retrodiffusée par les milieux diffusants nous étudierons la dépendance de l'atténuation lumineuse avec le coefficient d'absorption effectif du milieu dans les conditions où les chromophores sont localisés en compartiments cylindriques.

#### 3.3.1 Configuration expérimentale et méthode de travail

On se reportera à la figure 2.1 page 34 pour une illustration du dispositif expérimental.

##### *Les milieux modèles*

Nous avons préparé trois types d'échantillons. Le premier contenait une suspension de billes de polystyrène (diamètre 435 nm), non absorbante dans le domaine spectral visible, de concentration 0.24% ( $l^*=1.2$  mm). Le deuxième contenait des suspensions de billes de polystyrène et de fil de polyamide. La quantité de fil a été calculée de sorte qu'on a préparé trois échantillons caractérisés par des fractions volumiques occupées par le fil de 0.0255, 0.0497 et respectivement 0.0947. Finalement, le troisième type d'échantillons contenait des suspensions de billes de polystyrène dans des solutions de Bleu d'Evans de façon que le coefficient d'absorption du Bleu d'Evans dans l'échantillon à la longueur d'onde de 635 nm soit égal aux valeurs du coefficient d'absorption effectif des échantillons d'absorbance compartimentée présentés auparavant, à la même longueur d'onde. Chacun des échantillons sont mis dans des tubes cylindriques de diamètre de 10 mm et hauteur 50 mm. Le volume occupé par chacun d'échantillons est d'environ 3 ml.

##### *Les sondes optiques*

Nous avons préparé quatre types de sondes optiques, chacune étant fabriquée de fibres optiques de diamètre 200  $\mu\text{m}$  écartées à 0.2, 1, 2 et 3 mm. Les sondes sont placées au centre d'échantillon. Pour chacun d'échantillons nous avons mesuré l'atténuation du rayonnement optique définie par



$\log[I_0(\lambda)/I(\lambda)]$  où  $I_0(\lambda)$  et  $I(\lambda)$  sont respectivement l'intensité lumineuse retroréfléchiée par la suspension non-absorbante et l'intensité mesurée quand la sonde optique est plongée dans le milieu à la fois absorbant et diffusant et on l'a représenté graphiquement en fonction des coefficients d'absorption effectifs des milieux. La variation du coefficient d'absorption est faite en variant la longueur d'onde entre 635 et 760 nm.

### 3.3.2 Résultats expérimentaux

Les dépendances de l'atténuation lumineuse avec les coefficients d'absorption effectifs des milieux sont présentés dans les figures 3.15 et 3.16.

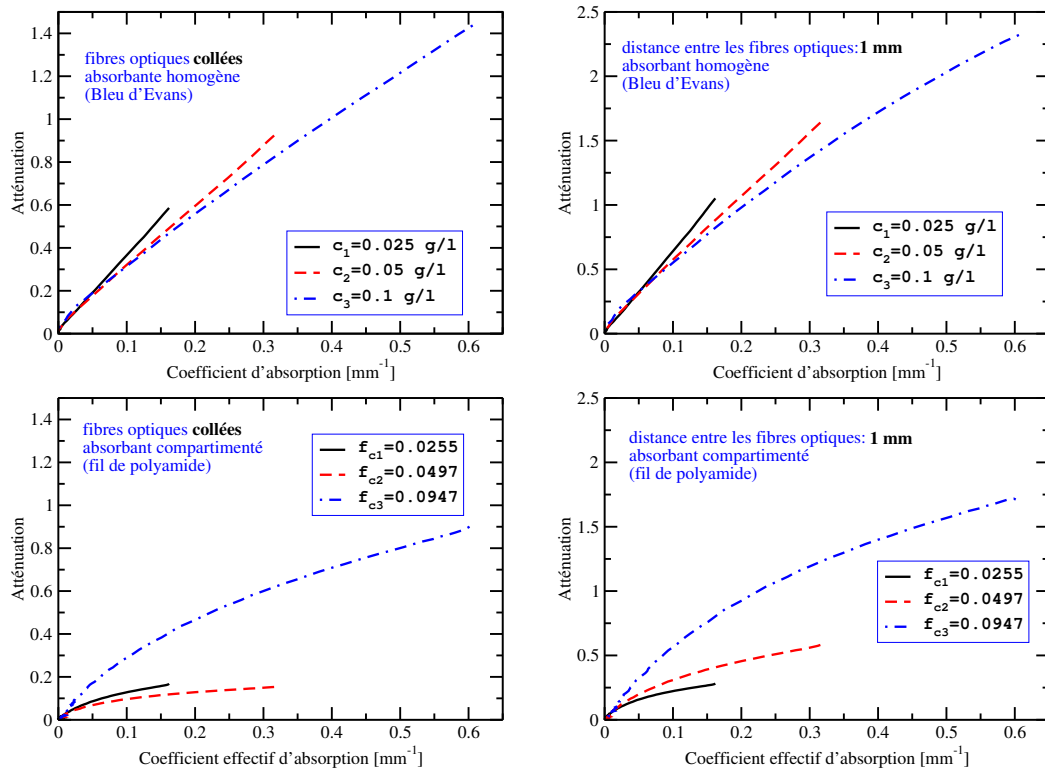


FIG. 3.15 – L'atténuation du rayonnement optique en fonction du coefficient d'absorption dans le cas où l'absorbant est dispersé homogène or non homogène pour une distance entre les fibres optique de 0.2 mm (c'est-à-dire fibres collées, à gauche) et 1 mm (à droite)

Premièrement, même si sur les figures il apparaît que pour un coefficient de absorption effectif du milieu nul nous avons une atténuation nulle, cependant en réalité l'atténuation n'est pas zéro existant un décalage typique de 0.2-0.4 probablement du au processus de fabrication des fantômes.

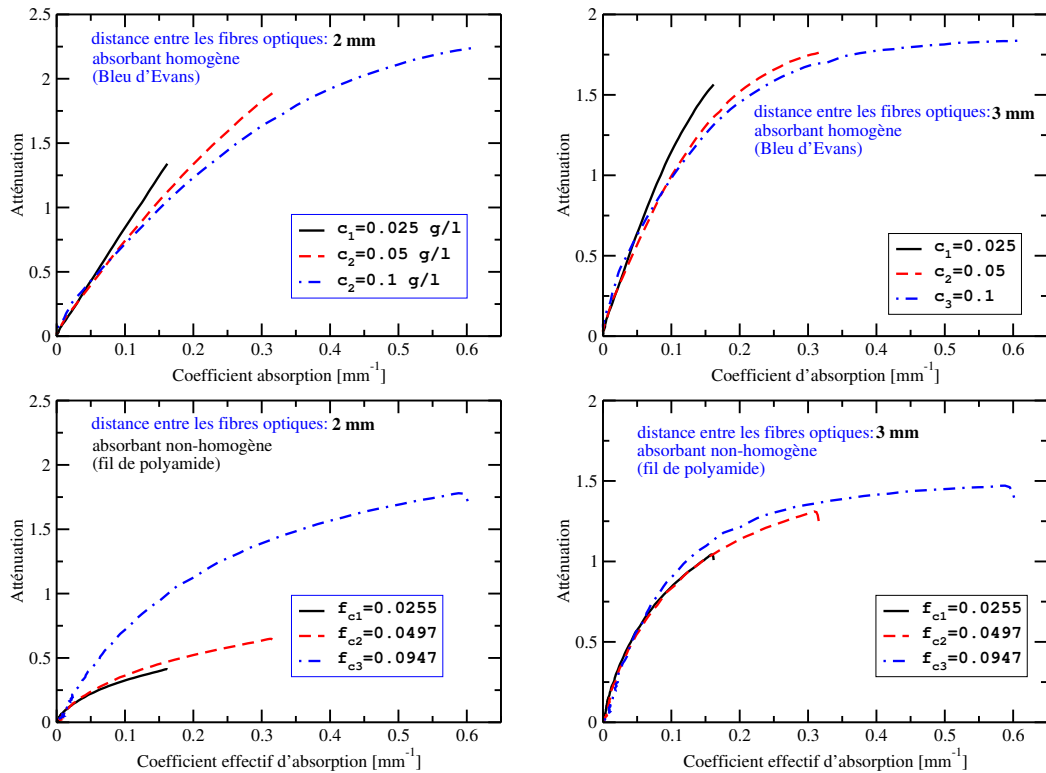


FIG. 3.16 – L'atténuation du rayonnement optique en fonction du coefficient d'absorption dans le cas où l'absorbant est dispersé homogène or non homogène pour une distance entre les fibres optique de 2 mm (à gauche) et 3 mm (à droite)

Néanmoins, dans le cas des échantillons avec de Bleu d'Evans c'est difficile de comprendre pourquoi l'atténuation n'est pas nulle. Des possibles phénomènes d'agrégation où de désagrégation des billes induits par le Bleu d'Evans pourraient être une explication faisable. Nous avons soustrait ce décalage de sorte que l'atténuation soit zéro pour  $\mu_a^{eff}(\lambda = 760nm) = 0$ .

Deuxièmement, dans le cas de la distribution homogène, on observe l'existence d'une dépendance linéaire entre l'atténuation et le coefficient d'absorption effectif du milieu en nous confirmant les résultats précédents présentés dans le paragraphe 3.1.2. Ces dépendances linéaires nous permettent d'estimer des longueurs des trajectoires des photons de 3, 5, 7 et 9 mm correspondant aux quatre distance de séparation source-détecteur. Cependant, l'atténuation semble d'être un peu plus grande pour les petites concentrations de l'absorbant. Nous expliquons cela par le fait que sur le domaine spectral 635-760 nm les calculs de Mie montrent une augmentation du  $l^*$  avec la longueur d'onde, d'où une décroissance du  $\bar{L}$  avec l'augmentation de  $\lambda$  et donc une atténuation

plus forte pour les petites longueurs d'onde. Conformément à la première section du chapitre, dans le cas d'une séparation entre les fibres optiques de 0.2 mm, la linéarité entre  $A$  et  $\mu_a^{eff}$  est valable pour  $\mu_a^{eff} < 0.83\text{mm}^{-1}$ . Nos expérimentations la confirme. Cependant, pour les larges distances de séparation la perturbation forte de la statistique des photons intervient pour des valeurs du coefficient d'absorption effectif du milieu inférieures à  $0.83\text{mm}^{-1}$  ( $\mu_a^{eff} = 0.20\text{mm}^{-1}$  pour  $r_{sd} = 2\text{mm}$  et  $\mu_a^{eff} = 0.15\text{mm}^{-1}$  pour  $r_{sd} = 3\text{mm}$ ). La raison est la croissance de  $\bar{L}$  avec  $r_{sd}$ . De plus, on peut mettre en évidence un désaccord entre les valeurs des atténuation dans la situation des fibres collées avec celles de la figure 3.1 page 65 (les résultats des expérimentations présentés dans le paragraphe courant montrent d'une part des valeurs plus grandes de l'atténuation lumineuse pour les petites longueurs d'onde et d'autre part une dépendance de l'atténuation lumineuse avec le coefficient d'absorption bien linéaire). Ce désaccord nous suggère à mettre en cause la non reproductibilité des fantômes optiques.

Troisièmement, dans le cas où l'absorbant est confiné en cylindres la situation est complètement différente : l'atténuation est plus faible que dans le cas homogène. Cela est la preuve que *la spectrophotométrie d'absorption sous estime fortement les concentrations des espèces absorbantes lorsque les dernières sont compartimentées*. En fait, cette sous estimation est plus forte que les graphiques la montre. Justifions cela par le fait que la longueur effective des trajectoires des photons  $l^*$  caractérisant la suspension d'absorbance localisée est supérieure à celle de la suspension ayant l'absorbance distribuée de manière homogène. Ainsi, la diminution de  $l^*$  induite par la présence du fil de polyamide à concentration élevée (conformément à la figure 2.11 page 48) fait que l'atténuation de la lumière soit plus élevée par rapport à la situation où  $l^*$  resterait le même. Les atténuations mesurés avec fil sont donc des valeurs sous estimées par rapport à une situation où les fils ne contribueraient qu'à l'absorption et pas du tout à la diffusion.

Quatrièmement, lorsque l'absorbant est confiné la dépendance de l'atténuation lumineuse du coefficient d'absorption effectif n'est linéaire que pour des valeurs de  $\mu_a^{eff}$  bien inférieures au cas homogène. En fait, on peut estimer que pour une distance de séparation entre les fibres optiques  $r_{sd}=0.2$  mm la dépendance entre  $A$  et  $\mu_a^{eff}$  est linéaire pour des valeurs du coefficient d'absorption effectif du milieu inférieures à  $0.067\text{mm}^{-1}$  (le cas de la suspension contenant la plus grande

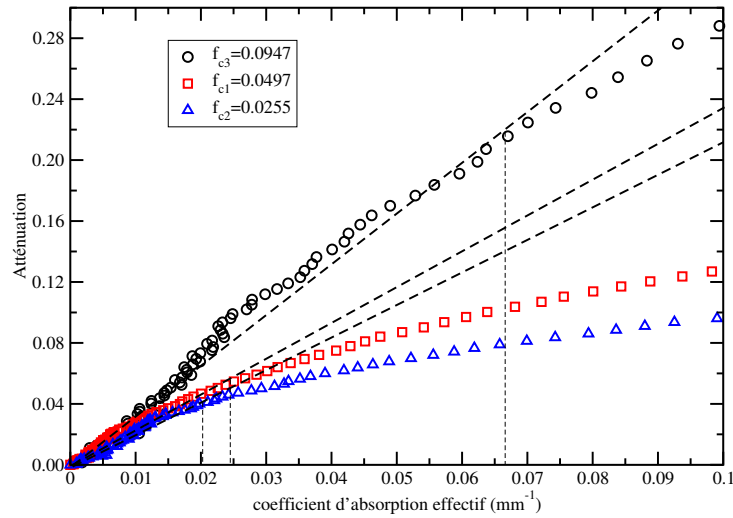


FIG. 3.17 – L'atténuation de la lumière en fonction du coefficient d'absorption effectif du milieu, dans une situation où l'absorbance est confinée et à une géométrie expérimentale à fibres optiques collées. Agrandissement de la figure 3.15

concentration de fil de polyamide, voir la figure 3.17).

Cela nous conduit à la conclusion que pour :

$$\mu_a^c \cdot r < 0.035 \quad (3.5)$$

le comportement du milieu faudrait être identique au milieu d'absorbance distribuée de manière homogène. Ce résultat est complémentaire aux résultats obtenus de Firbank et al [8] qui arrivent à la même conclusion pour des séparations entre la source et le détecteur grandes ( $r_{sd} > 8$  mm).

En nous rapportant au cas du cerveau, la condition 3.5 montre que dans le domaine spectral 500-620 nm la spectrophotométrie à fibres optiques aiguilles permet des études faisables d'hémodynamique cérébrale seulement pour des diamètres des vaisseaux sanguins inférieures à  $2 \mu\text{m}^4$ . Par ailleurs, la spectrométrie à fibres aiguilles va très fortement sous estimer les concentrations des hémoglobines quand celles-ci sont localisées. Néanmoins, il est possible que les variations des concentrations des hémoglobines soient moins sensibles à cet effet.

Afin de confirmer nos conclusions issues des expériences nous complétons les études de spectrométrie en milieu d'absorbance localisée avec des résultats obtenus par simulations numériques

<sup>4</sup>Calcul fait considérant que  $\mu_a^{sang} = 28.5 \text{ mm}^{-1}$  à 540 nm

de Monte Carlo.

### 3.3.3 Simulations de Monte Carlo en conditions d'absorbance localisée

Les dépendances de l'atténuation lumineuse du coefficient d'absorption effectif du milieu dans les cas d'une distribution homogène et respectivement non homogène des chromophores issues des simulations numériques de Monte Carlo dans les conditions d'une géométrie expérimentale à fibres aiguilles sont présentées dans la figure 3.18. Dans le cas non homogène, dans la définition de l'atténuation lumineuse  $A = \log(I_0(\lambda)/I(\lambda))$ ,  $I_0(\lambda)$  tient compte de la contribution au signal mesuré de la diffusion sur les cylindres. C'est pour cela que les coefficients de diffusion intervenant dans les simulations correspondant au cas homogène sont calculés de sorte que ils soient égaux aux coefficients de diffusion des milieux d'absorbance compartimentée.

Premièrement, dans le cas homogène, on observe qu'on retrouve la dépendance linéaire entre l'atténuation lumineuse et le coefficient d'absorption du milieu. Cependant l'atténuation semble d'être plus petite pour les concentrations faibles de l'absorbant. Nous expliquons cela par le fait que les trois dépendances correspondent à des suspensions caractérisées par différentes propriétés de diffusion (la solution possédant la plus forte concentration de l'absorbant est caractérisée par la valeur la plus grande du coefficient de diffusion  $\mu_s$ ).

Deuxièmement, dans le cas de l'absorbance localisée, *les simulations de Monte Carlo confirment la sous estimation de l'atténuation lumineuse*. Cependant, pour les très faibles valeurs des coefficients d'absorption effectifs, il semble qu'il y a une sur estimation des concentrations. Cette chose peut être due au fait que l'atténuation est très sensible à la fonction de phase utilisée dans les simulations.

Troisièmement, on confirme que la linéarité entre  $A$  et  $\mu_a^{eff}$  a lieu seulement pour les petites valeurs du  $\mu_a^{eff}$ . Cette chose apparaît plus évident dans la figure 3.19 où on présente la dépendance de la longueur moyenne des trajectoires des photons fonction de la longueur d'onde pour les trois fraction volumiques occupées par les cylindres absorbants. Comme pour  $\lambda > 700$  nm  $\bar{L}$  n'est pas très sensible de la longueur d'onde, on peut estimer que le milieu d'absorbance localisée va se comporter comme un milieu homogène si  $\mu_a^c \cdot r < 0.015$ .

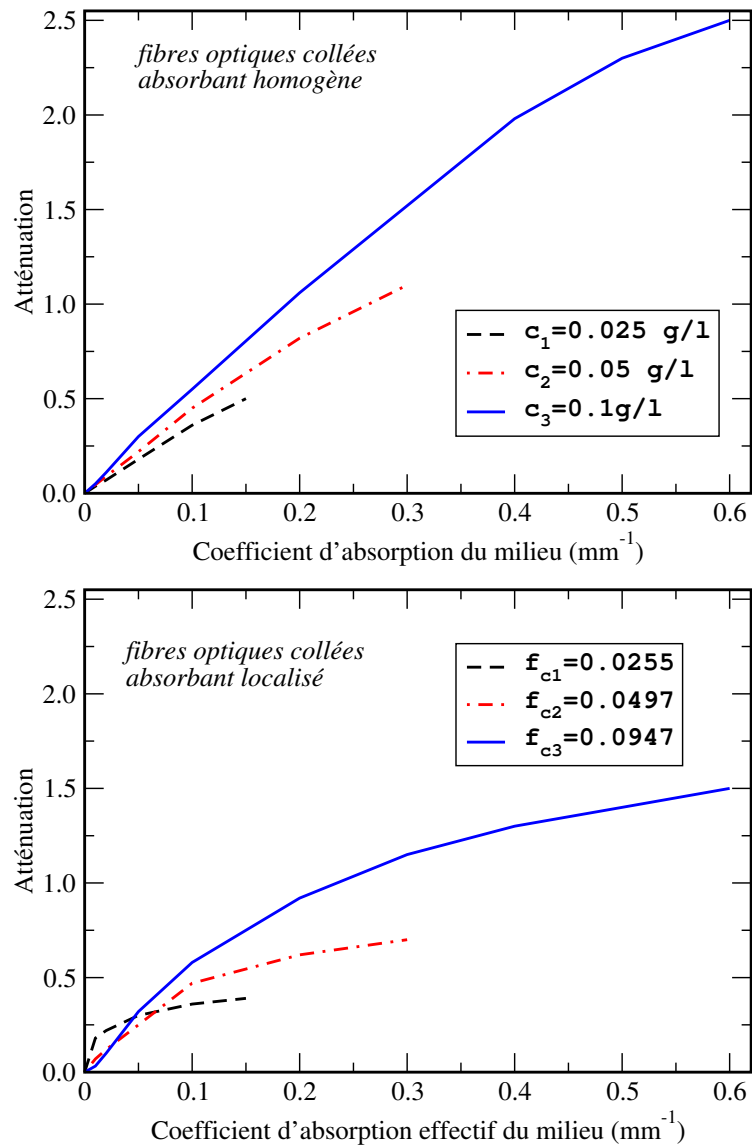


FIG. 3.18 – Résultats des simulations numériques de Monte Carlo. Atténuation du rayonnement optique vs le coefficient d'absorption effectif du milieu pour une distribution homogène et respectivement localisée de l'absorbant.

Quatrièmement, les courbes de la figure 3.20 suggèrent un effet attendu :  $\bar{L}$  ne dépend pas du coefficient d'absorption pour les grandes valeurs de ceci. Cet effet, très évidente pour le cas de la suspension ayant la plus grande fraction occupée par les cylindres peut être expliqué par le fait que au détecteur n'arrive que des photons qui ne croisent pas des cylindres.

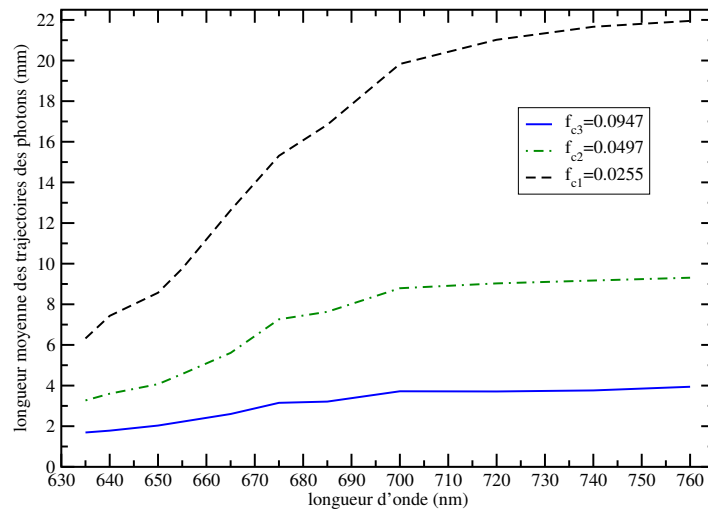


FIG. 3.19 – Résultats des simulations numériques de Monte Carlo. Les longueurs moyennes des trajectoires des photons vs la longueur d'onde. Les trois courbes correspondes aux trois fractions volumiques occupées par les cylindres.

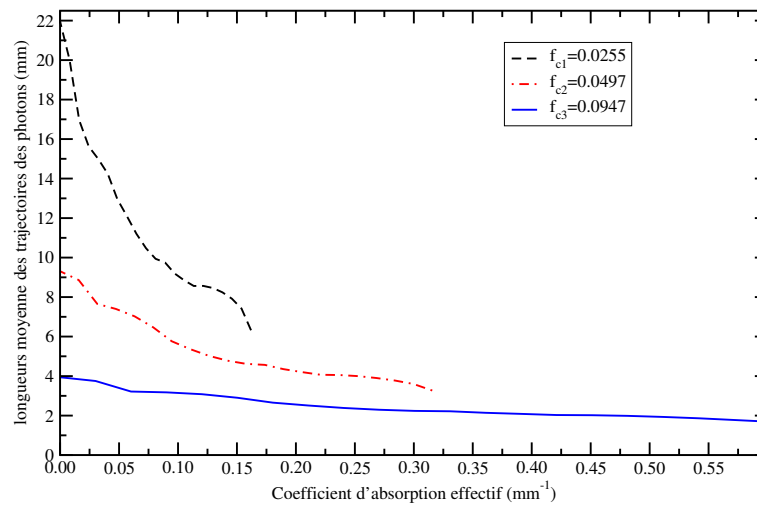


FIG. 3.20 – Résultats des simulations numériques de Monte Carlo. Les longueurs moyennes des trajectoires des photons vs le coefficient d'absorption effectif du milieu. Les trois courbes correspondes aux trois fractions volumiques occupées par les cylindres.

### 3.3.4 L'effet d'utilisation d'un facteur correctif

Le but de ce paragraphe est d'essayer de répondre à la question : *en quelle mesure la quantification de la différence entre le coefficient d'absorption du sang distribué de manière homogène et celui du cas compartimenté conduit à des résultats faisable pour la saturation cérébrale en*

oxygène ?.

Le modèle théorique proposé de Sterenborg et Verkruyse ainsi que leur résultats expérimentaux [21],[22] suggèrent que dans le domaine spectral 500-620 nm, la correction du coefficient d'absorption effectif conformément à la relation 1.26 page 21 faudrait nous conduire à un rapprochement des valeurs de l'atténuation lumineuse de celles réelles. Afin de préciser l'effet de la correction sur les valeurs de la saturation cérébrales en oxygène trouvées par spectrométrie à fibres optiques aiguilles nous avons extrait les valeurs de la  $ScO_2$  de l'ajustement numérique des courbes expérimentales de la forme :

$$\log \left( \frac{I_0(\lambda_i, t)}{I(\lambda_i, t)} \right) = [c_{Hb}(t)c_{Hb}(\lambda_i) + c_{HbO_2}(t)c_{HbO_2}(\lambda_i)] \times K \times \frac{1 - e^{-2\mu_a^{sang}(\lambda_i)R}}{2\mu_a^{sang}(\lambda_i)R} + B \quad (3.6)$$

où les significations des paramètres  $K$  et  $B$  sont celles présentées dans le paragraphe 3.2.1, le coefficient d'absorption du sang  $\mu_a^{sang}(\lambda)$  est calculé à l'aide de la relation 1.27 page 21 et  $R$  est le rayon moyen des vaisseaux sanguins. Dans la figure 3.21 nous présentons quelques exemples issues de l'ajustement numériques des courbes de l'atténuation lumineuse à l'aide de la relation 3.6 et dans la figure 3.22 l'évolution de la  $ScO_2$  au cours d'une hypoxémie progressive dans les conditions où les valeurs du coefficient d'absorption effectif sont corrigés où non.

Dans une grande partie des cas l'application du facteur correctif conduit à des meilleurs ajustements numériques ( $\chi^2$  plus petit) et comme le diamètre moyen des vaisseaux sanguins figure parmi les paramètre ajustables on a pu déduire ses valeurs. Ainsi les meilleurs ajustements sont obtenus pour des diamètres moyens des vaisseaux de quelques dixièmes de  $\mu m$ .

La figure 3.22 prouve que la correction peut améliorer parfois sans doute les données. Les paliers d'oxygénation deviennent plus nets cet effet étant plus visible surtout au niveau des paliers appauvris en oxygène. Sur ces paliers la saturation cérébrale en oxygène est corrigée avec des pourcentages de 15-20% tandis que, à la mort d'animal la correction conduit à une baisse de la  $ScO_2$  pratiquement à zéro.

Malheureusement c'est n'est pas toujours le cas. Parfois l'amélioration des ajustements numériques au cours du protocole expérimental est possible par la variation de la valeur du diamètre moyenne



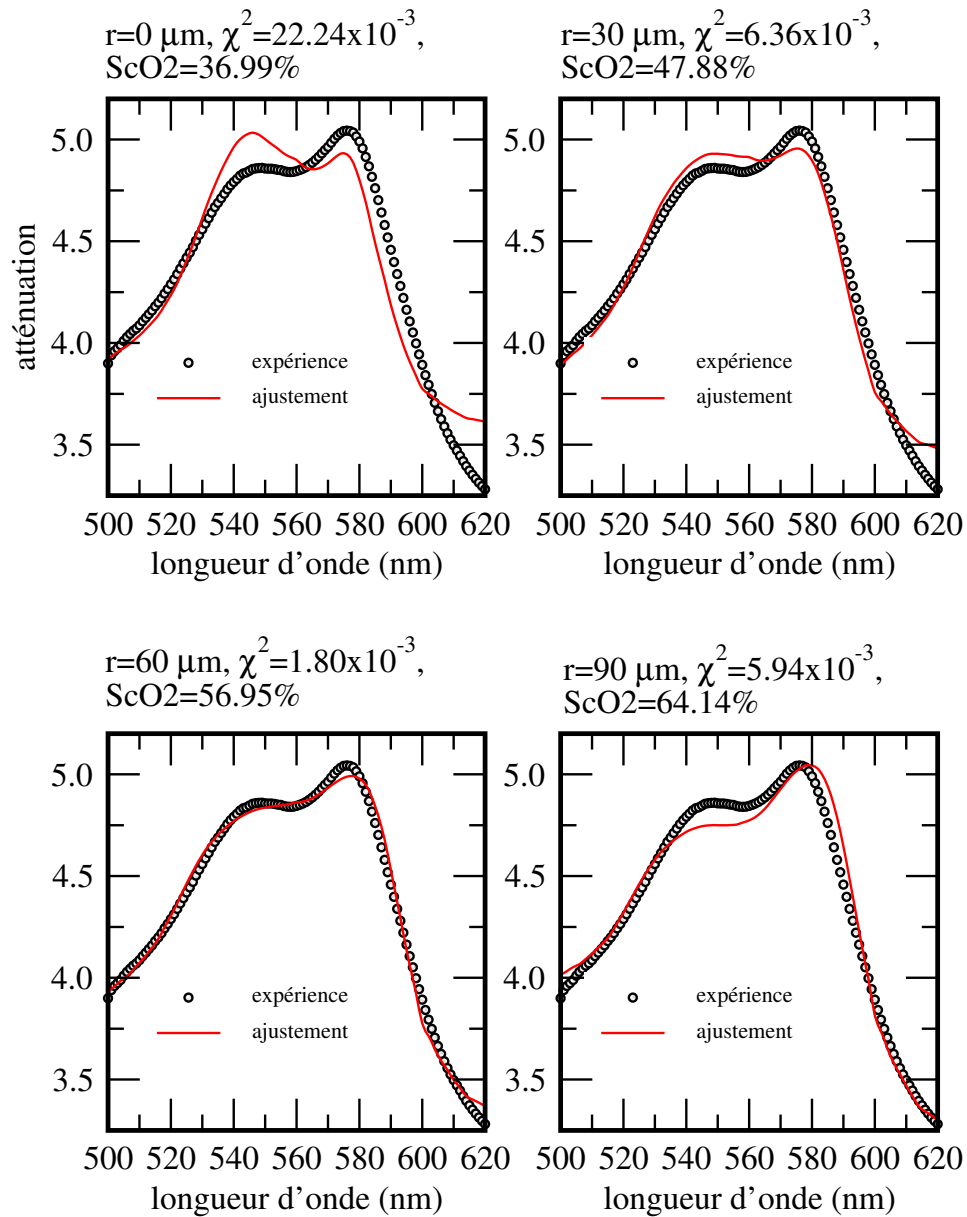


FIG. 3.21 – Exemple de correction de l'atténuation lumineuse en utilisant de différentes valeurs du rayon des vaisseaux sanguins.

des vaisseaux sanguins tandis que en certains cas c'est impossible d'améliorer la qualité des ajustements. Ces résultats peuvent être expliqués par des possibles mouvements des sondes optiques durant le protocole expérimentale soit par le fait que le modèle proposé par Sterenborg et Verkruysse a ses limites.

Des résultats statistiques sur plusieurs animaux nous conduisent à la conclusion que la cor-

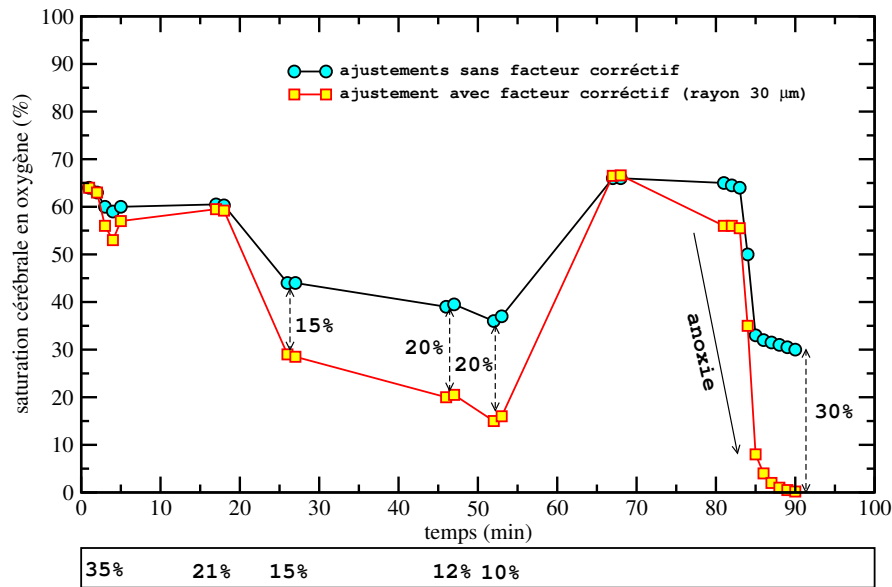


FIG. 3.22 – Les valeurs de la saturation en oxygène corrigé et non corrigées au cours d'une hypoxémie progressive.

rection des données expérimentales suivant la suggestion de Sterenborg et Verkruysse a comme résultat l'amélioration des valeurs des paramètres hémodynamiques dans une manière insignifiante, la variation en hémoglobine totale obtenue par la variation de la fraction inspirée en oxygène restant toujours après la correction de l'ordre à 10% (conformément à la figure 3.14 page 89).

### 3.3.5 Conclusions

La principale conclusion résultant des études de spectrométrie en milieux d'absorbance localisée est que dans le domaine visible la spectroscopie d'absorption à sondes optiques aiguilles va toujours sous estimer les valeurs du coefficient d'absorption et implicitement le volume sanguin existant dans la zone explorée, conclusion soutenue aussi par des simulations numériques de Monte Carlo. Afin de diminuer l'effet de la compartimentation sanguine il est recommandable à utiliser le rayonnement optique du domaine proche infrarouge, où le coefficient d'absorption du sang est environ de 50 fois plus faible que dans le domaine spectral visible.

Finalement, on conclue que probablement à cause de l'applicabilité restreinte des modèles théoriques, les possibilités de quantification de la différence entre les coefficients effectifs d'ab-

sorption caractérisant respectivement le milieu d'absorbance distribuée de manière homogène et localisée sont limitées.

### 3.4 Conclusions

Dans ce chapitre, essentiellement expérimental, nous avons étudié la potentialité de la spectrométrie à fibres optiques aiguilles de mesurer localement, des paramètres physiologiques d'intérêt ainsi que la saturation cérébrale en oxygène et la concentration de l'hémoglobine au cours d'une hypoxémie progressive, *in vivo*, chez le rat. La technique proposée semble fournir des résultats fiables des variations temporelles des paramètres physiologiques rappelés auparavant et suffisamment sensible pour distinguer des différents effets hémodynamiques ainsi que le passage d'un bolus optique, la mise en évidence d'une ischémie ou pour mettre en évidence les variations d'état rédox des enzymes respiratoires.

Nous nous avons également concentré l'attention sur l'impact du confinement du sang sur la prédiction correcte du coefficient d'absorption du tissu cérébral prouvant par expérimentations et aussi par simulations numériques de Monte Carlo que dans le domaine spectral visible ceci est sous estimé par la spectrométrie à fibres optiques aiguilles.

Bien que la mise au point de la technique n'est pas encore finie, même dans cet état de son développement, elle peut être utilisée pour l'exploration invasive des tissus cérébraux profonds, constituant une technique complémentaire et compatible avec l'imagerie RMN, en offrant, malgré à sa infériorité, portabilité et un coût qui la rendre aisément utilisable en divers environnements scientifiques.

## Bibliographie

- [1] A. Bradu and J. Derouard. Spectrophotometry in turbid media using small optical fiber probes. *OSA Technical Digest*, pages 430–432, 1999.
- [2] W.F. Cheong, S.A. Prahl, and A.J. Welch. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE J.Quantum Electronics*, 26 :2166–2185, 1993.
- [3] M. Cope. *The developement of a near infrared spectroscopy system and its application for non invasive monitoring of cerebral blood and tissue oxygenation in the newborn infant*. PhD thesis, University of London, 1991.
- [4] M. Cope, D.T. Delpy, S. Wray, and J.S. Wyatt amd E.O.R. Raynolds. A ccd spectrophotometer to quantitate the concentration of water at 975 nm. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 248 :33–46, 1989.
- [5] Cecile Dolbec. *Réactivité cérébrovasculaire à l'hypoxémie : applications à un modèle de tumeur intracérébrale chez le rat*. PhD thesis, Université Joseph Fourier Grenoble I, 2001.
- [6] J. Farjanel, C. Denis, J.C. Chatard, and A. Geysant. An accurate method of plasma volume measurement by direct analysis of evans blue spectra in plasma without dye extraction : origins of albumin-space variations during maximal exercise. *Eur.J.Appl.Physiol.*, 75 :75–82, 1997.
- [7] M. Ferrari, D.F. Hanley, D.A. Wilson, and R.J. Traystman. Redox changes in cat brain cytochrome oxidase after blood-fluorocarbon exchange. *Am.J.Physiol.*, 258 :1706–1713, 1990.
- [8] M. Firbank, E. Okada, and T. Delpy. Investigation of the effect of discrete absorbers upon the measurement of blood volume with near infrared spectroscopy. *Phys.Med.Biol.*, 42 :465–477, 1997.
- [9] Veronica Hollis. *Non-Invasive Monitoring of Brain Tissue Temperature by Near-Infrared Spectroscopy*. PhD thesis, University College London, 2002.

- [10] K. Honjyo and E. Okada. The contribution of blood oxygenation changes in the capillary bed and a small blood vessel on the brain surface to nirs signals. *OSA Technical Digest*, pages 289–231, 2000.
- [11] Y. Hoshi, O. Hazeki, Y. Kakihana, and M. Tamura. Redox behavior of cytochrome oxidase in the rat brain measured by near infrared spectroscopy. *J.Am.Physiol.*, 161 :1842–1848, 1997.
- [12] F.F. Jobsis. Reflectance spectrophotometry of cytochrome aa3 in vivo. *J.Appl.Physiol.*, 43 :858–872, 1977.
- [13] M. Kohl, U. Lindauer, U. Dirnagl, and A. Villringer. Investigation of cortical spreading depression in rats by near infrared spectroscopy : scattering and oxygenation changes. *Advances in Optical Imaging and Photon Migration (OSA Washington DC)*, 21 :240–244, 1998.
- [14] H. Liu, A.H. Hielsher, S.L. Jacques, and F.K. Kittel. Influence of blood vessels on the measurement of hemoglobin oxygenation as determined by time reflectance spectrophotometrie. *Med.Phys.*, 22 :1209–1217, 1995.
- [15] J.E. Mayhew, S. Askew, Y. Zheng, J. Porrill, G.W. Westby, P. Redgrave, D.M. Rector, and R.M. Harper. Cerebral vasomotion : a 0.1hz oscillation in reflected light imaging of neural activity. *NeuroImage*, 4, 1996.
- [16] R. Migita, A. Gonzales, M.L. Gonzales, K.D. Vandegriff, and R.M. Winslow. Blood volume and cardiac index in rats after exchange transfusion with hemoglobin-based oxygen carriers. *J.Am.Physiol.*, 97 :1995–2002, 1997.
- [17] H. Obrig, M. Neufang, R. Wenzel, M. Kohl, J. Steinbrink, K. Einhaupl, and A. Villringer. Spontaneous low frequency oscillations of cerebral hemodynamics and metabolism in human adults. *NeuroImage*, 12, 2000.
- [18] OMLC. <http://omlc.ogi.edu>. Technical report, OMLC, 2001.
- [19] S.A. Prahl. *Light Transport in Tissue*. PhD thesis, University of Texas at Austin, 1988.

- 
- [20] Raphael Sablong. *Méthodes optiques pour l'exploration fonctionnelle du cerveau*. PhD thesis, Université Joseph Fourier Grenoble I, 2002.
- [21] R.L.P.van Vee and H.J.C.M. Sterenborg. Correction for inhomogeneously distributed absorbers in spatially resolved diffuse reflectance spectroscopy. *Proc.SPIE*, 4431 :192–194, 2001.
- [22] W. Verkrusse, G.W. Lucassen, J.F. deBoer, D.J. Smithies, J.S. Nelson, and M.J.C. vanGemert. Influence of blood vessels on the measurement of hemoglobin oxygenation as determined by time reflectance spectroscopy. *Med.Phys.*, 22 :1209–1217, 1995.

---

Tomographie Optique Cohérente. Principes théoriques

---

**Sommaire**

---

<b>4.1</b>	<b>Introduction</b>	<b>107</b>
<b>4.2</b>	<b>Interférométrie à sources lumineuses de faible cohérence</b>	<b>108</b>
4.2.1	Calcul de l'intensité lumineuse détectée	108
4.2.2	La visibilité des franges d'interférence	111
4.2.3	Le signal OCT	113
<b>4.3</b>	<b>Tomographie optique cohérente longitudinale</b>	<b>114</b>
4.3.1	La résolution en profondeur	114
4.3.2	L'effet de la dispersion	115
4.3.3	La largeur de bande et le traitement électronique du signal OCT	117
4.3.4	Conclusion	119
<b>4.4</b>	<b>Tomographie optique cohérente transversale (en-face)</b>	<b>120</b>
4.4.1	La résolution transversale	121
4.4.2	L'effet d'un faisceau hors d'axe	124
4.4.3	La largeur de bande et le traitement électronique du signal OCT	126
4.4.4	Conclusion	127

<b>4.5 La microscopie confocale et la tomographie optique cohérente . . . . .</b>	<b>127</b>
4.5.1 Pouvoir de résolution longitudinale d'un microscope confocal . . . . .	128
4.5.2 Pouvoir de résolution transversale d'un microscope confocal . . . . .	129
4.5.3 Conclusion . . . . .	131
<b>4.6 Le bruit dans les systèmes OCT . . . . .</b>	<b>131</b>
4.6.1 Sources de bruit . . . . .	132
4.6.2 Le rapport signal/bruit dans une configuration balancée . . . . .	134
4.6.3 Conclusion . . . . .	137
<b>4.7 Conclusions . . . . .</b>	<b>138</b>
<b>Bibliographie . . . . .</b>	<b>139</b>

*Ce chapitre est dédié à la présentation des bases théoriques nécessaires pour la mise en oeuvre d'un tomographe optique cohérent. Tout d'abord, afin de comprendre la manière dont on fonctionne un tel dispositif nous présenterons quelques notions d'interférométrie à sources lumineuses de faible cohérence. Ensuite, nous focaliserons notre intérêt sur les performances du système en termes de résolution spatiale, en comparant ses performances avec celles d'un microscope confocal. Également, à la fin du chapitre nous focaliserons notre attention sur les sources de bruit dans un tomographe optique cohérent.*

## 4.1 Introduction

La tomographie optique cohérente (OCT) est une technique relativement nouvelle d'imagerie des tissus biologiques. Le première système OCT a été réalisé dans l'année 1991 [13]. Depuis, les principes de la tomographie optique cohérente ont été utilisés pour l'imagerie des diverses tissus biologiques tels que la peau [29], les dents [1],[36], les muscles [6], les os[15] ou des structures intraoculaires (rétine, cornée, etc) [25],[31],[10]. D'autre part, les principes de la tomographie optique cohérente ont été utilisés pour améliorer les performances d'autres techniques d'imagerie tissulaire comme PS-OCT (méthode utilisée pour des mesures des propriétés de polarisation des tissus profonds) [5] ou Doppler-OCT (imagerie du sang en mouvement) [14]. En fait, la technique de la tomographie optique cohérente a évolué très rapidement dans les dernières années en se



révélant être un instrument d'investigation alternatif à la microscopie confocale. En détectant les photons diffusés vers l'arrière qui ont subi un seul processus de diffusion, l'OCT peut fournir des images 3D des tissus avec une très haute résolution ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) et une haute sensibilité ( $>100 \text{ dB}$ ), in vivo, sans contact entre le système optique et le tissu [35].

A la base de la technique de la tomographie optique cohérente est la technique de l'interférométrie à faible cohérence qui implique l'utilisation d'une source de lumière de faible cohérence temporelle telle que les diodes superluminescentes ou les diodes laser multimodes. L'OCT est en fait une extension d'une autre technique d'imagerie du tissu biologique : l'OCDR (*Optical Coherence Domain Reflectometry*). L'OCDR est une technique permettant à obtenir des images 1D des tissus par la mesure du profil en profondeur de la réflectance lumineuse. L'objet d'étude est placé dans le bras de la cible d'un interféromètre à deux bras et le profil en profondeur de la réflectivité en fonction de la différence entre les longueurs des deux bras est déterminé par la modification de la longueur du bras de la référence. Cette technique a été utilisée avec succès pour des mesures de l'épaisseur de la cornée [12] ou de la dimension de l'oeil [8]. L'imagerie OCT fournit des images bidimensionnelles de l'objet d'étude par l'addition dans un système OCDR d'un dispositif balayant le faisceau lumineux. Ainsi on obtient des images appelées *transversales* dans le plan perpendiculaire au bras de la cible et *longitudinales* dans le plan contenant le bras de la cible [25]. A partir des images 2D il est envisageable de produire des images OCT 3D en enregistrant des successions d'images longitudinales latérales ou d'images transversales à différentes profondeurs dans le tissu [24],[23].

## 4.2 Interférométrie à sources lumineuses de faible cohérence

### 4.2.1 Calcul de l'intensité lumineuse détectée

On va considérer pour la simplicité un interféromètre de type Michelson. Dans un tel système, les faisceaux qui proviennent de la référence et de la cible interfèrent au niveau du détecteur soit de manière constructive soit de manière destructive selon la différence de marche optique suivant les deux bras de l'interféromètre. Si un des deux faisceaux est décalé en fréquence par rapport à

l'autre alors, l'interféromètre est dit de type *hétérodyne* et dans le cas contraire de type *homodyne*.

Le schéma de principe d'un interféromètre à détection homodyne est présenté en figure 4.1 (a).

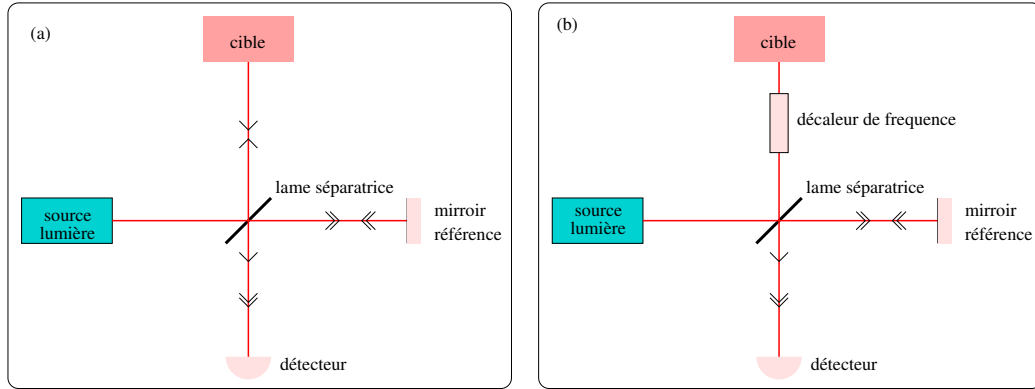


FIG. 4.1 – Schémas d'un interféromètre homodyne (a) et hétérodyne (b).

En nous situant dans le cas d'un interféromètre homodyne dans lequel l'objet du bras de la cible est remplacé par un miroir exprimons l'intensité lumineuse au niveau du détecteur par :

$$I = \langle (\vec{E}_o + \vec{E}_r)^* \cdot (\vec{E}_o + \vec{E}_r) \rangle \quad (4.1)$$

où  $\vec{E}_r$  et  $\vec{E}_o$  sont respectivement le champ électrique arrivant au détecteur provenant de la réflexion sur le miroir du bras de la référence et de la réflexion sur le miroir du bras de la cible. La moyenne est faite sur un intervalle temporel plus long que la période d'oscillation des champs électriques. Cette dernière équation peut être exprimée par :

$$I = \underbrace{I_o + I_r}_{\text{DC}} + \underbrace{\langle \vec{E}_o^* \cdot \vec{E}_r + \vec{E}_r^* \cdot \vec{E}_o \rangle}_{\text{AC}} \quad (4.2)$$

où  $I_r = \langle \vec{E}_r^* \cdot \vec{E}_r \rangle$  et  $I_o = \langle \vec{E}_o^* \cdot \vec{E}_o \rangle$  sont respectivement les intensités arrivant au détecteur correspondant aux réflexions sur les miroirs situés dans le bras de la référence et de la cible. Le terme  $\langle \vec{E}_o^* \cdot \vec{E}_r + \vec{E}_r^* \cdot \vec{E}_o \rangle$  désignant l'interférence n'est pas nul dans les conditions où les deux champs électriques sont corrélés. Ce terme d'interférence dépendant des intensités des champs électriques qui interfèrent, de la différence de phase entre les deux champs, d'état de polarisation

et des propriétés de cohérence de la source lumineuse contient l'information d'intérêt pour l'OCT. En fait, comme nous allons voir dans le chapitre suivant, les deux bras d'interféromètre contiennent des dispositifs permettant le contrôle des champs électriques dans chaque bras de sorte que l'on peut garder le même état de polarisation dans les deux bras. En raison de cela, pour la simplicité des calculs on peut considérer que le terme d'interférence n'est pas une fonction de l'état de polarisation du rayonnement optique. Avec cette simplification, la dernière équation peut être mise sous la forme :

$$I = I_o + I_r + 2\sqrt{I_o I_r} \text{Real}\{\tilde{\gamma}(\tau)\} \quad (4.3)$$

où  $\tilde{\gamma}(\tau)$  est le *degré complexe de cohérence des champs électriques*, étant défini comme la fonction d'autocorrélation normalisée du champ électrique émis par la source de lumière [27] :

$$\tilde{\gamma}(\tau) = \frac{\langle E^*(t)E(t+\tau) \rangle}{\langle E^*(t)E(t) \rangle} \quad (4.4)$$

et  $\tau = dz/v$ ,  $dz$  étant la différence de marche optique suivant les deux bras de l'interféromètre, et  $v = c/n$  est la vitesse de la lumière dans le milieu d'indice  $n$ . Suivant la théorème de Wiener-Khinchine le degré complexe de cohérence de la source est la transformée Fourier de la densité spectrale de puissance de la source  $S(\nu)$  [28] :

$$\tilde{\gamma}(\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\nu) e^{-i2\pi\nu\tau} d\nu \quad (4.5)$$

ce qui nous montre que l'intensité du signal mesurée par le détecteur va dépendre de la forme et de la largeur spectrale de la source lumineuse.

Afin de trouver l'expression mathématique de l'intensité lumineuse mesurée par le détecteur nous considérons que l'interféromètre homodyne présenté auparavant possède une source de lumière avec un profil spectral gaussien. De telles sources, peuvent être des diodes superluminescentes

(SLD), des , diodes (LED), etc. Leur densité spectrale de puissance [28] :

$$S(\nu) = \frac{2}{\Delta\nu} \sqrt{\frac{\ln 2}{\pi}} \exp \left[ - \left( 2 \sqrt{\ln 2} \frac{\nu - \nu_0}{\Delta\nu} \right)^2 \right] \quad (4.6)$$

est normalisée, ayant un maximum pour la fréquence  $\nu_0$ , et une largeur spectrale FWHM (*Full Width at Half Maximum*) égale à  $\Delta\nu$ . Ainsi, en utilisant les relations 4.5 et 4.6, le degré complexe de cohérence s'exprime par :

$$\tilde{\gamma}(\tau) = \exp \left[ - \left( \frac{\pi \Delta\nu \tau}{2 \sqrt{\ln 2}} \right)^2 \right] e^{-2\pi i \nu_0 \tau} \quad (4.7)$$

et on peut réécrire l'équation 4.3 sous la forme :

$$\begin{aligned} I &= I_o + I_r + 2 \sqrt{I_o I_r} \exp \left[ - \left( \frac{\pi \Delta\nu \tau}{2 \sqrt{\ln 2}} \right)^2 \right] \cos(2\pi \nu_0 \tau) = \\ &= I_o + I_r + 2 \sqrt{I_o I_r} |\gamma(\tau)| \cos(2\pi \nu_0 \tau) \end{aligned} \quad (4.8)$$

Ces relations montrent que dans les conditions où la largeur spectrale de la source  $\Delta\nu$  est très grande, l'enveloppe du degré complexe de cohérence est très étroite et l'amplitude du terme d'interférence diminue rapidement avec la croissance de la différence de marche optique suivant les deux bras de l'interféromètre  $\Delta z$ . Par conséquent, afin d'avoir une meilleure résolution en profondeur il faut utiliser une source de grande largeur spectrale.

#### 4.2.2 La visibilité des franges d'interférence

Afin d'avoir une mesure sur l'extension sur laquelle les faisceaux peuvent interfèrent, en interférométrie s'utilise la notion de *visibilité absolue des franges* d'interférence. Par définition, la

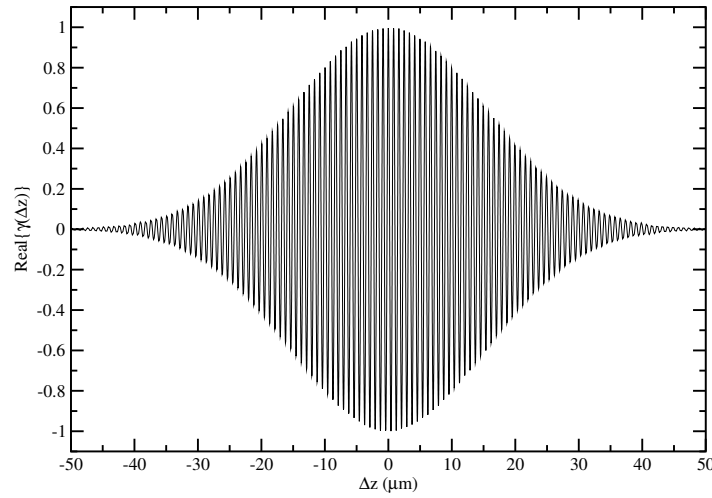


FIG. 4.2 – La partie réelle du degré complexe de cohérence en fonction de la différence entre les longueurs des bras d'un interféromètre à deux faisceaux éclairé par une source gaussienne émettant à 830.7 nm et ayant une largeur spectrale de 17 nm.

visibilité absolue des franges d'interférence est donnée par :

$$V_{abs} = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \quad (4.9)$$

où  $I_{max}$  et  $I_{min}$  sont respectivement les intensités lumineuses maximales et minimales au niveau du détecteur. Ainsi, utilisant la relation 4.8 il en résulte :

$$V_{abs} = \frac{2I_o}{\sqrt{I_o I_r}} \cdot |\gamma(\tau)| \cos(2\pi\nu_0\tau) \quad (4.10)$$

Cette relation est trouvée dans les conditions particulières où  $I_o \ll I_r$ . En fait, cette condition,  $I_o \ll I_r$  est remplie dans un système OCT, d'une part parce que l'intensité lumineuse provenant de la réflexion sur le miroir du bras de la référence est supérieure à celle provenant de la cible et d'autre part c'est une conséquence du fait que le diviseur de faisceau est choisi de sorte qu'il envoie plus de lumière dans le bras de la référence que dans le bras de l'objet. En plus de la visibilité absolue des franges, on utilise également en OCT la notion de *visibilité relative des franges* d'interférence, définie comme le rapport entre le terme d'interférence de l'équation 4.8

et sa valeur lorsque  $\tau = 0$ . Ainsi, la visibilité relative des frange d'interférence peut s'exprimer mathématiquement par :

$$V_{rel} = |\gamma(\tau)| \quad (4.11)$$

Ainsi, expérimentalement, il est possible de trouver la visibilité relative des franges par la mesure de l'amplitude du signal d'interférence,  $A$  et des signaux provenant de la cible et la référence :

$$V_{rel} = \frac{A}{2\sqrt{I_o I_r}} \quad (4.12)$$

### 4.2.3 Le signal OCT

Écrivons le terme d'interférence de la relation 4.8 en fonction de la différence entre les longueurs des bras de la référence et de l'objet,  $\Delta z = 2(z_r - z_o)$  :

$$i_{AC} = 2\sqrt{I_o I_r} |\gamma(\Delta z)| \cos(k\Delta z) \quad (4.13)$$

où  $k = 2\pi\nu_0/v$ . Ceci est une relation trouvée pour le cas où la cible est un miroir. Remplaçons ce miroir par un tissu biologique réel. Parce que habituellement dans un système OCT la lumière effectue un aller-retour seulement entre la cible et le diviseur de faisceaux, considérons le cas où le signal d'interférence provient d'un diffuseur situé au point  $z = z_o/2$ . En notant par  $O(z_o)$  la réflectivité de la cible qui tient compte aussi de l'atténuation de la lumière due à l'aller-retour des photons dans la cible et par  $h(z_o/2)$  la réponse confocale du bras de l'objet, alors on peut exprimer le signal d'interférence à l'aide de la relation [26],[22] :

$$i_{AC} = 2\sqrt{I_r} \int_{-\infty}^{+\infty} \sqrt{O(z_o)h(z_o/2)} |\gamma(\Delta z)| \cos(k\Delta z) dz_o \quad (4.14)$$

Cette relation montre que le signal OCT utile est donné par la convolution entre la racine carrée du produit de la réflectance de la cible et la réponse confocale du bras de la cible et le module du degré de cohérence de la source lumineuse. S'il y a un seul diffuseur, alors  $O$  est une constante positive inférieure à 1 et dans les conditions particulières où la réponse confocale est plus étroite

que l'enveloppe de la fonction  $|\gamma(\Delta z)|$  le signal utile mesuré par le détecteur est [26],[28] :

$$i_{AC} = 2\sqrt{I_r} \cdot \sqrt{O}|\gamma(\Delta z)| \cos(k\Delta z) \quad (4.15)$$

### 4.3 Tomographie optique cohérente longitudinale

La réalisation d'une image longitudinale repose sur la modification de la longueur du bras de la référence. Ainsi, en fonction de la longueur de ce bras, on peut extraire la valeur de la réflectivité lumineuse provenant de différentes profondeurs dans la cible.

#### 4.3.1 La résolution en profondeur

Afin de trouver la résolution en profondeur d'un système OCT on définit la *longueur de cohérence* d'une source lumineuse comme le FWHM de la fonction  $|\gamma(\Delta z)|$ . Pour le cas particulier d'une source lumineuse caractérisée par un profil gaussien de la densité spectrale de puissance, la longueur de cohérence va s'exprimer mathématiquement par [4],[18] :

$$l_c = \frac{4 \ln 2}{\pi} \cdot \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (4.16)$$

où  $\Delta\lambda = \lambda_0^2 \Delta\nu/c$ . Par exemple, pour une source émettant à 830.7 nm et ayant une largeur spectrale de 17 nm, on trouve une longueur de cohérence de 35.82  $\mu\text{m}$ .

La résolution en profondeur d'un OCT est liée à la longueur de cohérence de la source. La résolution en profondeur va être la plus petite distance qui peut être discriminée entre deux diffuseurs situés le long de la direction de propagation de la lumière dans le bras de la cible. Ainsi, à cause d'aller-retour de la lumière dans le bras de la cible, la résolution spatiale en profondeur d'un système OCT est pratiquement la moitié de la longueur de cohérence de la source dans le

milieu cible et peut être exprimée mathématiquement pour le cas d'une source gaussienne par :

$$\Delta L = \frac{l_c}{2n} = \frac{2 \ln 2}{\pi n} \cdot \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} \quad (4.17)$$

où  $n$  est l'indice de réfraction de la cible dans la région explorée. Ainsi, la résolution en profondeur d'un système possédant une source caractérisée par  $\lambda_0=830.7$  nm et  $\Delta\lambda=17$  nm, dans les conditions où l'indice de réfraction est 1.33 est de  $13.46 \mu\text{m}$ . L'utilisation comme source dans un système OCT d'un laser de largeur spectrale  $\Delta\lambda$  très fine, va avoir alors comme résultat une résolution en profondeur faible. A l'autre extrême, une lampe de lumière blanche permet d'obtenir une très bonne résolution mais le signal va être faible à cause des difficultés d'injection de la lumière dans les fibres optiques (à cause de sa taille géométrique). C'est pour cela que dans les systèmes OCT, pour l'imagerie de l'oeil, on utilise habituellement comme sources des diodes superluminescentes, les *SLD* (Superluminescent Laser Diode) émettant dans le domaine 750-900 nm et caractérisées par des largeurs de la bande spectrale de l'ordre à 20-40 nm.

### 4.3.2 L'effet de la dispersion

Jusqu'au ce point on a tacitement accepté qu'il n'y a aucun matériel dispersif dans les systèmes OCT. En réalité, les OCT contiennent plusieurs éléments dispersifs (lentilles, fibres optiques, la cible, etc). Est-ce que la dispersion peut jouer un rôle important sur l'intensité du signal OCT et sur la résolution d'un tel système ?

La dispersion repose sur la dépendance de la vitesse de phase du rayonnement optique avec la longueur d'onde dans un milieu matériel. Ainsi, si le milieu est éclairé avec la lumière provenant d'une source de fréquence  $\nu_0$  et largeur spectrale  $\Delta\nu$ , le nombre d'onde pour la fréquence  $\nu$  peut s'exprimer par :

$$k(\nu) = k(\nu_0) + (\nu - \nu_0)\dot{k}(\nu_0) + \frac{1}{2}(\nu - \nu_0)^2\ddot{k}(\nu_0) + \dots \quad (4.18)$$

où  $\dot{k}(\nu_0)$  et  $\ddot{k}(\nu_0)$  sont les dérivées d'ordre 1 et 2 par rapport à  $\nu$ , calculées pour  $\nu = \nu_0$ . A partir



de cette relation on peut montrer que le terme d'interférence de l'équation 4.2 peut s'exprimer par [7] :

$$i_{AC} = 2 \sqrt{I_r} \cdot \sqrt{O} d^{-1/4} e^{i\Delta\phi} \exp \left[ -\frac{1}{d} \left( \frac{\pi \Delta\nu \Delta z}{2c \sqrt{2}} \right)^2 \right] \quad (4.19)$$

où la quantité  $\Delta\phi$  représentant la différence de phase entre les champs électriques qui se propagent dans les deux bras de l'interféromètre est donnée par :

$$\Delta\phi = \frac{2\pi}{\lambda_0} \Delta z + \frac{1}{d} \left( \frac{\Delta\nu}{2\sqrt{2}} \right)^2 \Delta\phi + \arctan \left[ \left( \frac{\Delta\nu}{2\sqrt{2}} \right)^2 \frac{\Delta\ddot{\phi}}{4} \right] + m\pi \quad (4.20)$$

où  $m$  est un nombre entier, et le facteur  $d$  :

$$d = 1 + \left[ \left( \frac{\Delta\nu}{2\sqrt{2}} \right)^2 \frac{\Delta\ddot{\phi}}{2} \right]^2 \quad (4.21)$$

L'équation 4.19 montre que le signal OCT est perturbé par la dispersion. Il y a une réduction de l'amplitude maximale de l'enveloppe du degré de cohérence  $\gamma(\Delta z)$  par un facteur  $d^{-1/4}$  ainsi que un élargissement de cette fonction. Le résultat immédiat est la diminution du pouvoir de résolution longitudinale avec une augmentation de la longueur de résolution [7] :

$$\Delta L_d = \frac{2 \ln 2}{\pi} \cdot \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \cdot \sqrt{d} \quad (4.22)$$

Afin d'éliminer l'effet de la dispersion dans un système OCT il faut que les deux bras de l'interféromètre contiennent les mêmes milieux dispersifs de sorte que la différence de phase supplémentaire  $\Delta\phi$  due à la dispersion entre les champs électriques dans les deux bras soit zéro. Habituellement, la dispersion introduite par les éléments dispersifs se trouvant dans le bras de la cible est compensée à l'aide des barreaux de verre et avec des cuvettes contenant de l'eau placés dans le bras

de la référence. Bien qu'une compensation parfaite de la dispersion n'est pas possible à cause du fait qu'on ne peut pas avoir des matériels parfaitement identiques dans les deux bras de l'interféromètre, cette manière de compensation de la dispersion donne des résultats satisfaisants.

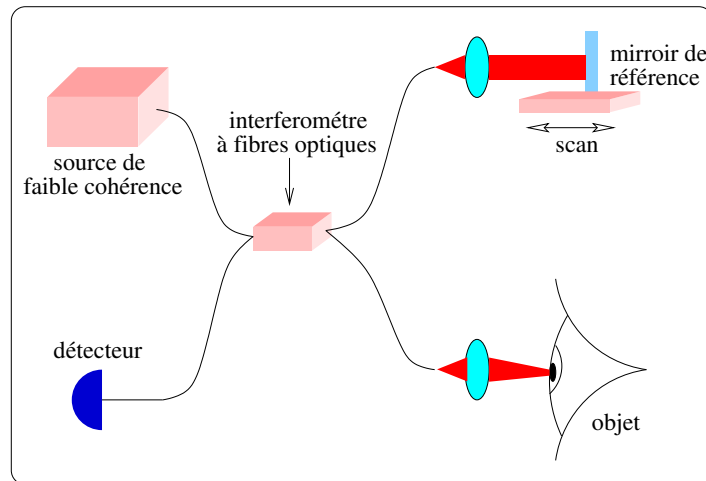


FIG. 4.3 – Le schéma d'un système OCT capable de produire des images 1D longitudinales

### 4.3.3 La largeur de bande et le traitement électronique du signal OCT

L'utilisation d'un dispositif comme celui de la figure 4.3 pour faire de l'imagerie des tissus biologiques est possible par la modulation du signal du bras de la référence. En fait, le photocourant donné par la formule 4.15 ne contient pas d'informations concernant la phase, sa valeur étant constante. En déplaçant le miroir de référence à une vitesse constante  $v$ , nous allons modifier en fait la différence entre les longueurs des bras par :

$$\delta z = \delta z_0 + 2vt$$

où  $\delta z_0$  est la différence de marche optique suivant les deux bras avant le début du mouvement, et le terme d'interférence 4.15 est :

$$i_{AC} = 2\sqrt{I_r} \cdot \sqrt{O} |\gamma(\delta z_0 + 2vt)| \cos(\varrho + 2\pi\nu dt) \quad (4.23)$$

où nous avons noté  $\varrho = 2\pi\delta z_0/\lambda$ , et

$$\nu_d = \frac{2v}{\lambda} \quad (4.24)$$

est la fréquence Doppler du signal (appelée aussi fréquence hétérodyne ou fréquence du porteur). De cette manière on obtient une modulation de la fonction cosinus par la fonction  $|\gamma(\delta z_0 + 2vt)|$ . Une fois le signal détecté il doit être traité numériquement. Après une amplification, afin d'extraire les fréquences utiles du signal on utilise un filtre passe bande ayant sa fonction de transfert centrée sur la fréquence Doppler. La largeur de bande du filtre est fixée approximativement à la largeur de bande du signal OCT. Après le filtrage, le signal est rectifié. Le processus de rectification consiste à changer le signe des valeurs négatives du signal. Finalement, un filtre passe bas élimine les composantes de hautes fréquences du signal générées suite à la rectification et on obtient l'enveloppe du signal OCT contenant les informations sur le profil en profondeur de la réflectance.

Le calcul de la largeur de bande de l'image des signaux OCT longitudinaux<sup>1</sup> se fait assez simplement. La résolution en profondeur limite la dimension de l'image sur l'écran de l'ordinateur (le nombre de pixels). Ainsi, au cours de la modification de la longueur du bras de la référence d'une quantité  $\Delta z$ , le nombre de pixels qui peut être enregistrés est :

$$N_z = \frac{\Delta z}{\Delta L} = \frac{2\Delta z}{l_c} \cdot n \quad (4.25)$$

Si le miroir situé dans le bras de la référence est mis sur une platine de translation exécutant une oscillation de fréquence  $F_z$ , alors le temps nécessaire pour enregistrer une image (un pixel) est  $1/(N_z F_z)$  et la largeur de bande de l'image OCT :

$$B = N_z \cdot F_z = \frac{2F_z \Delta z}{l_c} \cdot n \quad (4.26)$$

---

<sup>1</sup>Bien que la largeur de la bande des signaux OCT est parfois appelée largeur de bande de l'image OCT, les deux notions ne sont pas identiques, parce que la largeur de bande de l'image dépend des performances de la carte d'acquisition des signaux

Parce que  $\Delta z \approx v/F_z$  et comme la longueur de cohérence  $l_c$  peut s'exprimer à l'aide de l'équation 4.16 page 114, il en résulte :

$$B = 1.13 \times \frac{\Delta\lambda}{\lambda_0} \times v_d \times n \quad (4.27)$$

Pour le cas particulier d'une source émettant à 830.7 nm et ayant une largeur de bande spectrale de 17 nm, il en résulte une fréquence Doppler de 12 KHz pour une vitesse de déplacement de la platine de translation de 5 mm/s, d'où une largeur de bande de l'image OCT d'environ 275 Hz.

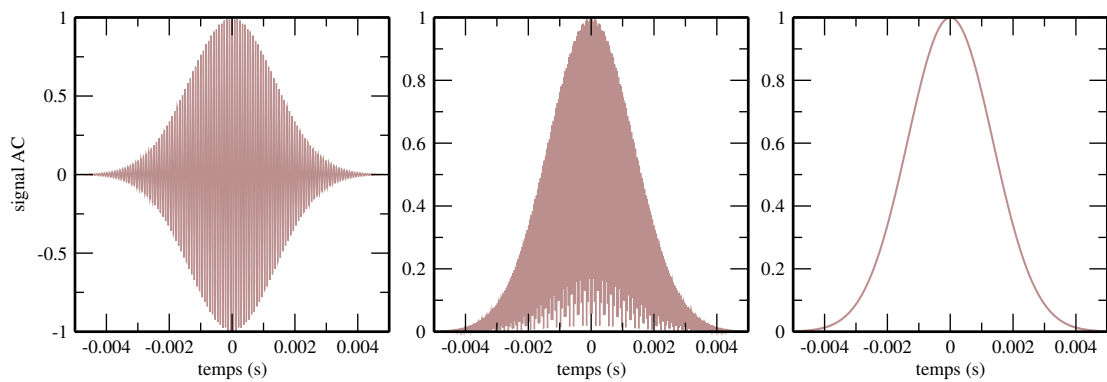


FIG. 4.4 – La rectification du signal après la détection : le signal OCT brut mesuré est présenté dans la figure de la gauche ; par rectification on change le signe de la partie négative du signal et on extrait l'enveloppe du signal.

Dans le cas particulier d'un échantillon stratifié possédant trois changements d'indice de réfraction en son sein, alors, nous allons retrouver dans le signal détecté trois pics correspondant aux trois changements d'indice d'amplitudes proportionnelles aux variations d'indice (voir la figure 4.5 page suivante).

#### 4.3.4 Conclusion

Un système OCT peut produire des images longitudinales avec une longueur de résolution inférieure à la résolution en profondeur maximale d'un microscope confocal. La limitation de la résolution en profondeur d'un OCT n'est pas limitée par l'ouverture numérique de l'oeil. C'est la source de lumière qui la limite et qui, en principe, doit avoir la plus grande largeur spectrale possible afin d'obtenir une résolution maximale. Bien sûr, en pratique il y a des sources de lumière

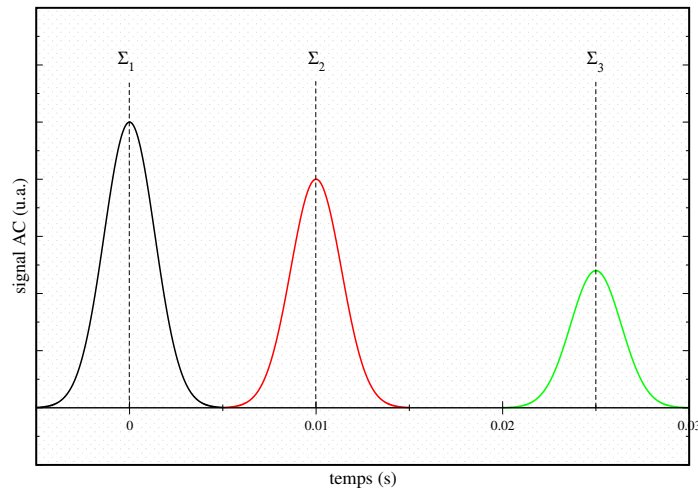


FIG. 4.5 – Les trois pics du signal correspondants aux trois changements d'indice de réfraction. Une telle technique pourrait être utilisée pour la mesure des indices de réfraction des tissus biologiques [34].

de largeurs spectrales pratiquement infinies, mais dans ce cas à cause du faible signal recueilli la mise au point du système est impossible, les mouvements de l'oeil ayant une forte influence sur la qualité des images [25].

#### 4.4 Tomographie optique cohérente transversale (en-face)

Pour réaliser une image transversale (*en-face*), le faisceau lumineux doit balayer l'objet point par point. Habituellement, le balayage est réalisé à l'aide d'un couple de miroirs vibrants (miroirs galvanométriques) animés d'un mouvement en X pour l'un et en Y pour l'autre. Le mouvement du miroir X crée un déplacement du faisceau sur une ligne. Quand la ligne est terminée, le miroir revient à sa position initiale et le miroir Y se déplace alors pour qu'une deuxième ligne soit créée par le miroir X. Ainsi, si on considère un temps d'acquisition de 0.2 secondes pour une image constituée de 480 lignes et de 320 colonnes, chaque point de la cible est éclairé pendant environ  $1.3 \mu\text{s}$ .

#### 4.4.1 La résolution transversale

Dans la figure 4.6 nous présentons le schéma typique d'un système OCT utilisé pour acquérir des images transversales de la cible. Le système est ajusté de sorte que le point  $O$  correspond à une différence de marche optique suivant les deux bras de l'interféromètre (OPD) égale à zéro. La cible est un miroir.

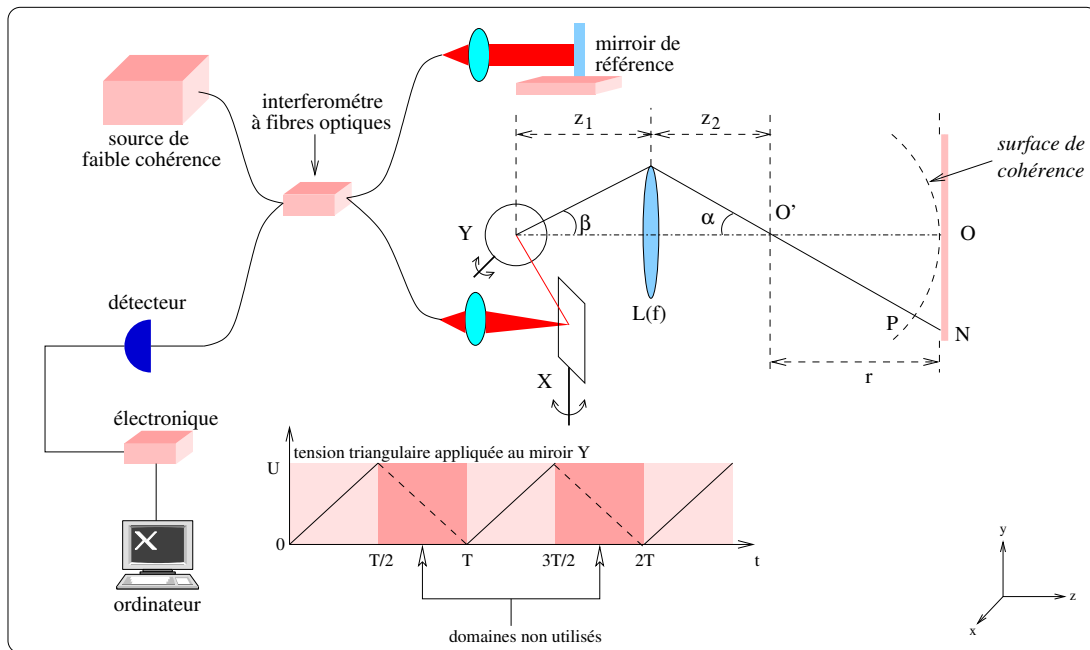


FIG. 4.6 – Le schéma d'un dispositif OCT capable de produire des images transversales de la cible par le balayage de deux miroirs.

En considérant que pour le moment le miroir  $X$  est arrêté, en partant du calcul de la valeur d'OPD on peut montrer que l'angle  $\delta\beta$  entre deux rayons consécutifs correspondants à deux maximums consécutifs d'interférence dans le plan du miroir est :

$$\delta\beta = \frac{z_2}{z_1} \cdot \frac{\lambda}{2r\alpha} \quad (4.28)$$

Habituellement, les tensions appliquées aux miroirs sont triangulaires, de période  $T_y = 1/F_y$ , d'où

la loi de variation de l'angle de déviation :

$$\beta(t) = 4\zeta_y U_y \frac{t}{T_y} \quad (4.29)$$

où  $U_y$  est la tension maximale appliquée au miroir et  $\zeta_y$  est le facteur de conversion angle de déflexion - tension électrique du miroir vibrant. Dans la dernière équation, le facteur 2 provient du fait que dans le processus de traitement numérique des signaux électriques en vue d'obtention des images, on n'utilise pas les régions de pentes négatives de la dépendance triangulaire de la tension électrique appliquée aux miroirs avec le temps et que le faisceau est dévié d'un angle  $2\beta$  quand le miroir tourne de  $\beta$ . Ainsi la fréquence à laquelle on trouve les maxima d'interférence est :

$$v_h = 8\zeta_y U_y F_y \cdot \frac{z_1}{z_2} \cdot \frac{r\alpha}{\lambda_0} \quad (4.30)$$

Cette dernière équation nous montre que durant le balayage, la fréquence du signal électrique varie entre 0 et  $v_h^{max}$  fonction de l'angle de déflexion des rayons par le miroir Y. Le signal obtenu est équivalent au signal qui aurait été obtenu par le déplacement du miroir de référence à une vitesse :

$$v = 4\zeta_y U_y F_y \frac{z_1}{z_2} \cdot r\alpha \quad (4.31)$$

Dans les conditions où les deux miroirs oscillent, on obtient une figure d'interférence qui va être composée de cercles concentriques (les anneaux de Newton). Les cercles d'intensité maximale vont avoir les rayons [20] :

$$R_m^{max} = \sqrt{\left(\frac{m\lambda}{2}\right)^2 + r \cdot m\lambda} \quad (4.32)$$

relation qui peut être approximée par [20] :

$$R_m^{max} = \sqrt{mr\lambda} \quad (4.33)$$

La résolution transversale du système est donnée par la dimension des interfranges. Comme les anneaux de Newton ne sont pas équidistants, la résolution transversale va être meilleure aux extrémités de la zone balayée.

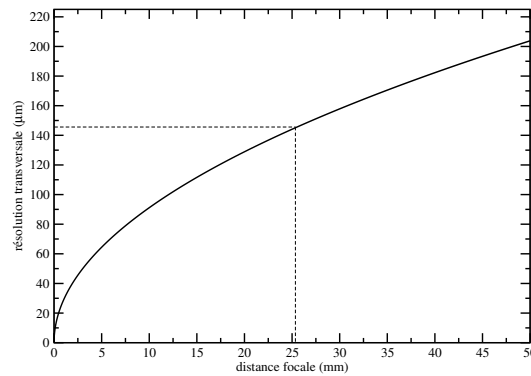


FIG. 4.7 – La dépendance de la résolution transversale d'un système OCT avec la distance focale d'une lentille placée dans le point  $O'$ . Le calcul est fait à l'aide de la relation 4.32 avec  $m = 1$ .

Il est clair que la résolution transversale est fonction de la distance  $r$ , une petite valeur de  $r$  assurant une meilleure résolution. En fait, dans la pratique, afin d'améliorer la résolution transversale et d'avoir un faisceau de petit diamètre balayant la cible, au point  $O'$  (figure 4.6) on place une lentille, cas dans lequel les formules de calcul de la résolution longitudinale restent les mêmes, sauf qu'il faut remplacer  $r$  par la distance focale de la lentille placée en  $O'$  [20]. Dans la figure 4.7 nous présentons la dépendance de la résolution en profondeur d'un système OCT au centre de l'image en fonction de la distance focale de la lentille placée au point  $O'$ , pour une longueur d'onde  $\lambda_0 = 830.7$  nm. On a intérêt à avoir la focale la plus petite, mais en pratique la dimension de l'oeil impose une limite inférieure pour cela. Pour une lentille de focale 25.6 mm, la résolution au centre de l'image est environ de 145.83  $\mu\text{m}$ . Nous verrons dans le paragraphe 4.5.2 que cette valeur est 33 fois plus faible que la résolution offerte par un microscope confocal. En fait il y a plusieurs techniques pour améliorer la résolution transversale d'un OCT, l'une d'entre elles consistant



à envoyer le faisceau de lumière hors de l'axe du miroir.

#### 4.4.2 L'effet d'un faisceau hors d'axe

Le faisceau laser, en pratique, n'a pas une dimension infiniment petite et en raison de cela il y a plein de rayons lumineux qui n'arrivent pas au centre du miroir Y. A l'issue des discussions du paragraphe précédent on peut montrer que pour les rayons du centre du miroir, l'OPD est pratiquement proportionnelle au carré de l'angle de déflexion  $\beta$ , et le signal photodéecté a des fréquences entre zéro et une valeur maximale  $\nu_h$  donnée par l'équation 4.30 page 122, fréquence correspondant a une densité spatiale maximale des anneaux de Newton.

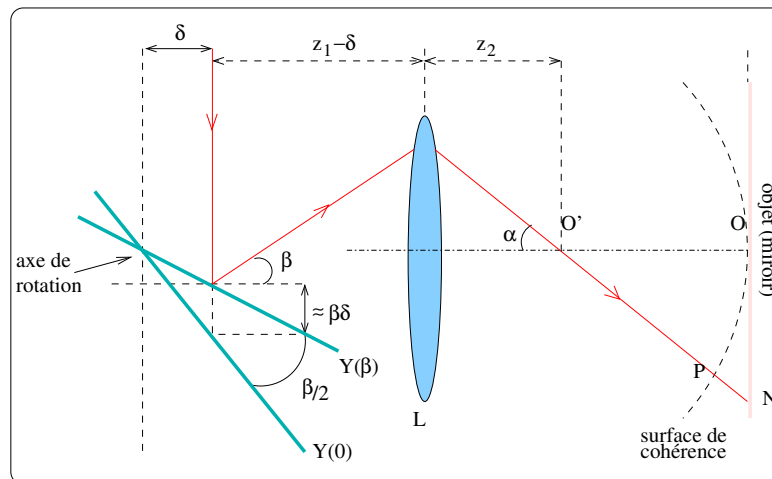


FIG. 4.8 – Un schéma pour le calcul d'OPD pour le cas d'un faisceau hors du centre du miroir Y.

Dans les conditions où le faisceau laser est déplacé d'une distance  $\delta$  du centre du miroir Y, on peut montrer que la fréquence du signal durant le balayage s'exprime par :

$$\nu'_h = \frac{8\zeta_y U_y F_y}{\lambda} \left[ -\delta + 4\zeta_y U_y F_y \left( \frac{z_1}{z_2} \right)^2 rt \right] \quad (4.34)$$

De cette manière, les fréquences du signal vont être limitées par :

$$\nu'_{(min,max),h} = \frac{8\zeta_y U_y F_y}{\lambda_0} \left| \delta \pm r \left( \frac{z_1}{z_2} \right)^2 \beta_m \right| \quad (4.35)$$

Si nous notons  $\beta_c$  l'angle limite maximal pour lequel  $OPD = l_c$ , alors l'angle  $\beta_m$  intervenant dans l'équation 4.35 est  $\beta_c$  si  $\beta > \beta_c$  ou  $\zeta_y U_y$  si  $\beta < \beta_c$ . Dans la figure 4.9 nous présentons une

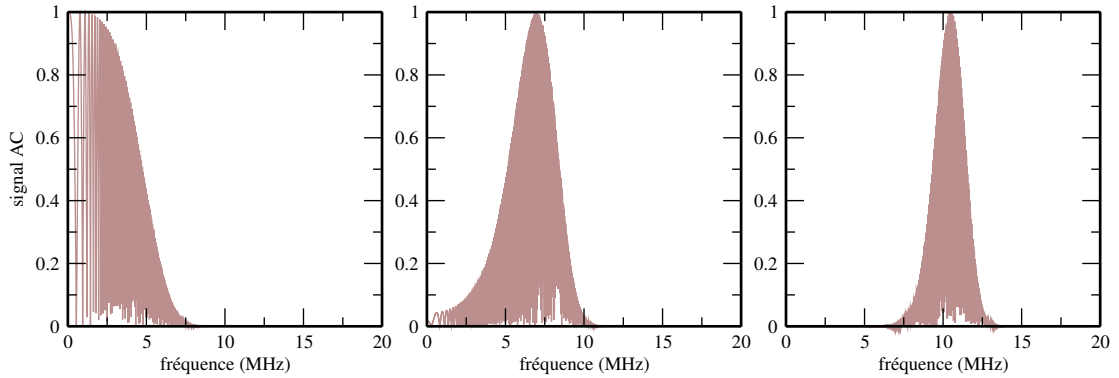


FIG. 4.9 – Le signal obtenu lorsque le faisceau se trouve au milieu du miroir, à 2 mm et à 3 mm du centre du miroir.

modélisation du signal d'interférence obtenu lors du déplacement du faisceau du centre du miroir. Dans la modélisation nous avons pris :  $\zeta_y = 45.38$  mrad/V, tension appliquée au miroir  $U_y=2V$ ,  $\lambda=830.7$  nm,  $l_c=35.82$   $\mu\text{m}$ ,  $r = f = z_2=25.6$  mm,  $z_1=54$  mm tandis que la fréquence d'oscillation du miroir  $F_y=4$  KHz.

Il est évident que l'utilisation d'un faisceau hors d'axe a comme effet l'augmentation des fréquences du signal photodéecté, d'où une amélioration de la résolution transversale. En fait, Podoleanu et al [19] montrent que dans le cas d'un faisceau hors d'axe les franges d'interférence forment une grille dont les lignes sont approximativement équidistantes et parallèles et que la résolution transversale est typiquement inférieure à 40  $\mu\text{m}$ . De plus, un choix correct de l'instrumentation optique peut nous conduire à des résolutions transversales de l'ordre à 15  $\mu\text{m}$  [21]. Ainsi la résolution transversale offerte par un système OCT est comparable à la résolution transversale d'un microscope confocal.

#### 4.4.3 La largeur de bande et le traitement électronique du signal OCT

En vue de la détermination de la largeur de bande des signaux OCT transversaux, supposons que la résolution transversale du système OCT est due exclusivement à la diffraction, c'est-à-dire qu'elle peut être exprimée mathématiquement par [3] :

$$\Delta r = \frac{1.22\lambda_0 f}{D} \quad (4.36)$$

où  $D$  est le diamètre de la lentille de focale  $f$ . Dans ce cas, le nombre de pixels d'une colonne de l'image est :

$$N_y = \frac{\Delta Y}{\Delta r} = \frac{D\Delta Y}{1.22\lambda_0 f} \quad (4.37)$$

$\Delta Y$  étant la dimension de l'image obtenue par le balayage du miroir Y. Comme  $\Delta Y$  est liée à la tension appliquée au miroir par la relation :

$$\Delta Y = 4\zeta_y \frac{z_1}{z_2} f U_y \quad (4.38)$$

il en résulte que la largeur de bande du signal est :

$$B = \frac{8\zeta_y D}{1.22\lambda_0} \cdot \frac{z_1}{z_2} \cdot F_y U_y \quad (4.39)$$

relation qui montre que la largeur de bande du signal OCT transversal est proportionnelle à la fréquence d'oscillation du miroir.

La démodulation du signal OCT se fait de manière similaire au cas de la tomographie optique cohérente longitudinale, la seule différence étant qu'après la détection et l'amplification du signal, celui-ci est filtré à l'aide d'un filtre passe haut au lieu d'un filtre passe bande. De cette manière, on élimine les fréquences basses et la résolution transversale s'approche de celle donnée seulement par diffraction. Finalement, nous remarquons que la largeur de bande des dispositifs électroniques utilisés pour la démodulation des signaux OCT transversaux doit être plus large que celle des

signaux OCT longitudinaux. Comme nous allons voir dans les paragraphes suivants, cela a pour effet la diminution du rapport signal/bruit.

#### 4.4.4 Conclusion

Un système OCT peut produire des images transversales avec une résolution inférieure à la résolution transversale d'un microscope confocal. Cependant, l'utilisation de différentes techniques d'augmentation des fréquences des signaux au centre des cibles, comme l'utilisation d'un faisceau hors d'axe des miroirs [19],[21] ou d'un modulateur de phase dans le bras de la référence [11] conduisent à des valeurs de résolutions transversales comparables à celles offertes par la microscopie confocale.

### 4.5 La microscopie confocale et la tomographie optique cohérente

Le fait qu'habituellement le bras de la cible d'un système OCT contient une instrumentation optique similaire à celle d'un microscope confocal rend possible d'envisager des enregistrements simultanées des images OCT et SLO<sup>2</sup>. Le schéma de principe d'un tel microscope est présenté en figure 4.10. La lumière émise par la source est focalisée via le système formé par la lentille collimatrice, le diviseur de faisceau et la lentille collectrice sur un certain point de la cible. Ensuite la lumière réfléchie ou retrodiffusée est collectée et dirigée via le diviseur de faisceau et l'objectif sur un détecteur de petite dimension. Si on modifie la position d'intérêt de  $\Delta z$  dans la cible, la lumière retrodiffusée n'est plus focalisée au centre du pinhole et on élimine les photons provenant des points hors du point de focalisation. Pour générer une image transversale, le faisceau lumineux est balayé sur l'objet à l'aide des miroirs vibrants. De cette manière, le microscope confocal est capable de réaliser des sections optiques à l'intérieur d'objets tridimensionnels complexes. Cette caractéristique découle de sa capacité à acquérir des images de meilleure résolution, de plus grand contraste et d'une profondeur de champ plus limitée que celles obtenus avec un microscope conventionnel.

---

<sup>2</sup>Nous utiliserons le terme de SLO (Scanning Laser Ophtalмосcope) pour nous référer à la microscopie confocale et cela parce que notre objet d'intérêt est le tissu oculaire et les images sont créés par le balayage du faisceau lumineux sur la surface de la cible.

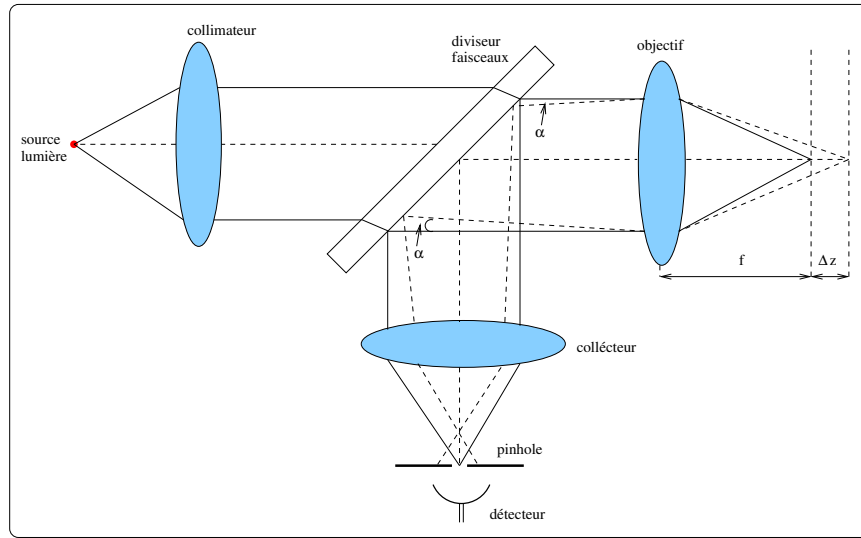


FIG. 4.10 – Un schéma typique d'un microscope confocal fonctionnant en réflexion. Le microscope est confocale parce que la lumière traverse deux fois l'objectif.

#### 4.5.1 Pouvoir de résolution longitudinale d'un microscope confocal

Afin de trouver la résolution longitudinale d'un microscope confocal, nous définissons la coordonnée sans unité [37] :

$$u = \frac{8\pi}{\lambda} z_o \sin^2 \left( \frac{\alpha}{2} \right) \approx \frac{2\pi}{n\lambda_0} z_o \cdot NA^2 \quad (4.40)$$

où  $\lambda_0$  est la longueur d'onde centrale de la source lumineuse,  $NA$  est l'ouverture numérique de l'objectif et  $z_o$  est la coordonnée d'un point dans la cible. L'introduction de cette coordonnée aide Wilson et al [37] à trouver que dans les conditions où le pinhole devant le détecteur a une dimension infinitésimale, la distribution en profondeur de l'intensité lumineuse d'un microscope confocal est donnée par :

$$I(u) = I(0) \left[ \frac{\sin(u/2)}{u/2} \right]^2 \quad (4.41)$$

et la résolution longitudinale définie comme le FWHM de cette distribution est :

$$\Delta L' = 0.89 \cdot \frac{n\lambda_0}{(NA)^2} \quad (4.42)$$

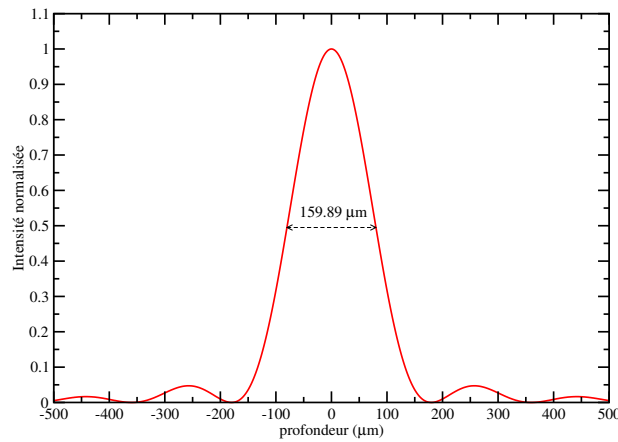


FIG. 4.11 – La réponse confocale longitudinale d'un miroir éclairé par un faisceau lumineux de diamètre 3.5 mm et longueur d'onde 830.7 nm utilisant un objectif Melles Griot 06GLC004

L'objectif typique utilisé dans nos expériences a été une lentille achromatique *Melles Griot 06GLC004* caractérisée par une distance focale de 25.6 mm dans l'air. Ainsi, la résolution en profondeur, que le microscope confocal est capable de nous fournir est de 159.89  $\mu\text{m}$  (longueur d'onde  $\lambda_0=830.7$  nm, diamètre du faisceau laser 3.5 mm, ouverture numérique 0.068,  $n=1$ ). Dans un système OCT, la résolution en profondeur va être plus petite parce que l'exemple présenté auparavant correspond à un diamètre infinitésimale du pinhole. En fait, dans les systèmes OCT, le rôle du pinhole est joué par l'extrémité de la fibre optique qui collecte la lumière réfléchiée par le miroir. Dans ce cas la diminution de la résolution longitudinale du microscope est fortement dépendante de la dimension du coeur de la fibre optique collectrice, de la distance entre l'extrémité de cette fibre et la lentille collectrice et de la dimension du faisceau lumineux [16].

#### 4.5.2 Pouvoir de résolution transversale d'un microscope confocal

La distribution transversale de l'intensité lumineuse d'un microscope confocal est conformément à Wilson et al [37] :

$$I(v) = \left[ \frac{2J_1(v)}{v} \right]^4 \quad (4.43)$$

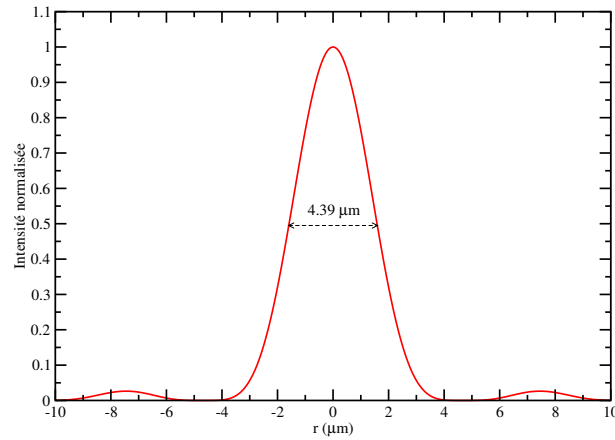


FIG. 4.12 – La réponse confocale transversale d'un miroir éclairé par un faisceau lumineux de diamètre 3.5 mm et longueur d'onde 830.7 nm utilisant un objectif Melles Griot 06GLC004

où  $J_1$  est la fonction de Bessel d'ordre 1, et  $v$  est une coordonnée sans dimension définie par [37] :

$$v = \frac{2\pi}{\lambda} r_o NA \simeq \frac{2\pi}{\lambda_0} r \cdot NA \quad (4.44)$$

où  $r_o = \sqrt{x_o^2 + y_o^2}$ ,  $x_o$  et  $y_o$  désignant les coordonnées d'un point dans le plan orthogonal au bras objet de l'interféromètre. Par définition, la résolution transversale d'un microscope confocal (où bien latérale) est la distance minimale entre deux points situés dans le plan orthogonale au bras objet de l'interféromètre qui peut être résolus par le microscope pouvant être exprimée mathématiquement par [37] :

$$\Delta r' = 0.36 \cdot \frac{\lambda_0}{NA} \quad (4.45)$$

Pour l'objectif *Melles Griot 06GLC004* caractérisée par une distance focale de 25.6 mm on trouve une résolution latérale du microscope confocal de 4.39  $\mu\text{m}$  (longueur d'onde  $\lambda_0=830.7$  nm, diamètre du faisceau laser 3.5 mm, ouverture numérique 0.068). Ainsi, le pouvoir de résolution transversal du microscope confocal est environ de 33 fois meilleure que le pouvoir de résolution transversal d'un système OCT utilisant le même objectif *Melles Griot 06GLC004*.

### 4.5.3 Conclusion

Bien qu'il est évident qu'un microscope confocal peut offrir un pouvoir de résolution transversal supérieur au pouvoir de résolution transversal d'un système OCT, dans nos conditions expérimentales, le pouvoir de résolution en profondeur du microscope confocal est nettement inférieur à celui d'un système OCT. Dans le cas particulier de l'oeil, considérant que son indice de réfraction est environ de 1.336, le diamètre minimal de sa pupille 2.5 mm et sa distance focale environ 17 mm, on trouve une ouverture numérique  $NA = nD/2f = 0.098$  d'où une résolution transversale de  $3.05 \mu\text{m}$  et une résolution en profondeur de  $102.85 \mu\text{m}$ . Cependant à cause des aberrations optiques, la résolution maximale en profondeur d'un microscope confocal pour l'oeil habituellement acceptée est environ de  $300 \mu\text{m}$ . Une amélioration de cette résolution n'est malheureusement pas possible. L'ouverture numérique de l'oeil ne peut être agrandie que par l'augmentation du rayon de la pupille. Cependant, même si la pupille peut être agrandie jusqu'à une ouverture de 6-7 mm, la résolution en profondeur ne s'améliore pas de manière significative à cause des aberrations optiques supplémentaires introduites par cet agrandissement.

En fait, il faut noter que la plupart des microscopes confocaux comprennent des objectifs de forte ouverture numérique, d'où une résolution en profondeur meilleure que les résolutions obtenues avec les systèmes OCT. Malheureusement ce n'est pas le cas des systèmes utilisés en ophtalmologie où la résolution en profondeur est limitée par la faible ouverture numérique imposée par le diamètre de la pupille et les aberrations optiques.

## 4.6 Le bruit dans les systèmes OCT

*La capacité d'un système OCT à produire des images de bonne qualité est caractérisée par la valeur du rapport signal/bruit ( $SNR^3$ ) qui détermine aussi la profondeur de pénétration de la lumière dans la cible. C'est pour cela que la bonne connaissance des sources de bruit dans les systèmes OCT ainsi que des possibilités d'augmentation du rapport signal/bruit sont essentielles en vue de la mise en oeuvre d'un système OCT performant.*

---

<sup>3</sup>SNR = Signal to Noise Ratio



### 4.6.1 Sources de bruit

#### Le bruit thermique

Le bruit thermique (ou bien le bruit Johnson) a comme source les mouvements aléatoires des porteurs dans les matériaux résistifs aux températures finies. Ce mouvement donne naissance à un courant électrique même en l'absence de rayonnement optique. Dans un OCT le matériel résistif est constitué par la résistance de charge présente dans le circuit de détection. La contribution du

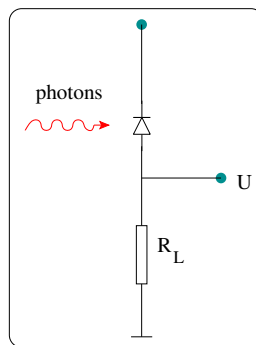


FIG. 4.13 – Un schéma électrique simplifiée d'un photodétecteur.

bruit thermique aux photocourant s'exprime à l'aide de la variance du photocourant thermique, soit [17] :

$$\langle \Delta I_T^2 \rangle = \frac{4k_B T}{R_L} \cdot B \quad (4.46)$$

où  $B$  est la largeur de bande du circuit électrique,  $k_B$  la constante de Boltzmann tandis que  $R_L$  est la résistance électrique de la résistance de charge.

#### Le bruit de grenaille

Le bruit de grenaille ("shot noise") est lié au fait que les photons arrive de manière aléatoire au détecteur. Ainsi, un flux de photons arrivant au détecteur va produire dans l'intervalle temporel  $T$  un courant électrique  $I = \frac{e}{T} \cdot n$ , où  $n$  est le nombre de photo-électrons générés, ce qui implique

pour les fluctuations :

$$\langle \Delta I_{SN}^2 \rangle = \left( \frac{e}{T} \right)^2 \cdot (\langle n^2 \rangle - \langle n \rangle^2)$$

Ce terme dépend de la statistique du nombre d'électrons  $n$ . Si les électrons sont non-corélés, la probabilité de mesurer  $n$  électrons est décrite par une statistique poissonnienne, cas dans lequel  $\langle n^2 \rangle - \langle n \rangle^2 = \langle n \rangle$  [2]. Ainsi, parce que la largeur de bande du circuit électronique de détection  $B$  est donnée par  $B = 1/2T$ , on peut exprimer la contribution du bruit de grenaille au photocourant total par [26],[2] :

$$\langle \Delta I_{SN}^2 \rangle = 2e \langle I \rangle B \quad (4.47)$$

Dans les relations précédentes,  $e$  est la charge électronique, et  $\langle I \rangle$  la valeur moyenne du photocourant.

### Le bruit de gain

Le bruit de gain ("excess photon noise") est caractéristique aux détecteurs à gain interne. Il est dû au processus d'amplification qui se fait de manière aléatoire aussi. On peut montrer que la contribution du bruit de gain au bruit total, peut s'exprimer par [26],[17] :

$$\langle \Delta I_{EPN}^2 \rangle = (1 + \Pi^2) \frac{B}{\Delta \nu_{eff}} \langle I \rangle^2 \quad (4.48)$$

où  $\Pi$  est un facteur dépendant de l'état de polarisation du rayonnement optique et  $\Delta \nu_{eff}$  appelée largeur de bande effective de la source lumineuse, est définie mathématiquement par [9, 33] :

$\Delta \nu_{eff} = \sqrt{\frac{\pi}{2 \ln 2}} c \frac{\Delta \lambda}{\lambda_0^2}$ . Ainsi, il est clair que pour réduire le bruit de gain il faut maintenir une petite valeur de la largeur de bande du dispositif électronique de détection et le degré de polarisation de

la lumière doit être le plus petit possible.

Suite à la contribution des trois types de bruit, le bruit total va s'exprimer mathématiquement par :

$$\langle \Delta I^2 \rangle = \frac{4k_B T}{R_L} \cdot B + 2eB \langle I \rangle + (1 + \Pi^2) \frac{B}{\Delta v_{eff}} \langle I \rangle^2 \quad (4.49)$$

et le rapport signal sur bruit s'exprime par la division du signal OCT utile donné par la relation 4.13 page 113 exprimé en termes de puissance et le bruit total donnée par 4.49 :

$$\frac{S}{N} = \frac{2 \cdot I_o \cdot I_r}{\Delta I^2} \quad (4.50)$$

#### 4.6.2 Le rapport signal/bruit dans une configuration balancée

Dans ce paragraphe on s'est intéressé à la manière avec laquelle le bruit dans un système OCT peut être diminué par l'utilisation d'une configuration de détection balancée.

Premièrement, il est connu que le bruit thermique n'influence pas considérablement la valeur du rapport signal/bruit, parce que, habituellement, les autres formes du bruit sont prédominantes [26]. Deuxièmement le bruit de grenaille ne peut pas être éliminé complètement parce qu'il fait une partie intégrante du processus de détection. C'est seulement le bruit de gain qu'on peut envisager de pouvoir éliminer. Cela peut se faire par une détection balancée.

Dans système de détection balancée, on extrait les signaux communs qui varient en anti phase entre deux détecteurs d'un signal commun qui est en phase entre détecteurs. Pour réaliser un tel système de détection il faut utilisé soit un coupleur directionnel (DC), 50/50 soit un diviseur de faisceaux (BS) 50/50. L'exemple de configuration balancée de la figure 4.15 contient un coupleur directionnel 50/50. La raison de l'utilisation d'un tel coupleur est que les intensités des champs

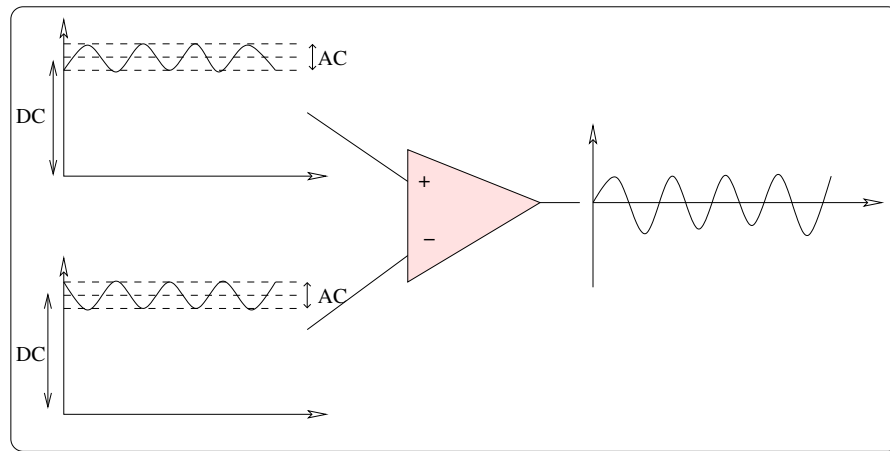


FIG. 4.14 – La diagramme de fonctionnement d'un système de détection balancé. Les valeurs DC des signaux sont soustraites et le signal AC obtenu a une valeur double.

électriques aux sorties 3 et 4 du coupleur sont en antiphase [32] :

$$\begin{cases} E_3 = \frac{1}{\sqrt{2}}(E_2 - iE_1) \\ E_4 = \frac{1}{\sqrt{2}}(E_1 - iE_2) \end{cases} \quad (4.51)$$

Ainsi, les signaux communs, non interférométriques entre les deux sorties sont éliminés électroniquement (les composants DC de l'intensité lumineuse, le bruit de gain). Podoleanu [17] a montré qu'en utilisant une détection balancée dans un système OCT on peut améliorer d'un facteur 2 le rapport signal/bruit par rapport à une situation où on n'utilise pas un tel type de détection et que dans une configuration balancée le rapport signal/bruit ne peut pas être supérieur à une valeur de limite indifféremment de la puissance lumineuse arrivant au détecteur. Trouvons cette valeur limite pour le cas du système présenté dans la figure 4.15<sup>4</sup>.

La puissance mesurée par le détecteur est la somme des puissances mesurées aux sorties 3 et 4 du coupleur directionnel :  $P_m = P_3 + P_4$ , qui peuvent s'exprimer par rapport aux puissances à l'entrée

<sup>4</sup>On se reportera à la figure 4.15 pour les significations des notations.

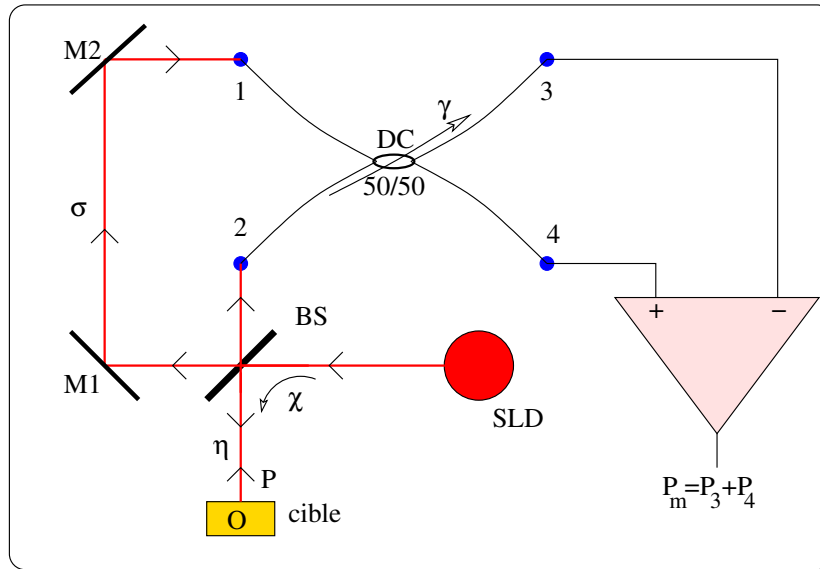


FIG. 4.15 – Schéma simplifié d'un système OCT à détection équilibrée. Les notations sur la figure ont les significations suivantes :  $\chi$  le coefficient de réflexion du diviseur de faisceaux,  $\eta$  et  $\sigma$  sont respectivement le coefficient de transmission de l'instrumentation optique du bras de la cible et de la référence,  $\gamma$ ,  $O$  la réflectivité de la cible et  $P$  la puissance lumineuse arrivant à l'objet.

du coupleur par :

$$\begin{cases} P_3 = (1 - \gamma)P_1 + \gamma P_2 \\ P_4 = \gamma P_1 + (1 - \gamma)P_2 \end{cases} \quad (4.52)$$

Parce que le coupleur est caractérisé par un coefficient de transmission  $\gamma=0.5$ , il en résulte que  $P_m = P_1 + P_2$ , où  $P_1$  et  $P_2$  sont données par :

$$\begin{cases} P_1 = O \cdot \eta \cdot (1 - \chi) \cdot P \\ P_2 = (1 - \chi) \cdot \frac{\sigma}{\eta \chi} \cdot P \end{cases} \quad (4.53)$$

Finalement, en exprimant le signal OCT en termes de puissance par  $Signal = 2\alpha^2 P_1 P_2$ ,  $\alpha$  étant la sensibilité du détecteur, le courant mesuré par  $\langle I \rangle = \alpha \cdot P_m$ , et en utilisant les relations 4.49 et 4.50 on trouve :

$$\frac{S}{N} = \frac{A \cdot P^2}{C + D \cdot P + E \cdot P^2} \quad (4.54)$$

où :

$$\begin{cases} A = 2\alpha^2 O(1 - \chi)^2 / \sigma \\ C = 4K_B T / R_L \\ D = 2eB\alpha \left( O\eta + \frac{\sigma}{\eta\chi} \right) (1 - \chi) \\ E = (1 + \Pi^2) \frac{B}{\Delta v_{eff}} \alpha^2 \left( O\eta + \frac{\sigma}{\eta\chi} \right)^2 \end{cases} \quad (4.55)$$

Ainsi, on peut calculer que la valeur maximale du rapport signal/bruit qu'on peut obtenir utilisant ce système est :

$$\left( \frac{S}{N} \right)_{max} = \frac{\frac{2O\sigma}{\chi}}{(1 + \Pi^2) \frac{B}{\Delta v_{eff}} \left( O\eta + \frac{\sigma}{\eta\chi} \right)^2} \quad (4.56)$$

Typiquement, dans le système OCT qu'on va présenter dans le chapitre suivant on utilise une source lumineuse caractérisée par une largeur de bande effective environ de 11 THz, un détecteur ayant une largeur de bande électronique 125 KHz. De plus, si nous supposons que le coefficient de réflexion de la cible est environ de  $10^{-5}$ , que la lumière n'est pas polarisée et que les pertes dans le bras de la référence sont environ de 5%, on trouve que le rapport signal/bruit maximal qu'on peut espérer obtenir est 54.9 dB, s'il n'y a aucune perte de lumière due à l'instrumentation optique dans le bras de la cible ( $\eta=1$ ) et 49.9 dB si la perte est de 25% ( $\eta=0.75$ ).

### 4.6.3 Conclusion

Dans ce paragraphe nous nous sommes intéressés à la détermination du rapport signal/bruit dans un système OCT. Nous avons vu que la qualité d'images est déterminée par trois types de bruits (thermique, de grenaille et de gain) et qu'un principe de détection balancée peut réduire

le bruit de gain afin d'améliorer le rapport signal/bruit. La valeur maximale typique du rapport signal/brut qui pourrait être atteinte est rarement retrouvée en pratique. La raison est d'une part les imperfections électriques (différence entre les sensibilités, les gains ou les niveaux de bruit des deux détecteurs) et optiques (réflexions sur des différents éléments optiques, imperfections des coupleurs directionnels, etc).

De nombreux chercheurs ont dédié leurs recherches à l'amélioration du rapport signal/bruit. Ainsi Sorin et al [30] ont montré qu'on peut améliorer la valeur du rapport signal/bruit dans une configuration non balancée par l'optimisation de la valeur de la puissance lumineuse dans le bras de la référence.

## 4.7 Conclusions

Nous avons dans cette partie exposé les principes de fonctionnement d'un système OCT. En particulier, nous avons montré qu'un tel système peut produire des images longitudinales de haute résolution, bien supérieures à celles produites par un microscope confocal et des images transversales de résolution comparables à celles des microscopes confocaux. Également nous nous sommes intéressés à l'effet de la dispersion sur la résolution longitudinale d'un OCT et sur les possibilités d'amélioration de sa résolution transversale. Ainsi, nous avons conclu qu'afin d'éliminer la dispersion il faut utiliser des matériaux ayant des propriétés de diffusion comparables dans les deux bras d'interféromètre et qu'on peut envisager l'amélioration de la résolution latérale par l'utilisation d'un faisceau hors d'axe des miroirs vibrants. Finalement nous avons analysé les différents types de source de bruit dans les systèmes OCT, et afin d'améliorer le rapport signal/bruit nous avons suggéré l'utilisation d'une détection balancée qui pourrait nous fournir un rapport maximale signal/bruit d'environ 49.9 dB pour une configuration typique d'un système OCT.

## Bibliographie

- [1] A. Baumgartner, C.K. Hitzenberg, S. Dichtl, A. Moritz, W. Sperr, and A.F. Fercher. Optical Coherence Tomography of dental structures. *Proc.SPIE*, 3248 :130 :136, 1998.
- [2] P.A. Besse. Bruit et limite de détection. Technical report, IMS-DMT-EPFL, 2002.
- [3] M. Born and E. Wolf. *Principles of optics*. Cambridge University Press, 1999.
- [4] Radu Cucu. *Polarisation of light in Faraday sensing and Optical Coherence Tomography*. PhD thesis, University of Kent at Canterbury, 2004.
- [5] J.F. de Boer and T.E. Milner. Review of polarization sensitive Optical Coherence Tomography and stokes vector determination. *J.Biomed.Opt.*, 7 :359 :371, 2002.
- [6] J.F. de Boer, S.M. Srinivas B. Hyle Park, T.H. Pham, Z. Chen, T.E. Milner, and J. Stuart Nelson. Polarization effects in Optical Coherence Tomography of various biological tissues. *IEEE J.Sel.Top.Quantum Electron.*, 5 :1200 :1204, 1999.
- [7] A.F. Fercher, W. Drexler, C.K. Hitzenberger, and T. Lasser. Optical Coherence Tomography - principles and applications. *Rep.Prog.Phys.*, 66 :239 :303, 2003.
- [8] A.F. Fercher, K. Mengedoht, and W. Werner. Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light. *Opt.Lett.*, 13 :186 :188, 1988.
- [9] M.H. Frosz, M. Juhl, and M.H. Lang. Optical Coherence Tomography : System design and noise analysis. Technical report, Riso National Laboratory, Roskilde, Danemark, 2001.
- [10] M.R. Hee, J.A. Izatt, E.A. Swanson, D. Huang, J.S. Schumann, C.P. Lin, and J.G. Fujimoto. Optical Coherence Tomography of the human retina. *Arch.Ophthalmol.*, 113 :325 :332, 1995.
- [11] C.K. Hitzenberg, P. Trost, P.W. Lo, and Q. Zhou. Three dimensional imaging of the human retina by high speed OCT. *Optics Express*, 11 :2753–2761, 2003.
- [12] C.K. Hitzenberger. Measurement of corneal thickness by low coherence interferometry. *Appl.Opt.*, 31 :6637 :6642, 1992.



- [13] D. Huang, E.A. Swanson, C.P. Lin, J.S. Schuman, W.G. Stinson, W. Wang, M.R. Hee, T. Flolte, K. Gregory, C.A. Puliafito, and J. Fujimoto. Optical Coherence Tomography. *Science*, 254 :1178–1181, 1991.
- [14] J.A. Izatt, M.D. Kulkarni, S. Yazdanfar, J.K. Barkon, and A.J. Welch. In vivo bidirectional color doppler flow imaging of picoliter blood volumes using Optical Coherence Tomography. *Opt.Lett.*, 22 :1439 :1441, 1997.
- [15] S. Jiao, G. Yao, and L.V. Wang. Depth resolved two-dimensional stokes vectors of back-scattered light and mueller matrices of biological tissue measured with Optical Coherence Tomography. *Appl.Opt.*, 39 :6318 :6324, 2000.
- [16] J.R. Sheppard M. Gu and X. Gan. Image formation in a fiber-optical confocal scanning microscope. *J.Opt.Soc.Am. A*, 8 :1755 :1761, 1991.
- [17] A.Gh. Podoleanu. Unbalanced versus balanced operation in an Optical Coherence Tomography system. *Appl.Opt.*, 39(1) :173–182, 2000.
- [18] A.Gh. Podoleanu, R. Cucu, and D.A. Jackson. Signal to noise ratio in an oct/confocal system and penetration depth in OCT. *Proc.SPIE*, 4251 :11 :19, 2001.
- [19] A.Gh. Podoleanu, G.M. Dobre, and D.A. Jackson. En-face coherence imaging using galvanometer scanner modulation. *Opt.Lett.*, 23(3) :147–149, 1998.
- [20] A.Gh. Podoleanu, G.M. Dobre, D.J. Webb, and D.A. Jackson. Coherence imaging by use of a newton rings sampling function. *Opt.Lett.*, 21(21) :1789–1791, 1996.
- [21] A.Gh. Podoleanu and D.A. Jackson. Combined Optical Coherence Tomograph and Scanning Laser Ophthalmoscope. *Electro.Lett.*, 34(11) :1088–1089, 1998.
- [22] A.Gh. Podoleanu, J. Rogers, and D.A. Jackson. OCT en-face images from the retina with adjustable depth resolution in real time. *IEEE J. Sel. Top. Quant.Electronics*, 5 :1176 :1184, 1999.

- [23] A.Gh. Podoleanu, J. Rogers, and D.A. Jackson. Three dimensional OCT images from retina and skin. *Opt.Express*, 7 :292 :298, 2000.
- [24] A.Gh. Podoleanu, J.A. Rogers, B. Wacogne, S. Dunne, H. Porte, T. Gharbi, G.M. Dobre, and D.A. Jackson. Towards 3d Optical Coherence Tomography. *SPIE Proc.*, 3915 :46–54, 2000.
- [25] A.Gh. Podoleanu, M. Seeger, G.M. Dobre, D.J. Webb, and D.A. Jackson. Transversal and longitudinal images from the retina of the living eye using low coherence reflectometry. *J.Biomed.Opt.*, 3(1) :12–20, 1998.
- [26] John Rogers. *Advances in Optical Coherence Tomography for imaging and flow measurement*. PhD thesis, University of Kent at Canterbury, 2001.
- [27] B.E.A. Saleh and M.C. Teich. *Fundamentals of photonics*. Willey Interscience, New York, 1991.
- [28] J.M. Schmitt. Optical Coherence Tomography (OCT) : A review. *IEEE J.Sel.Top,Quant.Electron.*, 5(4) :1205–1215, 1999.
- [29] J.M. Schmitt, M.J. Yadlowsky, and R.F. Bonner. Subsurface imaging of living skin with optical coherence microscopy. *Dermatology*, 191 :93 :98, 1995.
- [30] W.V. Sorin and D.M. Baney. A simple intensity noise reduction technique for optical low-coherence reflectometry. *IEEE Photon.Technol.Lett.*, 4 :1404–1406, 1992.
- [31] E.A. Swanson, J.A. Izatt, M.R. Hee, D. Huang, C.P. Lin, J.S.Schumann, C.A. Puliafito, and J.G. Fujimoto. In vivo retinal imaging by Optical Coherence Tomography. *Opt.Lett.*, 18 :1864 :1866, 1993.
- [32] K. Takada. Noise in optical low-coherence reflectometry. *IEEE J. Quant. Electron.*, 34 :1098 :1108, 1998.
- [33] K. Takada, A. Himeno, and K. Yukimatsu. Phase-noise and shot-noise limited operations of low coherence optical time domain reflectometry. *Appl.Phys.Lett.*, 59 :2483 :2485, 1991.

- 
- [34] G.J. Tearney, M.E. Brezinski, J.F. Southern, B.E. Bouma, M.R. Hee, and J.G. Fujimoto. Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by Optical Coherence Tomography. *Opt.Lett.*, 20(21) :2258–2260, 1994.
- [35] V. Tuchin. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*. SPIE Press, 2002.
- [36] X.J. Wang, T.E. Miller, J.F. de Boer, Y. Zhang, D.H. Pashley, and J. Stuart Nelson. Characterization of dentin and enamel by use of Optical Coherence Tomography. *Appl.Opt.*, 38 :2092 :2096, 1999.
- [37] T. Wilson. *Confocal Microscopy*. Academic Press, 1990.

---

# Tomographie optique cohérente. Mise au point d'un système utilisant un miroir vibrant résonant

---

### Sommaire

---

<b>5.1 Régimes de fonctionnement d'un système OCT. Terminologie . . . . .</b>	<b>144</b>
<b>5.2 Dispositif expérimental . . . . .</b>	<b>145</b>
5.2.1 La source lumineuse . . . . .	147
5.2.2 L'interféromètre . . . . .	147
5.2.3 Le système de balayage de la lumière . . . . .	148
5.2.4 La détection et l'acquisition des données . . . . .	151
<b>5.3 Résultats . . . . .</b>	<b>152</b>
5.3.1 Les performances du système . . . . .	152
5.3.2 Études sur la largeur de bande du signal généré par le miroir résonant . . . . .	164
5.3.3 Fonctionnement séquentiel SLO-OCT . . . . .	170
5.3.4 Fonctionnement en mode b-scan . . . . .	171
<b>5.4 Conclusions . . . . .</b>	<b>171</b>
<b>Bibliographie . . . . .</b>	<b>174</b>

---

Dans ce chapitre nous présenterons le système OCT que nous avons réalisé en nous intéressant à ses performances en termes de vitesse d'acquisition des images, de la résolution spatiale et du rapport signal/bruit. Aussi, nous nous intéresserons à la largeur de bande des signaux générés par un miroir vibrant rapide. Finalement, nous présenterons des images correspondantes à différents modes de fonctionnement du système.

## 5.1 Régimes de fonctionnement d'un système OCT. Terminologie

En principe, les systèmes OCT sont divisés en deux classes suivant leur manière de fonctionnement : d'une part les systèmes longitudinaux ou axiaux et d'autre part les systèmes transversaux ou latéraux ou bien *en-face*. L'attachement d'un système à une classe ou l'autre se fait suivant la manière avec laquelle le faisceau balaye la cible en vue d'acquérir une image point par point. Un diagramme de deux manières de balayage du faisceau laser sur la cible est présentée dans la figure 5.1.

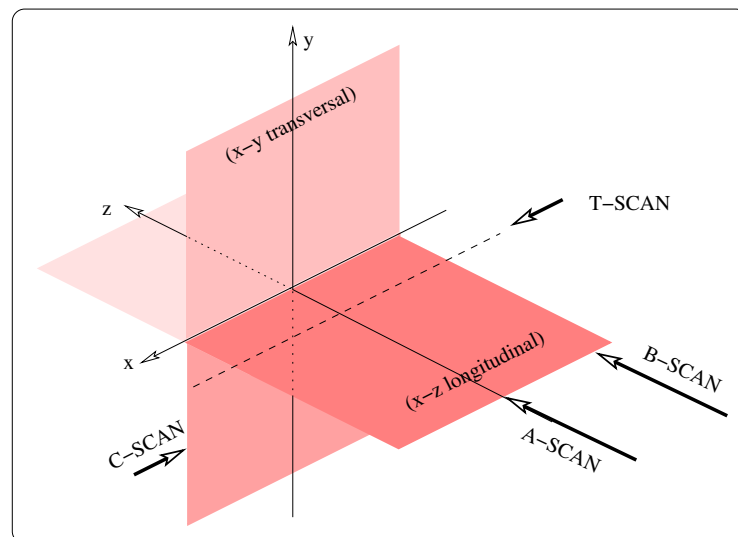


FIG. 5.1 – Terminologie utilisée en OCT : *a-scan*, *b-scan*, *c-scan* et *t-scan*.

Une image OCT 1D représente le profil de la réflectivité lumineuse suivant l'un des axes de coordonnées pour une position fixe dans la cible fixée par les autres deux coordonnées. En fait, on

parle de deux types de mode de fonctionnement 1D : *a-scan* et *t-scan*. Un mode *a-scan* représente le profil de la réflectivité suivant l'axe  $z$  (en profondeur) pour une position transversale fixée par les autres deux axes  $x$  et  $y$ , tandis que dans les modes *t-scan* on obtient le profil de la réflectivité suivant une axe transversale ( $x$  ou  $y$ ) pour une profondeur donnée  $z$ .

Il y a aussi deux possibilités d'obtenir des images 2D. Ainsi on va parler des images obtenus par *b-scan* quand on obtient le profil de la réflectivité des plans  $x-z$  ou  $y-z$  (sections longitudinales de la cible) et *c-scan* quand on obtient le profil de la réflectivité dans le plan transversal  $x-y$ , à une certaine profondeur dans la cible. Le système que nous avons réalisé et que nous présentons dans le paragraphe suivant peut fonctionner en mode *b-scan* et aussi *c-scan*. Pour faciliter le fonctionnement dans les deux modes, les images *b-scan* sont produites par une succession d'images *t-scan* rapides le long de l'axe  $z$ . Ainsi, la commutation de mode *c-scan* au mode *b-scan* se fait tout simplement par l'arrêt du miroir vibrant rapide et le mouvement de la platine de translation permettant la modification de la longueur du bras de la référence.

## 5.2 Dispositif expérimental

La figure 5.2 montre un schéma détaillé du système OCT que nous avons réalisé dans le laboratoire de Physique de l'Université de Kent.

Le système est construit sur une plaque verticale fixée sur un dispositif spécial (*chin rest*) qui permet l'immobilisation du sujet pour examen ophtalmologique. Il permet de bouger la plaque verticale sur les trois axes et positionner le système de sorte que la lumière puisse être focalisée aisément dans l'oeil du patient. La lumière provenant de la source est injectée dans le système via une fibre optique monomode à l'aide d'un coupleur à fibre optique (*FPR2*) et une lentille asphérique (*MOI*). Ensuite, la lumière est divisé en deux composants à l'aide d'un diviseur de faisceaux *BS*. La lumière traversant le bras de la référence est injectée dans l'un des bras du coupleur directionnel *DC* à l'aide aussi d'un coupleur à fibre optique *FPR2*. Dans le bras de l'objet, la lumière est dirigée à l'aide des miroirs vibrants  $X$  et  $Y$  et du système télescopique formés des lentilles  $L_1$  et  $L_2$  et focalisée sur la cible à l'aide de l'objectif  $L_3$ . Ensuite la lumière diffusée par la

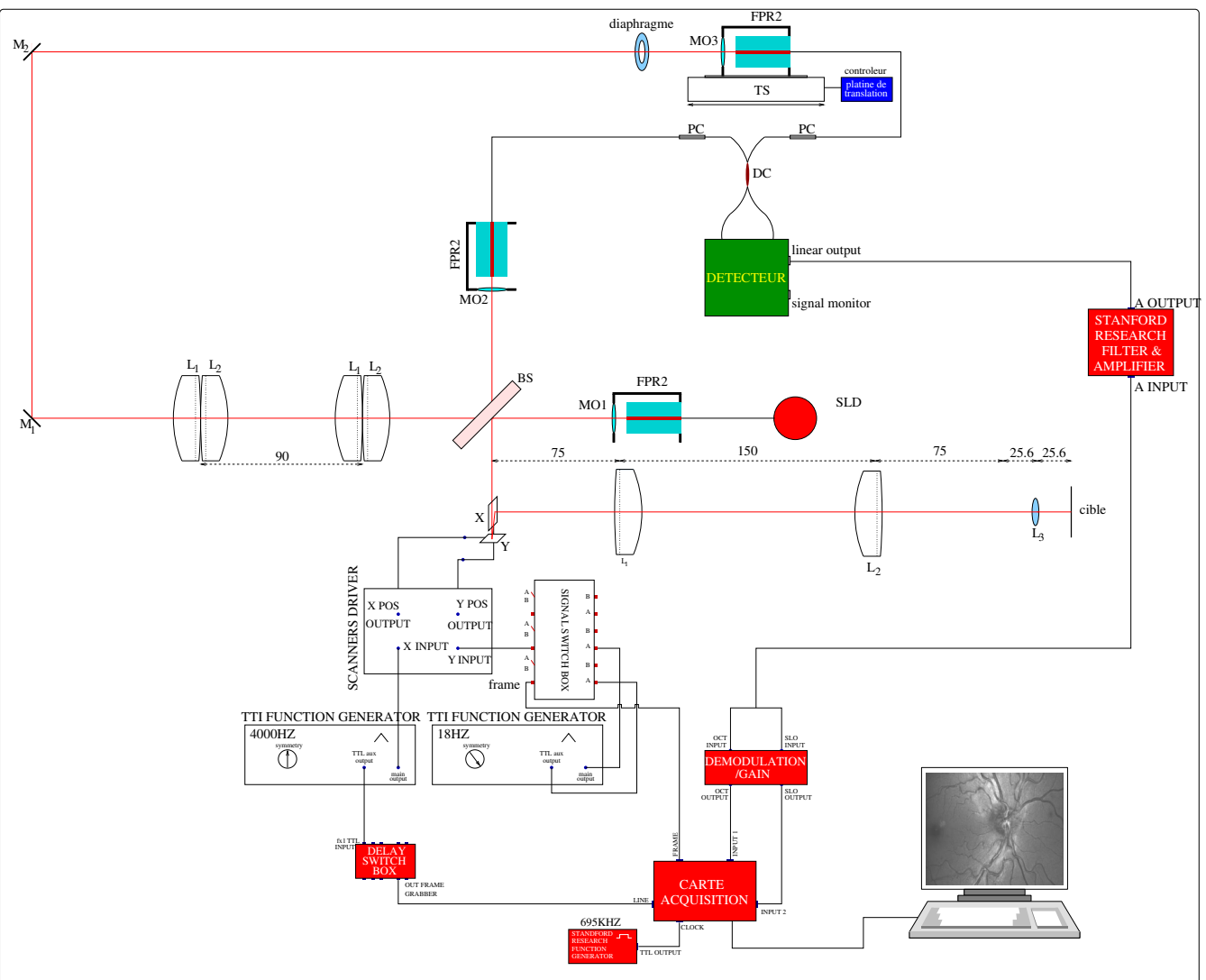


Fig. 5.2 – La diagramme du système OCT que nous avons construit.

cible parcourus le chemin inverse dans le bras de l'objet et est injectée dans l'autre bras du coupleur directionnel aussi par un coupleur à fibre optique FPR2. Les signaux lumineux traversant le coupleur directionnel sont détectés par un système de détection balancé et traités numériquement. Finalement

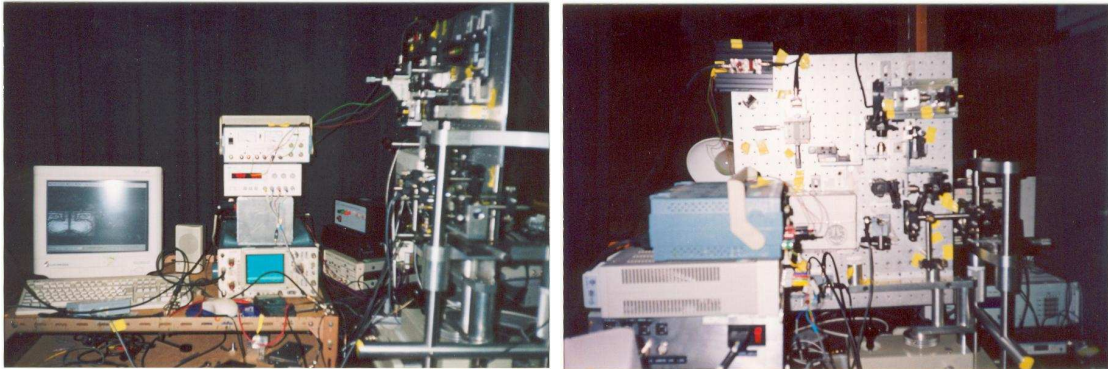


FIG. 5.3 – Des photographies vues de face (à droite) et de coté (à gauche) du système OCT.

lorsque les longueurs des bras de l'interféromètre sont égales, l'ordinateur est capable d'afficher l'image OCT de la cible. Détaillons à présent notre dispositif expérimental.

### 5.2.1 La source lumineuse

La source lumineuse est une diode superluminescente (SLD) produite par *Superlum, Moscou*. Cette SLD remplit les conditions demandées par un système OCT : une grande puissance, une grande largeur spectrale et une longueur d'onde d'émission dans le domaine spectral proche infrarouge. Ainsi, conformément à la fiche technique fournie par le producteur, cette SLD émettant à la longueur d'onde  $\lambda_0 = 830.7 \text{ nm}$ , a une largeur spectrale  $\Delta\nu = 17.0 \text{ nm}$  et peut fournir une puissance maximale environ de 20 mW. Supposant une forme gaussienne de la densité spectrale de puissance de la source, dans un système compensé pour la dispersion on prévoit une résolution en profondeur environ de  $17.91 \mu\text{m}$  lorsque l'indice de la cible est  $n=1$ . Afin de prévenir la réinjection de la lumière dans la source, la fibre optique monomode servant à injecter la lumière dans le système est connectée FC/APC.

### 5.2.2 L'interféromètre

La lumière provenant de la source est divisée en deux composantes à l'aide d'un *diviseur de faisceaux* 10/90, 10% de la puissance étant dirigée vers l'objet et 90% vers la référence. Le choix correct du diviseur est essentiel dans un système OCT parce que finalement le diviseur établit quel est le pourcentage de la puissance provenant de la cible qui est détecté.



Le rôle du *coupleur directionel DC (SIFAM)* est double : d'une part afin de réaliser une détection balancée il capture la lumière provenant de l'objet et de la référence et renvoie vers les détecteurs deux faisceaux de lumière d'égale intensité (à  $830\pm 10$  nm) et d'autre part suivant la propagation de la lumière dans les fibres optiques qui le compose à l'aide des deux contrôleurs de polarisation (*PC*), on ajuste les champs électriques des deux bras du coupleur de sorte que leur état de polarisation soit le même. Le coupleur directionel est constitué de deux fibres optiques ayant un diamètre de coeur de  $5\ \mu\text{m}$ , une ouverture numérique 0.1 et possédant une conectorisation *FC/APC*.

Afin de produire des images longitudinales, le coupleur à fibre optique du bras de la référence est fixé sur une platine de translation (*TS*). Le déplacement de la platine a été assuré par une unité de translation *Newport Controller, MM4005* possédant un moteur pas à pas qui a une résolution de  $1\ \mu\text{m}$  et une plage de translation de 20 mm.

Pour l'injection de la lumière dans le système ainsi que pour sa collection on a testé trois types d'objectifs : *OFR* modèle *LLO-4-18-NIR* (10X, distance focale 18.4 mm, ouverture numérique 0.13, diamètre maximal du faisceau 4.4 mm), *New Focus* modèle *5726-B-H* (10X, distance focale 15.4 mm, ouverture numérique 0.16, diamètre maximal du faisceau 6.5 mm) et *New Focus* modèle *5724-B-H* (20X, distance focale 8.0 mm, ouverture numérique 0.5, diamètre maximal du faisceau 8.0 mm). Tous les objectifs ont des substrats antiréfléctants pour le domaine spectral proche infrarouge.

Les deux miroirs du bras de la référence ( $M_1$  et  $M_2$ ) sont des miroirs produits par *New Focus* ayant un diamètre de 12.7 mm, possédant un substrat réfléchant d'argent. On a préféré ce type de miroir parce que, en comparaison avec les miroirs à substrat diélectrique, les miroirs métalliques n'introduisent pas de dispersion supplémentaire.

### 5.2.3 Le système de balayage de la lumière

Le balayage de la lumière sur la surface de la cible est assuré par un système de deux miroirs vibrants positionnés perpendiculairement l'un à l'autre. L'angle d'incidence de la lumière sur les miroirs est  $45^\circ$ . Le schéma complet du système de balayage ainsi que le positionnement des deux

miroirs vibrants est présenté dans la figure 5.4.

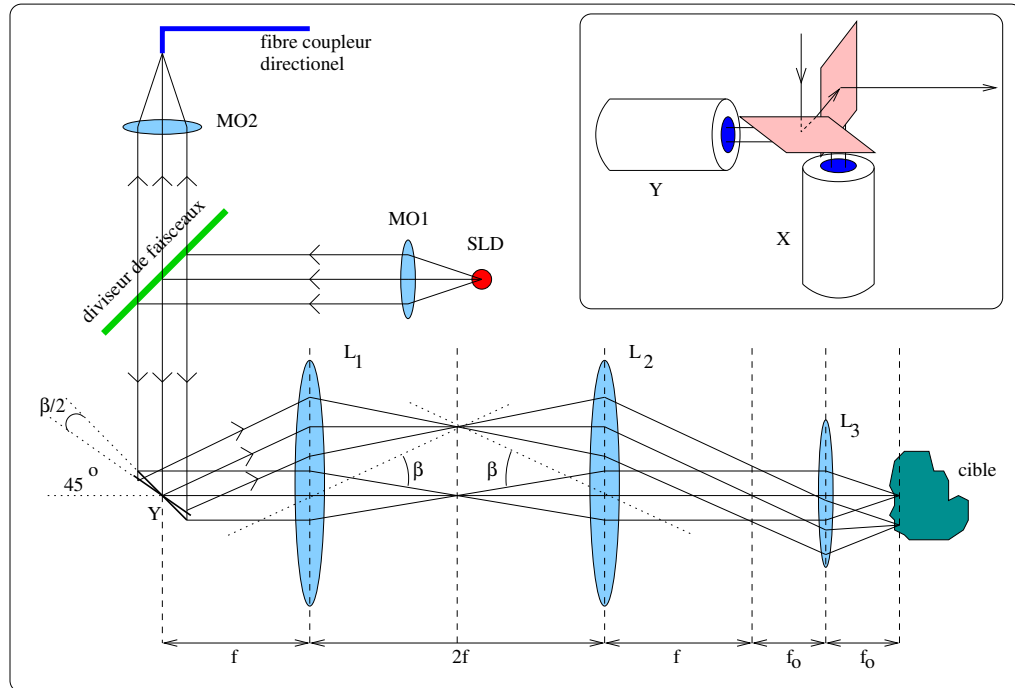


FIG. 5.4 – La diagramme du système de balayage de la lumière. Dans la partie droite, dans le haut de la figure on présente le positionnement orthogonale des miroirs vibrants.

Le miroir *X* est utilisé pour le balayage rapide de la cible latéralement, en direction horizontale. Ce miroir est un miroir résonant produit par *GSLumonics*. La rotation du miroir avec un angle  $\beta/2$  implique une déflexion du faisceau avec un angle  $\beta$ . L'angle maximal possible de déflexion des faisceaux lumineux avec ce miroir est  $\beta_{max} = 20^\circ$ . Le miroir *X* a une dimension de 12x9.25 mm, une réflexion supérieure à 97% pour un angle d'incidence de la lumière de  $45^\circ$  (substrat d'argent), et ses vibrations sont induites par des signaux sinusoïdaux.

Le miroir *Y* est le miroir lent. Il est utilisé pour le balayage latéral de la cible en direction verticale. Ceci c'est un miroir produit par *Cambridge Technology*, modèle 6210 qui peut fournir une déflexion maximale des rayons lumineux de  $30^\circ$ . Il a une dimension utile de 4x4 mm, son oscillation étant faite aussi à l'aide d'un signal triangulaire. Le choix de la fréquence d'oscillation est imposé par la carte d'acquisition (700 Hz pour l'imagerie longitudinale et environ 12 Hz pour l'imagerie transversale).

Dans l'arrangement optique utilisé pour le balayage point par point de la cible, les lentilles  $L_1$  et  $L_2$  sont deux lentilles achromatiques identiques (*Thorlabs, AC508-75-B*) de distances focales  $f = 75\text{mm}$  et diamètre  $50.8\text{ mm}$ . La distance entre les deux lentilles est égale au double de leur focale, de sorte qu'elles forment un système télécentrique. Cet arrangement peut être utilisé pour l'imagerie de l'oeil mais aussi pour l'imagerie d'autres objets. Par exemple pour l'imagerie de la rétine, la pupille de l'oeil doit être placée dans le plan focal image de la lentille  $L_2$  et l'oeil va focaliser les rayons lumineux sur la rétine (la dimension du faisceau lumineux dans le plan focal de la lentille  $L_2$  reste inchangée durant le balayage). Pour l'imagerie d'autres objets, on place une lentille achromatique  $L_3$  de focale  $f_0$  à une distance  $f + f_0$  de la lentille  $L_2$  et la cible dans le plan focal image de la lentille  $L_3$ . Dans notre dispositif expérimental, la lentille  $L_3$  est une lentille achromatique *Melles Griot, 06GLC004*, de focale  $f_0=25.6\text{ mm}$  et diamètre  $14.9\text{ mm}$ .

A partir de la connaissance de la distance focale  $f_0$  de la lentille  $L_3$ , de la tension appliquée aux miroirs (maximum  $5\text{V}$ ) et des facteurs de conversion angle de déflexion - tension électrique appliquée aux miroirs on peut trouver la dimension maximale de l'image qu'on peut obtenir utilisant cet arrangement optique. Ainsi, en nous rapportant à la figure 4.6 page 121 et à l'équation 4.29, pour des angles de déflexion petits, on peut exprimer la dimension de l'image suivant les deux axes de coordonnées par :

$$X = 4\zeta_x U_x f_0 \quad (5.1)$$

$$Y = 4\zeta_y U_y f_0 \quad (5.2)$$

Dans ces relations trouvées pour  $z_1 = z_2 = f$  et  $r = f_0$ ,  $\zeta_{x,y}$  et  $U_{x,y}$  sont respectivement les facteurs de conversion angle de déflexion - tension et les tensions électriques appliquées aux miroirs. Le facteur de conversion du miroir lent fournit par le constructeur est  $\zeta_y=45.38\text{ mrad/V}$ . Le facteur  $\zeta_x$  caractéristique du miroir résonant a été trouvé par des mesures expérimentales de la dépendance de la dimension de l'image suivant l'axe  $ox$  avec la tension appliquée au miroir. En mesurant la pente de la dépendance  $X = f(U_x)$  on a trouvé  $\zeta_x=12.69\text{ mrad/V}$ . Ainsi, une dimension typique de l'image qu'on peut obtenir avec cet arrangement est  $4.2 \times 4.2\text{ mm}$ . Cette dimension de l'image est

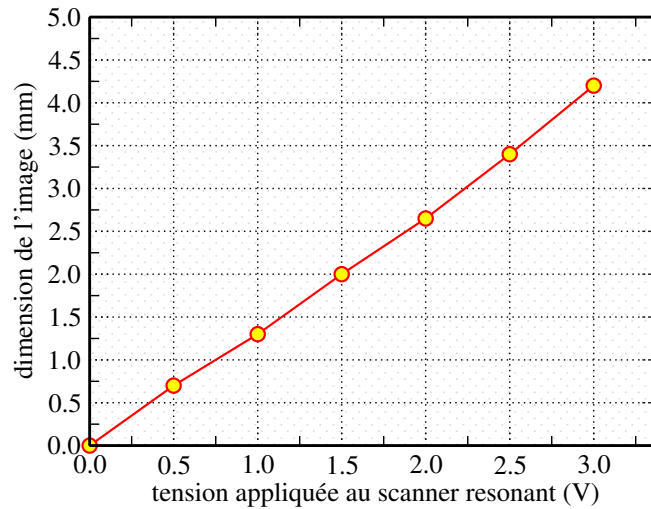


FIG. 5.5 – La dimension de l'image en fonction de la tension appliquée au miroir résonant. En principe la tension maximale pouvant être appliquée au miroir est 5V, mais pour de raisons de sécurité nous nous sommes limités à une tension de 3V, correspondant à une dimension horizontale maximale de l'image de 4.2 mm.

obtenue en appliquant 3V au miroir rapide et 0.9V au miroir lent.

## 5.2.4 La détection et l'acquisition des données

### Les détecteurs

Dans toutes les expérimentations nous avons toujours utilisé une détection balancée et une conectorisation FC/PC des détecteurs. En fonction du but des expériences et de leur "disponibilité" nous avons utilisé plusieurs types de détecteurs : *New Focus*, modèle *Nirvana 2007*, utilisé pour acquérir des images OCT et caractérisé par une largeur de bande électronique de 125 KHz, *New Focus*, modèle 1607-AC-FC, pour imagerie OCT, de largeur de bande électronique 650 MHz et la diode en avalanche *Hamamatsu*, modèle C5460-01, de largeur de bande électronique 100KHz, utilisée pour acquérir des images confocales.

### L'acquisition des données

Une conversion à 8 bits des signaux analogiques démodulés en signaux numériques est réalisée par une carte d'acquisition fournie par *Ophthalmic Technology Inc, Canada*. Le pilotage de la carte

d'acquisition ainsi que le dépouillement des images est fait à l'aide du logiciel *Bitflow Raven*. La dimension des images ainsi obtenues est 480x320 pixels.

## 5.3 Résultats

### 5.3.1 Les performances du système

*Les performances d'un système OCT sont mesurées par la vitesse d'acquisition et d'affichage des images, par les résolutions longitudinales et transversales et le rapport signal/bruit. Dans les paragraphes suivants nous évaluons ces paramètres pour le système que nous avons réalisé.*

#### La vitesse d'acquisition et d'affichage des images

A cause de mouvements rapides de l'oeil la vitesse d'acquisition des images doit être en principe supérieure à 5Hz afin de nous assurer de l'immobilité de l'oeil. Dans notre système, la vitesse d'acquisition est limitée par les performances de la carte d'acquisition qui induit une fréquence maximale du miroir lent,  $\gamma$  de 12 Hz lors d'enregistrement des images transversales. La fréquence d'enregistrement des images longitudinales est limitée par la dimension des images qu'on veut obtenir. Ainsi pour une vitesse typique de la platine de translation de 5 mm/s et une dimension longitudinale de l'image de 1 mm on obtient une fréquence d'acquisition de l'image d'environ 5 Hz.

#### La résolution longitudinale

Conformément aux aspects théoriques du chapitre précédent, notre système OCT pourra fournir une résolution en profondeur environ de  $17.91 \mu\text{m}$ . En pratique cette chose est assez difficile à obtenir à cause de la dispersion. En fait les éléments introduisant la dispersion se trouvent tous dans le bras de la cible. Ce sont les lentilles  $L_1$ ,  $L_2$  et  $L_3$ . L'épaisseur des lentilles  $L_1$  et  $L_2$  est 17 mm et celle de la lentille  $L_3$  est 7.37 mm. De plus, parce que la lumière traverse deux fois le bras objet de l'interféromètre, la contribution à la dispersion de trois lentilles est double. Les longueurs des fibres optiques de deux bras du coupler directionnel sont égales. Ainsi, le coupleur ne

contribue pas à la dispersion. La différence entre les indices de réfraction des milieux constituant les bras de l'interféromètre se manifeste par une diminution de la résolution transversale et de la visibilité relative des franges d'interférence. Pour compenser la dispersion on a introduit dans le bras de la référence un barreau de verre (BK7) de longueur 80 mm ou 4 lentilles achromatiques *Thorlabs, AC508-075-B*. Dans les deux cas nous avons mesuré le FWHM de l'enveloppe du signal d'interférence entre les faisceaux provenant de la référence et de la cible ainsi que la visibilité relative des franges d'interférence. Pour la mesure du signal d'interférence on a déplacé la platine de translation à une vitesse  $v=1\text{mm/s}$  de sorte que la fréquence d'hétérodyne générée a été  $\nu_d=2.40\text{ KHz}$ . Les signaux ont été enregistrés à l'aide d'un oscilloscope numérique *LeCroy, LC 534A*. La mesure du FWHM nous a permis à trouver la résolution en profondeur longitudinale conformément à la formule :

$$L = v \cdot \tau_{1/2} \quad (5.3)$$

Pour la mesure de la visibilité relative de franges d'interférence, le miroir Y a été arrêté, tandis que le miroir X est fait osciller par une tension sinusoïdale d'amplitude très basse. La mesure à l'aide d'un oscilloscope de l'amplitude du signal d'interférence  $A$  et des signaux  $DC$  provenant de la cible ( $O$ ) et de la référence ( $R$ ) nous a permis à calculer la visibilité relative des franges conformément à la formule :

$$V = \frac{A}{2\sqrt{OR}} \quad (5.4)$$

L'utilisation des quatre lentilles dans le bras de la référence a prouvé être une méthode plus précise pour compenser la dispersion du système parce que les barreaux de verre ne possèdent pas le même indice de réfraction que les lentilles. Ainsi, nous avons trouvé par la compensation de la dispersion avec les lentilles *Thorlabs, AC508-075-B* une résolution longitudinale environ de  $17.55\ \mu\text{m}$ , valeur très proche de celle théorique et une visibilité des franges d'interférence environ 0.6. Cette valeur de la visibilité relative des franges est satisfaisante. L'expérience acquise par l'équipe d'optique appliquée a montré que pour pouvoir obtenir des images de bonne qualité il faut avoir une visibilité au moins de 0.4.

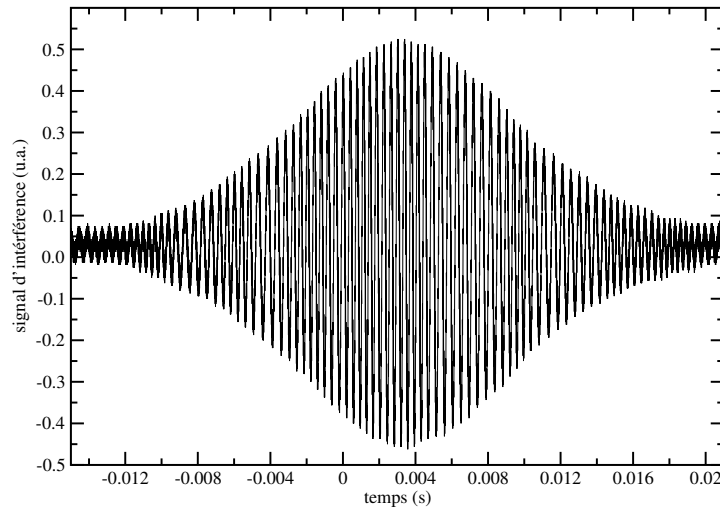


FIG. 5.6 – La variation temporelle du signal d'interférence correspondant à une compensation de la dispersion à l'aide de 4 lentilles Thorlabs, AC508-075-B. Le mouvement de la platine de translation avec une vitesse de 1 mm/s permet d'évaluer une résolution longitudinale de  $17.55 \mu\text{m}$

Finalement, pour compenser la dispersion de l'oeil dans le bras de la référence a été ajouté une cuvette de longueur 40 mm contenant de l'eau.

### La résolution transversale

En principe la résolution transversale du système est déterminée par trois facteurs : la diffraction sur les éléments optiques du système, le nombre limité de pixels qui peut être enregistré et la largeur de bande des dispositifs électroniques de détection, démodulation et gain. Analysons l'impact de ces facteurs sur la résolution transversale de notre système.

Comme on a remarqué dans le chapitre précédente, la limitation de la résolution par les éléments optiques se réduit à  $4.39 \mu\text{m}$  pour un objectif *Melles Griot, 06GLC004*. Ceci est la meilleure résolution transversale qu'on peut attendre de notre système. Malheureusement notre carte d'acquisition ne nous permet d'acquérir qu'un nombre maximum  $N_x=480$  de pixels horizontalement et  $N_y=320$  verticalement. Ainsi pour une dimension de l'image de  $\Delta X 4.2 \text{ mm}$ , on trouve une résolution transversale :

$$\Delta r = \frac{\Delta X}{N_x} = 8.75 \mu\text{m} \quad (5.5)$$

ce qui vaut approximativement le double de la longueur de résolution limitée seulement par diffraction. D'autre part, en pratique on utilise au moins 3 pixels électroniques pour représenter un détail. Cela veut dire qu'en fait, le nombre de pixels qu'il faut considérer est  $N_x=160$ . Comme ce nombre de pixels peut être lié à la largeur de bande de l'image par la relation :

$$B = 2N_x F_x = \frac{2\Delta X F_x}{\Delta r} \quad (5.6)$$

pour une fréquence de 4 KHz du miroir, on trouve une largeur de la bande de l'image environ de 1.28 MHz. Considérant maintenant que la résolution transversale est due seulement à la diffraction, il en résulte qu'on va être capable d'obtenir des images de dimension maximale  $X=702.4 \mu\text{m}$ . L'imagerie des objets de taille supérieure à cette valeur a comme effet l'augmentation de la bande du signal OCT qui devient supérieure à la bande électronique et comme résultat on obtient de résolutions transversales plus petits à la périphérie de l'image qu'en leur centre.

### **Le rapport signal/bruit**

#### *La mesure du rapport signal/bruit*

Afin de mesurer le rapport signal/bruit caractéristique à notre système, nous avons utilisé comme cible du papier blanc. Le choix du papier blanc repose sur le fait que sa réflectivité est comparable à celle de la rétine (environ  $10^{-5}$ ). Le miroir X est arrêté et le miroir Y oscille avec une faible amplitude à une fréquence de 700 Hz. Le rapport signal/bruit est mesuré à l'aide d'un voltmètre large bande ( $B=3 \text{ MHz}$ , *Level Instruments*, modèle *TM6B*) comme étant le rapport entre l'amplitude du signal OCT et l'amplitude du bruit mesuré en bloquant le bras de la cible. Par l'ajustement de la puissance optique dans le bras de la référence nous nous attendons à obtenir conformément au chapitre précédent, un rapport signal/bruit environ de 49.9 dB (typiquement les pertes de lumière sur le système de miroirs vibrants est environ de 18% ; à cette perte de lumière il faut ajouter les pertes sur les lentilles  $L_1$ ,  $L_2$  et  $L_3$ ).

Dans la figure 5.7 page suivante nous présentons les valeurs des rapports signal/bruit obtenues pour différentes tensions du signal provenant de la référence en fonction de la puissance optique



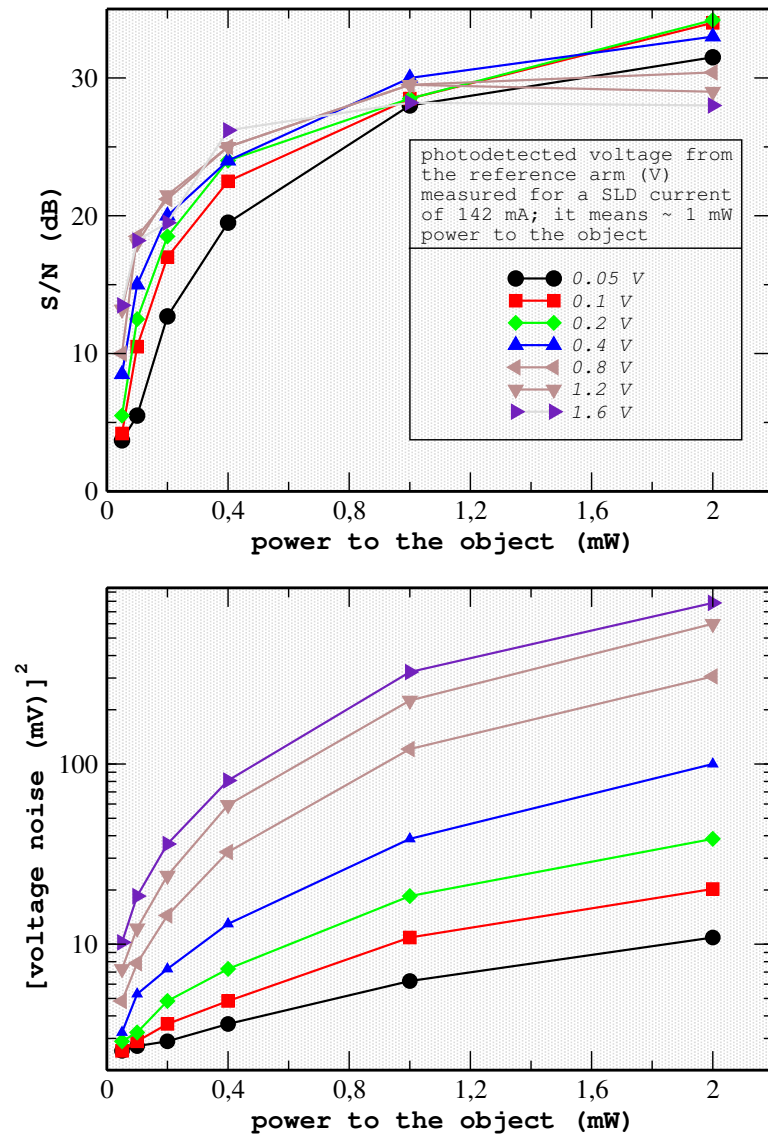


FIG. 5.7 – Les valeurs du rapport signal/bruit pour différentes valeurs de la puissance optique dans le bras de la référence. Le diviseur de faisceaux utilisé est l'un 30/70.

arrivant au niveau de la cible. On peut observer la tendance de saturation du  $SNR$  dès que la puissance arrivant à l'objet devient supérieure à 1 mW. Ceci montre qu'il est pratiquement inutile d'envoyer plus de lumière vers l'objet en vue d'augmenter le  $SNR$  et de la qualité de l'image. On observe qu'en fait la valeur maximale du  $SNR$  se situe approximativement à 34 dB. Il faut remarquer que les résultats de la figure 5.7 ont été obtenus en utilisant le détecteur *Newfocus*, modèle 1607-AC-FC et le diviseur de faisceaux à été 30/70 (30% de la lumière vers la cible). Le

fait que le détecteur utilisé a une largeur de bande électronique bien supérieure à la largeur de bande du signal d'interférence explique la petite valeur du rapport signal/bruit.

*L'effet du bruit de la SLD sur le rapport signal/bruit*

Afin de mieux caractériser le système du point de vue du rapport signal/bruit nous avons porté notre attention sur le bruit possible introduit par la SLD. Dans ce but nous avons évalué les quantités  $2eB$  et  $B/\Delta\nu_{eff}$  intervenant dans les formules de calcul du bruit de grenaille et de gain (4.47 et 4.48) grâce à la représentation graphique de la dépendance de  $\langle \Delta I^2 \rangle$  avec  $\langle I \rangle$ . Les résultats sur l'étude du bruit propre de la diode superluminescentes sont présentés dans la figure 5.8 page suivante et le schéma du dispositif électronique utilisé pour la mesure de l'intensité du courant de bruit est présentée sur la figure 5.9 page 159. Le signal est mesuré à la sortie d'un des bras du coupleur DC qui est couplé à un photodétecteur possédant une résistance de charge de 10 kΩ. Après filtrage, le bruit est mesuré à l'aide d'un voltmètre large bande ( $B=3$  MHz) et le signal DC à l'aide d'un oscilloscope. Si nous négligeons le bruit thermique, alors on peut exprimer le bruit par la relation :

$$\langle \Delta I^2 \rangle = 2eBI_{DC} + \frac{B}{\Delta\nu_{eff}} I_{DC}^2 \quad (5.7)$$

où nous avons supposé que le facteur  $\Pi$  tenant compte de la polarisation est nul. Dans ces conditions la dépendance  $\langle \Delta I^2 \rangle = f(I_{DC})$  pour des valeurs petites du courant ( $I_{DC} < 10\mu A$ ) doit être linéaire. Un simple calcul nous montre que la pente de la dépendance est  $\alpha = 18.57 \times 10^{-12}$  A d'où une largeur de bande  $B=57$  MHz, très loin de la valeur attendue de 3 MHz. D'autre part la dépendance  $\langle \Delta I^2 \rangle = f(I_{DC}^2)$  doit être aussi linéaire pour les grandes valeurs de  $I_{DC}$ . La pente qu'on a trouvé dans ce cas a été  $\beta = 2.98 \times 10^{-8}$ , d'où  $\Delta\nu = 100$  THz, d'où une pente neuf fois supérieure à la théorie.

Conclusions :

- ✗ Le bruit de grenaille (*shot-noise*) caractérisant le système se situe au dessus des limites correctes d'un facteur 20. Une telle valeur était attendue parce que la largeur de bande de détection est plus grande que la largeur de bande des signaux générés.
- ✗ Le bruit de gain (*excess-photon-noise*) caractéristique à notre système est neuf fois inférieur

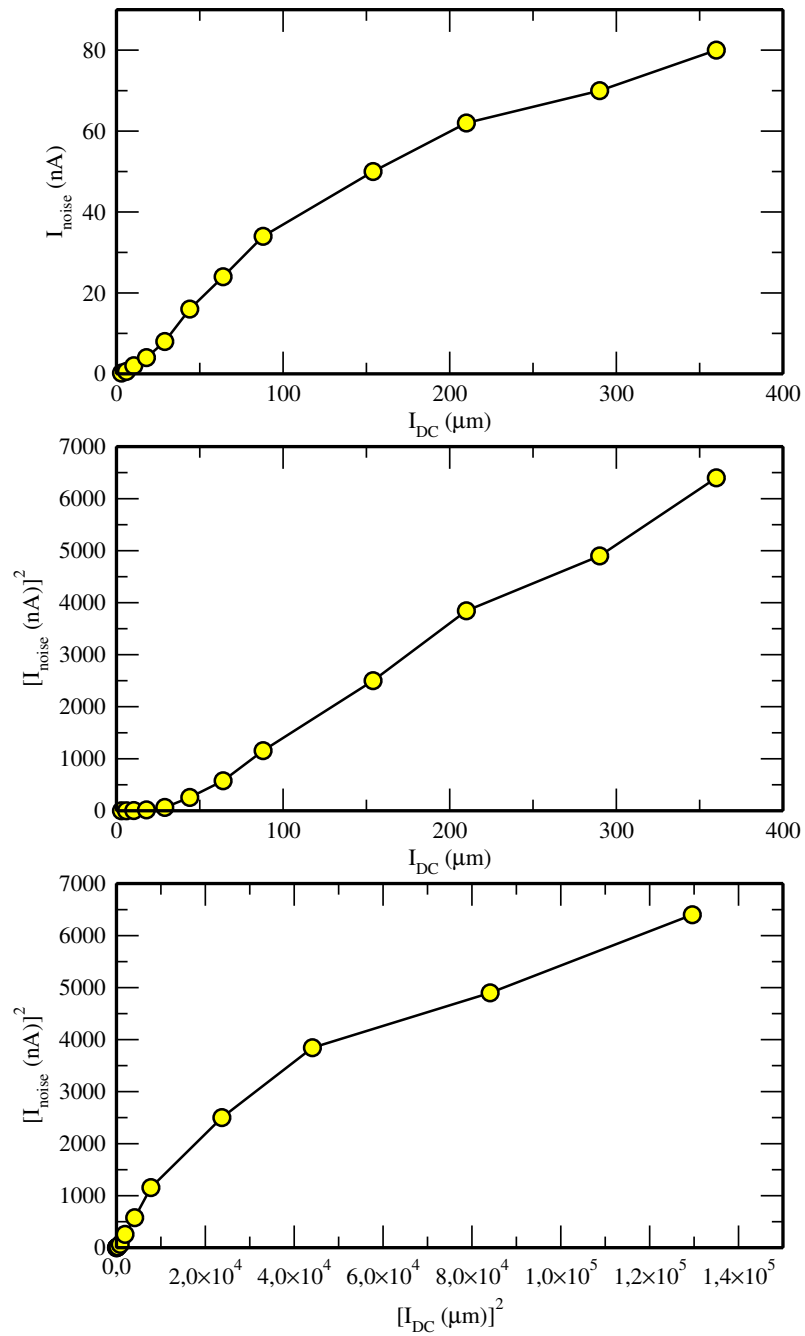


FIG. 5.8 – La caractérisation du point de vue du bruit de la diode superluminescente.

à la valeur prévue théoriquement. L'explication de ce résultat pourrait être le fait qu'on a considéré que la lumière émise par la diode superluminescente est non polarisée et par les éventuelles erreurs de mesure.

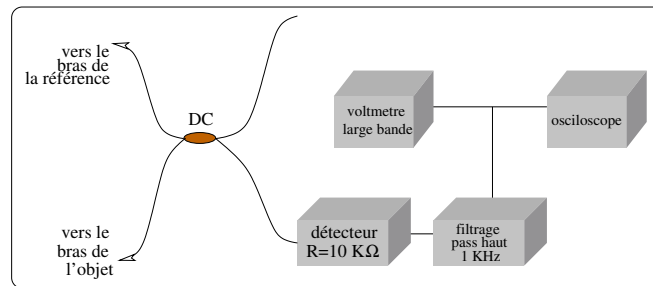


FIG. 5.9 – Le schéma du dispositif utilisé pour la caractérisation du point de vue du bruit de la SLD.

Par ailleurs, la SLD semble avoir un comportement normale du point de vue du bruit propre que peut l'introduire.

Cependant, le changement du driver de la SLD nous a permis d'améliorer le SNR et l'utilisation d'un détecteur de largeur de bande plus petite *New Focus, modèle Nirvana 2007*, nous a permis d'obtenir un rapport signal/bruit environ de 44 dB, très proche donc de la valeur attendue. Il faut quand même remarquer que cette valeur a été trouvée pour une puissance du rayonnement optique au niveau de l'objet de  $\sim 1.6$  mW. Cette grande puissance nécessaire pour obtenir un rapport signal/bruit acceptable montre que dans le bras de la cible il y a des pertes de lumière supplémentaires. Cette affirmation a été confirmée par nos mesures : normalement, les pertes de lumière sur les deux miroirs vibrants devraient être environ de 15-18%, or nos mesures ont montré une valeur environ de 25%.

#### *L'effet du diviseur de faisceaux sur le rapport signal/bruit*

Afin d'améliorer le SNR nous avons focalisé notre attention dès le début sur le choix du diviseur de faisceaux. De l'expérience de l'équipe d'optique appliquée on savait que les meilleurs résultats sont obtenus avec le diviseur 30/70. Pour notre système nous sommes arrivés à la conclusion qu'un diviseur 30/70 n'améliore pas les résultats, les performances de notre dispositif étant comparables à celles d'un dispositif utilisant un diviseur de faisceaux 10/90. En fait un diviseur 30/70 récupère moins de la lumière provenant de la cible qu'un diviseur 10/90 et il semble qu'en pratique il faut utiliser ce dernier. Cependant, le diviseur 10/90 exige des sources plus puissantes pour avoir la même puissance lumineuse arrivant à l'objet que pour un diviseur 30/70.

De plus, en vue de l'amélioration du rapport signal/bruit nous avons étudié en quelle manière

le remplacement du diviseur de faisceaux par un cube polarisant peut avoir des effets sur la qualité des images recueillies. Le dispositif remplaçant le diviseur est présenté dans la figure 5.10. Pour

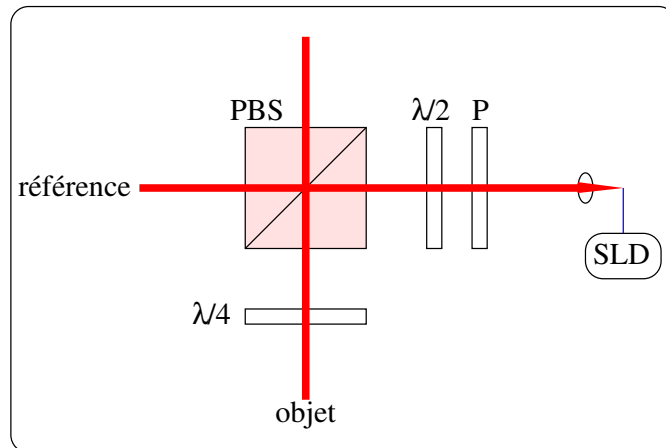


FIG. 5.10 – Le remplacement du diviseur de faisceau par un système composé d'un cube polarisant.

nous assurer qu'on utilise de la lumière parfaitement polarisée, après la *SLD* on place un polariseur *P*. Entre le polariseur et le cube polarisant *PBS* on place une lame  $\lambda/2$  et entre le *PBS* et les miroirs vibrants une lame  $\lambda/4$ . L'avantage d'un tel montage provient du fait que par la rotation de la lame  $\lambda/2$  pratiquement on peut varier la puissance lumineuse arrivant à la cible de 0 à la puissance émise par le laser. D'autre part il n'y a pratiquement pas de pertes de lumière provenant des miroirs vibrants vers la fibre collectrice du coupleur *DC* dans le *PBS* dans les conditions où comme cible on utilise un miroir. En réalité nos mesures ont montré que ces pertes de lumière sont environ de 20%, dont 6% sont dues à la réflexion sur la lame  $\lambda/4$ . La raison est probablement liée au fait que la lumière traversant le système n'est pas parfaitement polarisée. Par ailleurs, l'amélioration du rapport signal/bruit n'est pas possible en utilisant ce système. Nos expérimentations ont prouvé cette conclusion, mais l'idée d'utiliser le *PBS* est quand même intéressante parce qu'on peut remplacer la source par une autre ayant une puissance plus basse, une largeur spectrale plus large et bien sûr un prix moins coûteux.

#### *La contribution des photons de classe II au bruit du système*

A coté de sources de bruit dont on a discuté, il faut aussi considérer un autre type de bruit : le bruit dû au fait que les photons détectés ne sont pas forcément seulement de photons provenant

de la zone d'intérêt qui ont subi un seul processus de diffusion mais aussi de photons provenant de zones situées au dessus de la zone d'intérêt subissant plusieurs processus de diffusion et pour lesquels la condition de cohérence est aussi remplie [8],[5],[9].

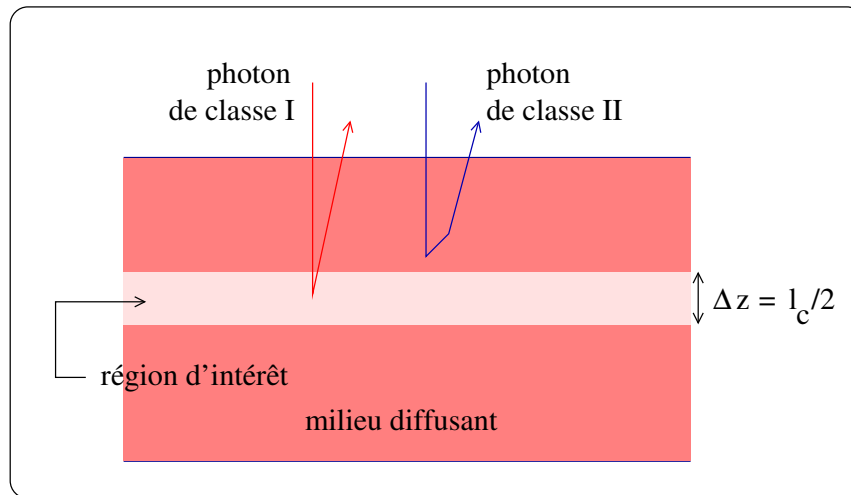


FIG. 5.11 – *Simulations de Monte Carlo. La classification des photons détectés en deux classes.*

En fait on peut classifier les photons détectés en deux classes :

- ✗ *photons de classe I* qui se réfèrent aux photons diffusés dans une région donnée  $\Delta z$  (figure 5.11) correspondant à une profondeur en milieu pour laquelle  $OPD=0$ . Ils sont les photons donnant naissance au signal OCT utile.
- ✗ *photons de classe II* se réfèrent aux photons qui n'arrivent pas dans la zone d'intérêt mais pour lesquels la condition de cohérence est remplie à cause de processus de diffusion multiples. Ces photons sont aussi détectés et représentent une source de bruit.

Nous avons étudié l'amplitude de l'effet des photons de classe II sur le  $SNR$  par simulation numérique de Monte Carlo. Dans nos simulations, typiquement un nombre de  $10^8$  photons sont injectés dans le milieu à l'aide d'une fibre optique de  $5 \mu\text{m}$  de diamètre et d'ouverture numérique 0.1 placée en dessus du milieu diffusant. Cette fibre a aussi rôle de récepteur. Par simplicité, le milieu d'étude est considéré non absorbant, caractérisé par un coefficient de diffusion  $\mu_s=2.0 \text{ mm}^{-1}$  et un coefficient d'anisotropie  $g=0.9$ . La source de rayonnement optique est caractérisée par une longueur de cohérence de  $35.82 \mu\text{m}$ . Les résultats d'une telle simulation numérique sont présentés

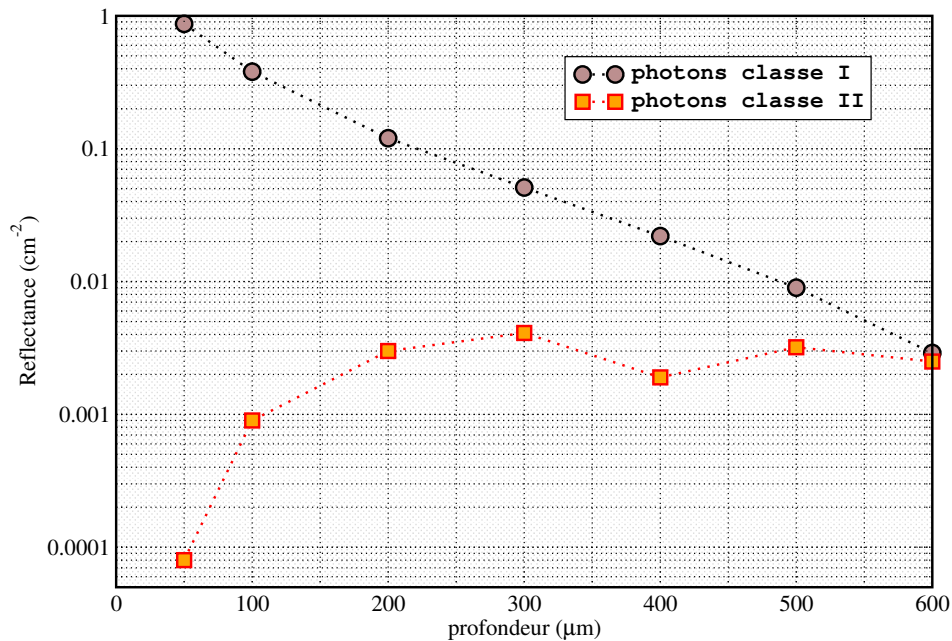


FIG. 5.12 – Simulations de Monte Carlo. La dépendance de la réflectance en fonction de la profondeur d'intérêt pour les deux classes de photons avec la profondeur dans la cible.

dans la figure 5.12 où on représente la dépendance de la réflectance  $R$  définie par :

$$R = \frac{\text{nombre photons détectés}}{\text{nombre photons lancés} \times \text{surface détecteur}} \quad (5.8)$$

avec la profondeur d'intérêt en milieu. Comme on peut le constater, le bruit dû aux photons de classe II est presque négligeable pour les petites profondeurs, mais devient important pour des profondeurs de 500-600  $\mu\text{m}$  lorsque le signal dû aux photons de classe I est comparable au signal des photons utiles. Comme dans toutes nos expérimentations on a mesuré le  $SNR$  quand la cible est du papier blanc, la profondeur de pénétration n'étant pas grande, la contribution des photons de classe II au bruit total est négligeable. C'est n'est pas le cas d'oeil.

Un aspect intéressant résultant des simulations numériques est lié au nombre de processus de diffusion subis par les photons détectés. Même s'il est attendu que les photons utiles subissent un seul processus de diffusion (vers l'arrière), ceci n'est pas totalement vrai, comme le montre la figure 5.13. Dans ces simulations nous avons utilisé les mêmes paramètres caractérisant la fibre

optique, le milieu et la source de lumière qu'auparavant. On constate que pour une profondeur

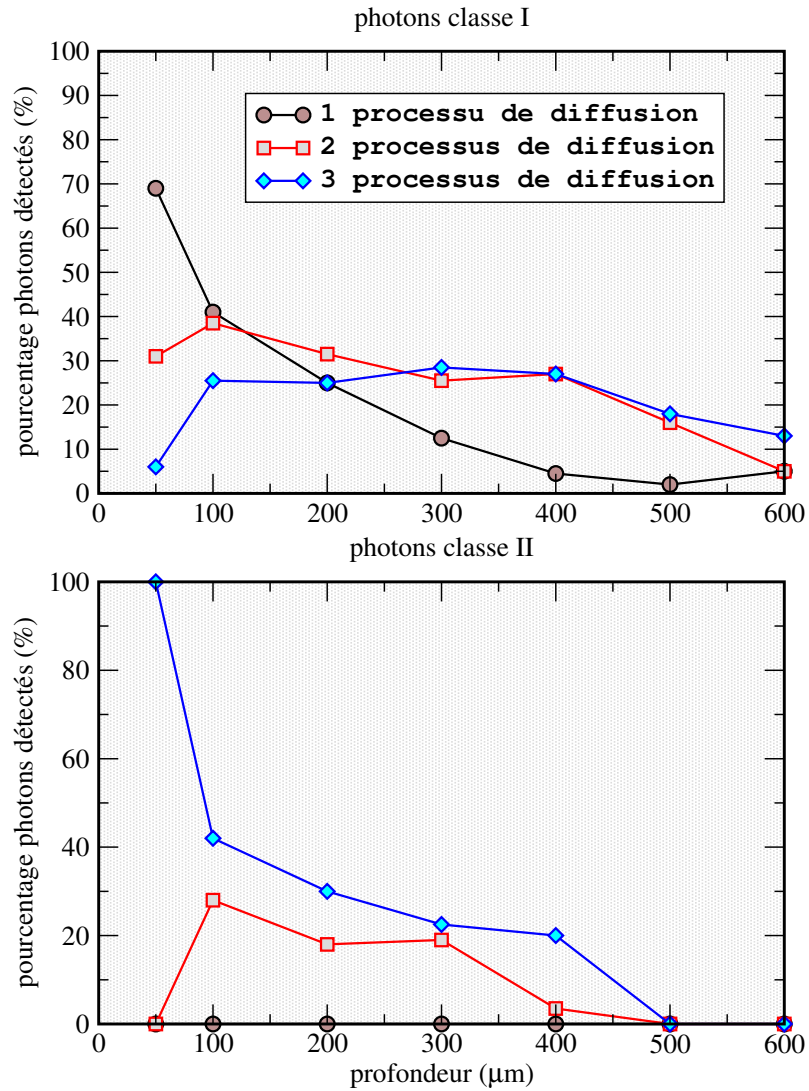


FIG. 5.13 – Simulations de Monte Carlo. La dépendance du pourcentage des photons de classe I (en haut) et II (en bas) subissant 1,2 ou 3 processus de diffusion.

de 50  $\mu\text{m}$ , seulement 65% des photons utiles sont des photons subissant un seul processus de diffusion et que pour des grandes profondeurs (500-600  $\mu\text{m}$ ) pratiquement tout les photons utiles subissent plusieurs diffusions. Logiquement, les photons de classe II vont subir plus de processus de diffusion que les photons de classe I.



### 5.3.2 Études sur la largeur de bande du signal généré par le miroir résonant

Il est bien connu que les limites imposées par la largeur de bande du signal OCT ainsi que le bruit ne permettent pas d'acquérir des images de l'intérieur de l'oeil au delà de quelques Hz. C'est pour cela que nous avons envisagé d'évaluer la largeur de bande nécessaire pour la génération des images transversale en utilisant un miroir résonant à 4 KHz.

Dans notre système de tomographie optique cohérente le miroir X produit les lignes rapides de l'image (*t-scan*). Ainsi à l'aide d'une ligne *t-scan* nous pouvons produire une image *b-scan* lorsque le miroir X produit une ligne *t-scan* et le miroir axial avance très lentement en profondeur le long de l'axe z. Cette procédure a l'avantage (comparativement aux images *b-scan* ayant à la base des lignes *a-scan* où le balayage rapide se fait au long de l'axe z) qu'elle permet que les images OCT transversales soient produites pour une longueur fixe de la référence. La vitesse du miroir lent va déterminer la vitesse d'acquisition des images ; ainsi nous collectons différentes *tranches* aux différentes profondeurs. La vitesse de pénétration doit être inférieure à la vitesse d'acquisition. Ainsi, la vitesse d'avancement dans le tissu devra être telle que durant l'acquisition de l'image la variation en profondeur ne soit pas supérieure à la moitié de la longueur de cohérence.

Pour augmenter la vitesse d'acquisition des images transversales nous avons utilisé un miroir résonant. Parce que son utilisation implique la croissance de la largeur de bande du signal tandis que du bruit, nous avons fait quelques études sur la largeur de bande du signal OCT dans les conditions où le faisceau lumineux est hors d'axe des miroirs.

#### Mesures de la largeur de bande du signal OCT

Dans la figure 5.14 page suivante nous présentons les spectres des signaux obtenus en utilisant le détecteur *Newfocus, modèle 1607-AC-PC* et un analyseur de spectres *HP8590A*. Comme on peut le constater, pour une dimension de l'image de 1.3 mm la largeur de bande du signal recueilli a été environ de 6 MHz, pour 2.6 mm, ~9 MHz et pour 4.2 mm, ~12 MHz. Pour obtenir ces spectres, afin de réduire la dimension du faisceau lumineux, nous avons utilisé pour introduire le rayonnement optique dans le système un objectif 20X, avec un diamètre du faisceau lumineux de ~3.5 mm. Les spectres nous montrent que les détecteurs qu'on a utilisé ont une largeur de bande

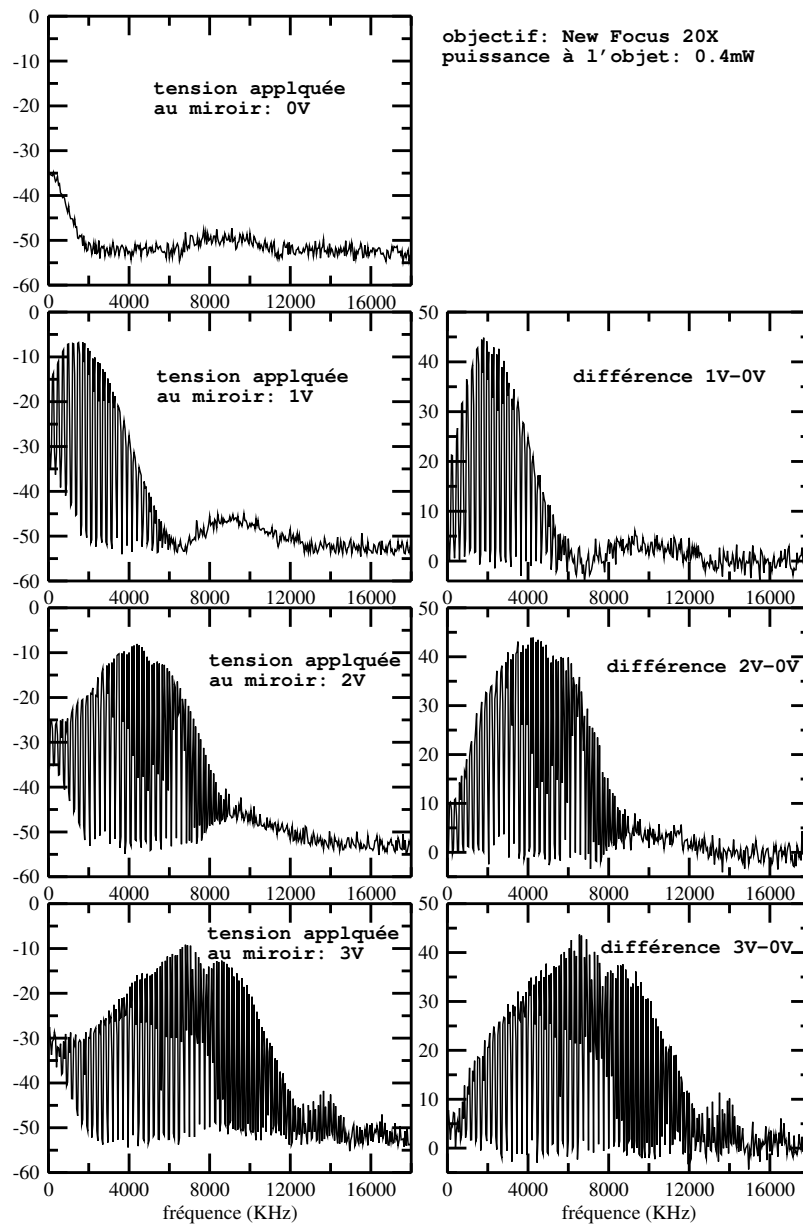


FIG. 5.14 – Les spectres des signaux obtenus lorsque le faisceau de diamètre 3.5 mm est à l'extrémité du miroir résonant.

trop large, un détecteur ayant une largeur de bande environ de 50 MHz étant suffisant. D'ailleurs, cette chose est bien mise en évidence dans des études concernant les calculs du *SNR*.

Considérant que la résolution transversale du système est  $4.39 \mu\text{m}$  on trouve à l'aide de la relation 5.6 page 155 que les largeurs de bande de l'image correspondant aux trois dimensions de l'image sont respectivement 2.37, 4.73 et 7.65 MHz. Ce résultat montre que la largeur de

bande électronique du détecteur qu'on utilise ne doit pas être supérieure à environ 15 MHz, la conséquence de l'utilisation d'un détecteur de large bande étant l'augmentation du bruit dans le système.

### L'effet de la dimension du faisceau

Afin de compléter tous les renseignements sur le système, nous analysons dans quelle mesure la largeur de bande du signal et la fréquence du porteur se modifient lorsque on diminue la dimension du faisceau.

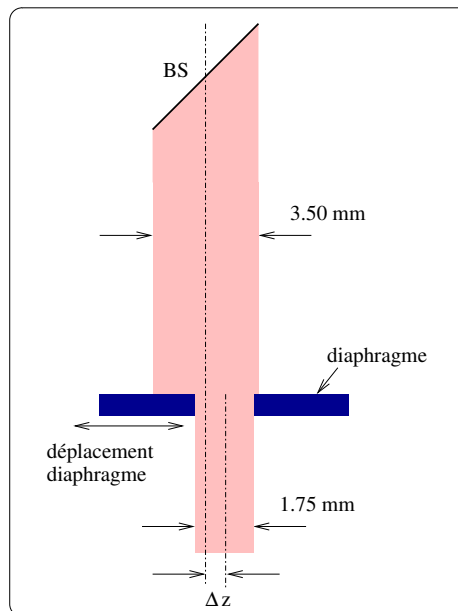


FIG. 5.15 – Diagramme représentant le déplacement horizontale de la diaphragme circulaire, perpendiculaire à l'axe du faisceau lumineux..

Dans ce but, le faisceau ayant un diamètre de  $\sim 3.5$  mm a été focalisé sur l'extrémité du miroir résonant. Entre le diviseur de faisceaux *BS* et le système de miroirs on a introduit un diaphragme de diamètre variable. Par déplacement horizontal du diaphragme on peut sélectionner différentes régions du faisceau. Ce mouvement est en fait équivalent au déplacement du faisceau laser entre points situés à l'extrémité du miroir (voir la diagramme de la figure 5.15).

Des résultats typiques obtenus sont présentés sur la figure 5.16 page suivante. Comme la tension appliquée au miroir résonant a été approximativement de 2 V, on trouve une largeur de bande

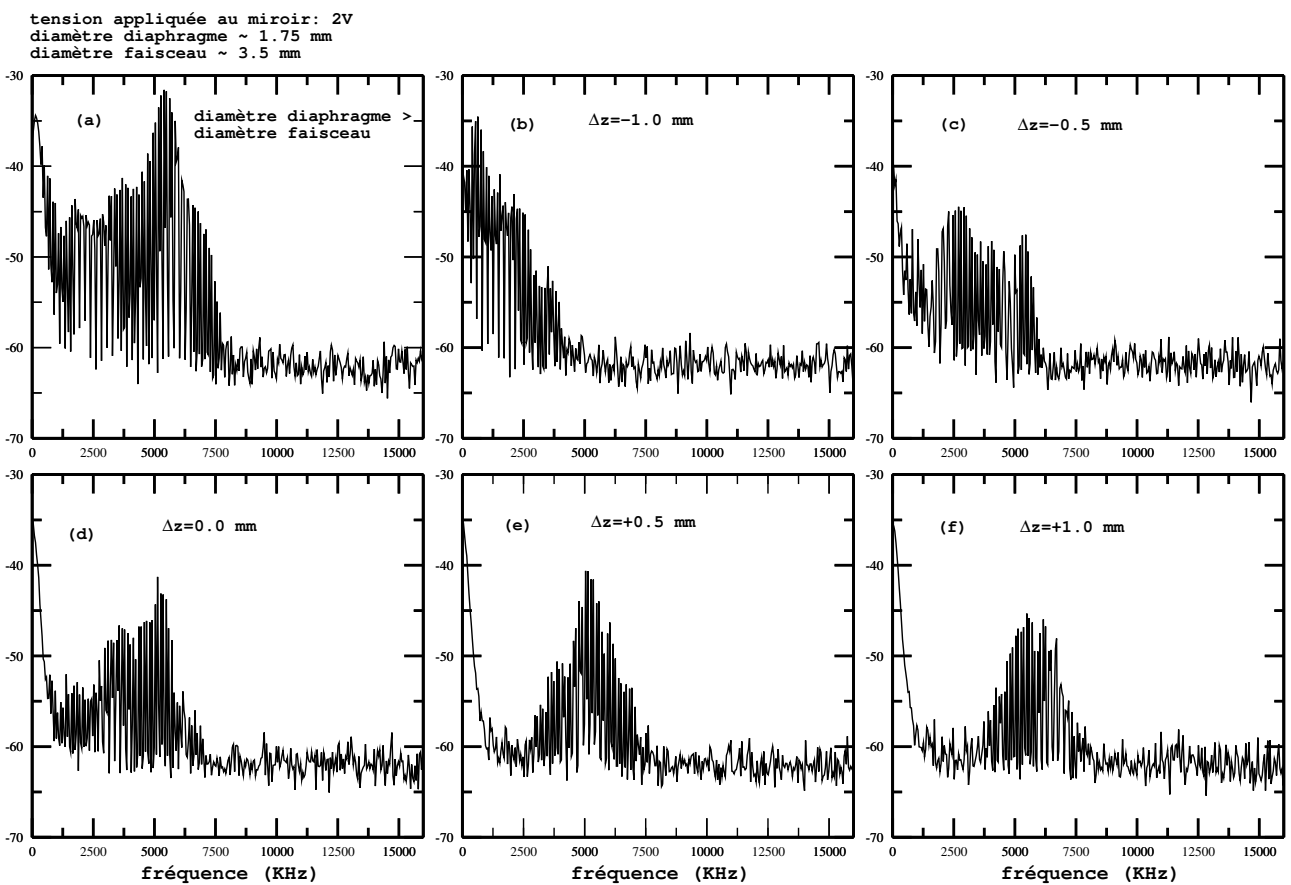


Fig. 5.16 – Les spectres des signaux obtenus lorsque le faisceau lumineux de diamètre 1.75 mm est envoyé à différentes distances du centre du miroir résonant (b,c,d,e,f). Le cas (a) correspond à une situation d'un faisceau de diamètre 3.5 mm envoyé au centre du miroir.

du signal de  $\sim 9$  MHz lorsque le faisceau est large. La réduction du diamètre du faisceau d'un facteur 2 a comme résultat de diminuer la largeur de bande du signal approximativement de même facteur 2 et le déplacement du diaphragme le long du faisceau a comme résultat un effet que nous

attendions : la modification de la fréquence du porteur. Ainsi, par le déplacement du pinhole entre les extrémités on déplace le porteur de 3 MHz quand le pinhole est positionné à l'extrémité gauche du faisceau (1 mm du centre du faisceau) à 4 MHz à 0.5 mm, tandis que le déplacement vers la droite déplace la fréquence du porteur à 6 MHz et 7 MHz pour des positions des pinholes à 0.5 et 1.0 mm respectivement du centre du faisceau. D'autre part il faut remarquer que tout au long du déplacement la largeur de bande du signal est restée approximativement constante ( $\sim 4$  MHz) avec un porteur fixé à 5 MHz lorsque  $\Delta z = 0$ , position identique à la position du porteur quand le faisceau lumineux est large. De plus, l'effet de la diminution de la largeur du faisceau se manifeste à coté de la modification de la largeur de bande par une diminution de l'intensité du signal.

*Ces expérimentations nous confirment le fait que nous pouvons adapter la fréquence du porteur et la largeur de bande du signal au système de détection dont on dispose.*

Dans la figure 5.17 page suivante nous présentons quelques images transversales obtenues en utilisant comme objet une pièce de monnaie. Le faisceau de diamètre 3.5 mm est positionné à l'une des extrémités du miroir vibrant. La tension appliquée au miroir résonant a été de 1V pour les cas a et b et 2V pour c et d d'où la dimension des images d'environ de  $1.3 \times 1.0$  mm. Dans les cas des images a et c la largeur de bande du filtre passe bas, *BPF* est 1 MHz tandis que pour les cas b et d 3 MHz. Les fréquences de fonctionnement du *BPF* sont 0 MHz pour les cas a1 et b1, 1.5 MHz pour a2 et b2, 3.5 pour a3 et b3 et 4.2 MHz pour a4 et b4. Les cas a2 et b3 correspondent aux qualités maximales des images. En augmentant la fréquence du *BPF* les images disparaissent à 4.8 MHz dans le cas où la largeur de bande du *BPF* est 1 MHz et à 8.7 MHz lorsque la largeur de bande du *BPF* est 3 MHz. Lorsque nous avons appliqué 2V au miroir résonant, nous avons eu : 0 MHz pour les cas c1 et d1, 2.3 MHz pour c2 et d2, 4.7 MHz pour c3 et d3 et 7.6 MHz pour c4 et d4. Les meilleures images sont c2 et d3. Les images disparaissent pour des fréquences du *BPF* de 8.3 MHz et 9.7 MHz pour le cas où la largeur de bande du *BPF* a été 1 MHz et 3 MHz respectivement.

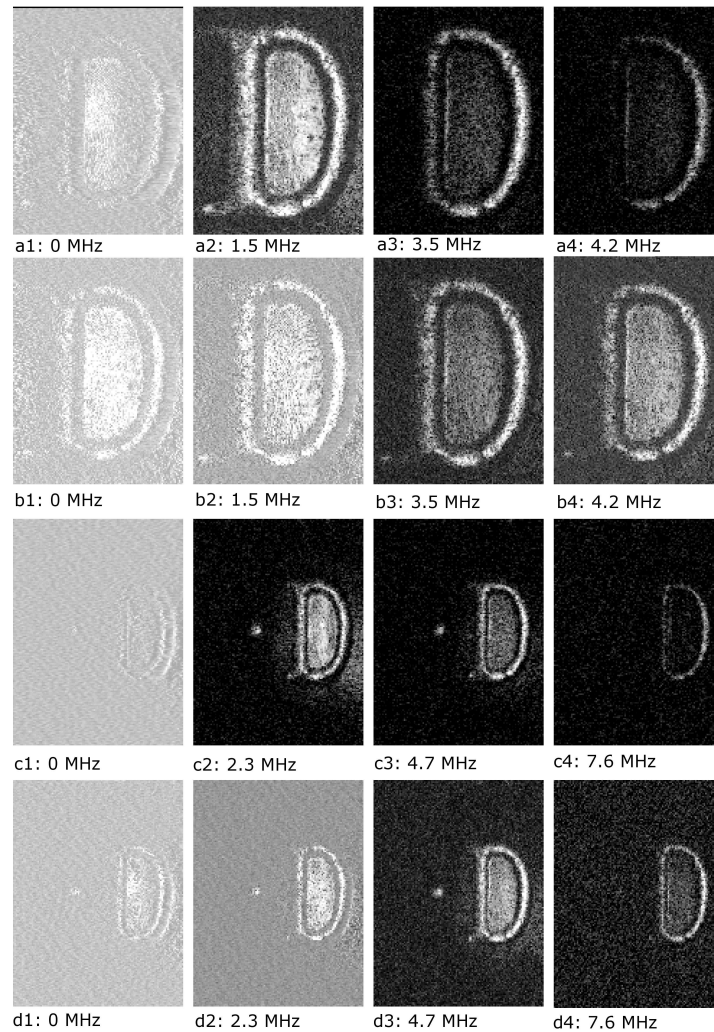


FIG. 5.17 – Images transversale d'une pièce de monnaie pour différentes fréquences du BPF. Les cas *a* et *b* correspondent à une tension appliquée au miroir résonant de 1 V tandis que *c* et *d* de 2V. Le faisceau lumineux est positionné à l'une des extrémités du miroir vibrant.

### Conclusion

Nous avons démontré expérimentalement que la largeur de bande du signal généré par un système OCT utilisant le miroir résonant peut être de l'ordre à 12 MHz, ce qui impose l'utilisation d'un détecteur à large bande, d'où un rapport signal/bruit petit. L'utilisation d'un faisceau lumineux de diamètre petit semble être une solution (cependant, dans ce cas on réduit le pouvoir de résolution transversale). Ainsi, on conclue que la souplesse du système dans le choix de la

fréquence du porteur et de la largeur de bande du signal OCT transversale fait que l'utilisation d'un miroir résonant dans un système OCT soit une solution fiable pour la génération des images transversales rapides.

### 5.3.3 Fonctionnement séquentiel SLO-OCT

La manière de réalisation du système permet de commuter le mode de fonctionnement de OCT en SLO. En fait, pour que le système travaille comme un microscope confocal il suffit de bloquer la référence. Une synchronisation de la fréquence d'obturation de la référence avec le temps enregistrement des images OCT peut conduire à l'idée d'envisager de produire simultanément des images SLO et OCT [7]. L'avantage d'un tel système est qu'on peut aisément comparer les images OCT aux images SLO pour lesquelles il y a déjà une très importante base de données, d'où une facilité d'interprétation des images.

Comme illustration du fonctionnement SLO nous présentons l'image de la figure 5.18 représentant la lettre 5 d'une pièce de monnaie. La dimension approximative de l'image est  $1.3 \times 1.0$  mm.



FIG. 5.18 – Exemple d'image transversale SLO d'une pièce de 5p.

L'un des avantages d'obtenir aisément des images SLO est qu'en utilisant cette image on peut plus facilement aligner le système : les lentilles  $L_1$ ,  $L_2$  et  $L_3$  sont assez facile à aligner juste par la poursuite de l'image SLO (en fait on voit les réflexions des lentilles). D'autre part il est très facile de faire coïncider la position de l'image SLO avec la position de l'image OCT : on fixe la position pour laquelle l'image SLO est de qualité maximale et on bouge la référence jusque à ce

qu'on trouve le signal de cohérence.

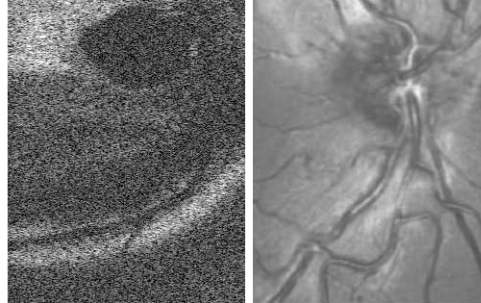


FIG. 5.19 – Exemples images transversales OCT (gauche) et SLO (droite) d'intérieur de l'oeil. On peut reconnaître le nerf optique.

Des exemples d'images transversales in vivo, obtenues par OCT et par SLO sont présentées dans la figure 5.19. En fait dans la figure il est présentée une image de la rétine avec l'oeil orienté de sorte que le nerf optique soit amené vers le centre de l'image. La dimension de l'image est environ de  $2 \times 2.5$  mm.

### 5.3.4 Fonctionnement en mode b-scan

Pour que le système fonctionne en mode longitudinal (*b-scan*), il faut arrêter d'une part le miroir rapide (le miroir résonant dans notre cas) et d'autre part augmenter la fréquence du miroir lent à 700 Hz. Par le déplacement de la référence nous arrivons à obtenir des images longitudinales des objets. Des exemples d'images longitudinales sont présentés dans les figures 5.20 et 5.21. Dans le première cas l'objet d'étude a été l'oeil, plus précisément la rétine et dans le deuxième cas la peau.

## 5.4 Conclusions

Dans ce chapitre nous avons présenté des aspects théoriques et expérimentaux sur les possibilités offertes par la tomographie optique cohérente pour l'imagerie des tissus biologiques.

Les études expérimentales ont consisté dans la mise en oeuvre d'un système OCT capable de produire des images de haute qualité très rapide. Ce système à l'heure actuelle est complètement



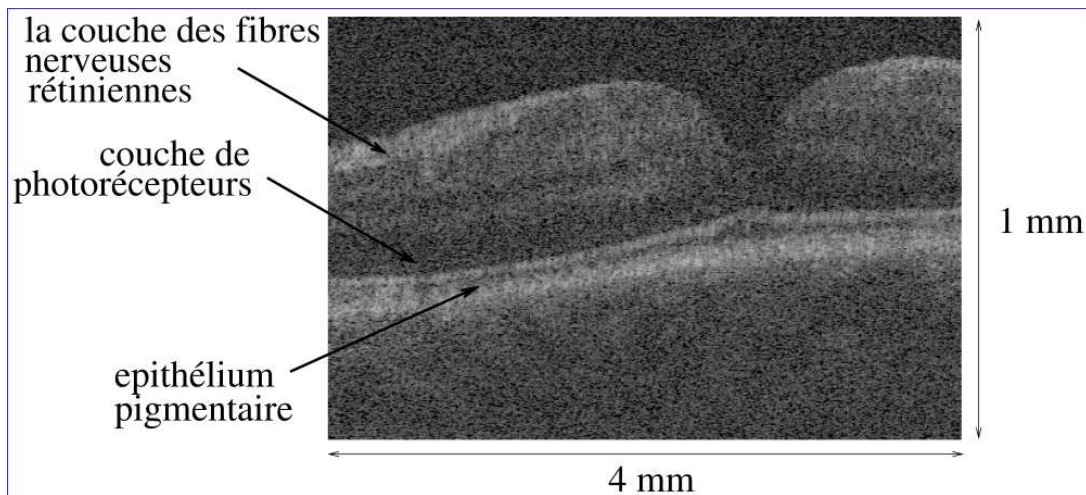


FIG. 5.20 – Exemple d'image longitudinale OCT (b-scan) de la rétine obtenu à l'aide de notre dispositif expérimental.

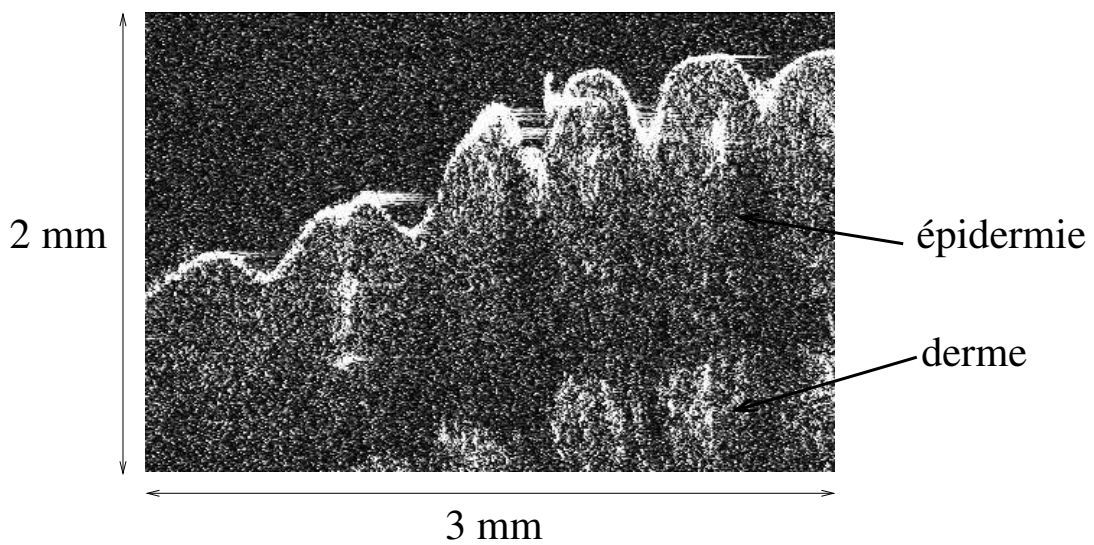


FIG. 5.21 – Exemple d'image longitudinale OCT (b-scan) de la peau (doigt) obtenu à l'aide de notre dispositif expérimental.

fonctionnel et capable de produire :

- ✓ des images *SLO* de haute qualité
- ✓ des images *OCT* transversales de résolution de l'ordre à quelques dixièmes de micromètres
- ✓ des images quasi séquentielles *OCT-SLO*
- ✓ des images longitudinales (*b-scan*)

Bien que le système peut déjà fonctionner avec un rapport signal/bruit supérieur à 40 dB, ce rapport peut encore être amélioré. Pour cela il faut envisager le remplacement des miroirs, une éventuelle utilisation d'un miroir résonnant fonctionnant à 2 KHz (pour éviter les problèmes électroniques de la détection). D'autre part en vue d'éliminer la réflexion sur les lentilles dans le bras de la cible on pourrait envisager leur remplacement par des miroirs. De plus, il faudrait envisager la séparation des miroirs vibrants et l'intégration de l'instrumentation optique spécifique à l'optique adaptative afin d'améliorer la résolution transversale par l'élimination des aberrations optiques de l'oeil.

A ce moment, à notre connaissance, le système *OCT* le plus rapide qui existe est capable de produire 54 images/seconde [3]. En fait pour produire une image 3D ce système enregistre 64 images transversales de  $256 \times 128$  pixels en 1.2s et pour augmenter la fréquence du signal en vue de l'amélioration de la résolution il utilise un modulateur acousto-optique placé dans le bras de la référence.

La construction d'un système *OCT* pour l'oxymétrie oculaire est un grand défi. Il existe déjà des oxymètres oculaires couplés à la microscopie confocale, des appareils comme *EOX-2* ou *EOX-3* étant déjà utilisés en clinique [4],[2]. Le défi a été accepté par les scientifiques travaillant dans le domaine de l'OCT [6], [1] et nous avons la certitude que dans le future proche on va parler *d'oxymétrie par tomographie optique cohérente*.

## Bibliographie

- [1] D.J. Faber, E.G. Mik, M.C.G. Aalders, F.J. van der Meer, and T.G. van Leeuwen. Blood oxygenation measurements with Optical Coherence Tomography. *SPIE.Proc.*, 4251 :128–134, 2001.
- [2] L. Heaton, M.H. Smith, K.R. Denninghoff, and L.W. Hillman. Handheld four-wavelength retinal vessel oximeter. *Proc.SPIE*, 3908 :530–537, 2000.
- [3] C.K. Hitzenberg, P. Trost, P.W. Lo, and Q. Zhou. Three dimensional imaging of the human retina by high speed OCT. *Optics Express*, 11 :2753–2761, 2003.
- [4] A. Lampado, M.H. Smith, L.W. Hillman, and K.R. Denninghoff. Multi-spectral confocal scanning ophthalmoscope for retinal oximetry. *Proc.SPIE*, 3920 :1753–1760, 2000.
- [5] T. Lindmo, D.J. Smithies, Z. Chen, J.S. Nelson, and T.E. Miller. Accuracy and noise in optical doppler tomography studied by Monte Carlo simulation. *Phys.Med.Biol.*, 43 :3045–3064, 1998.
- [6] U. Morgner, W. Drexler, F.X. Kartner, X.D. Li, C. Pitris, E.P. Ippen, and J.G. Fujimoto. Spectroscopic Optical Coherence Tomography. *Opt.Lett.*, 25(2) :111–113, 1999.
- [7] A.Gh. Podoleanu and D.A. Jackson. Combined optical coherence tomograph and scanning laser ophthalmoscope. *Electro.Lett.*, 34(11) :1088–1089, 1998.
- [8] D.J. Smithies, T. Lindmo, Z. Chen, J.S. Nelson, and T.E. Miller. Signal attenuation and localization in Optical Coherence Tomography studied by monte carlosimulation. *Phys.Med.Biol.*, 43 :3025–3044, 1998.
- [9] G. Yao and L. Wang. Monte Carlo simulation of an Optical Coherence Tomography signal in homogeneous turbid media. *Phys.Med.Biol.*, 44 :2037–2320, 1999.

---

## Conclusions et perspectives

---

Au long de ce travail de thèse nous avons abordé des aspects théoriques et expérimentaux liés à la propagation du rayonnement optique en milieu diffusant, catégorie dans laquelle s'inscrit les tissus biologiques. En principe nous avons abordé deux aspects relativement distincts : d'une part des problèmes liés à la spectrophotométrie *in vivo* du tissu cérébral à l'aide des sondes optiques aiguilles et d'autre part nous avons utilisé les propriétés cohérentes de la lumière pour nous intéresser à l'imagerie des tissus biologiques.

### *Spectrophotométrie en milieux diffusants*

Nos préoccupations se sont focalisées sur la mise au point d'un système spectroscopique utilisant une sonde miniature à fibres optiques capable de mesurer l'oxygénation locale du sang dans le tissu cérébral. Les études ont prouvé qu'une telle technique peut être utilisée pour des mesures fiables des variations temporelles de la saturation en oxygène ou des concentrations des hémoglobines. Les mesures absolues oxymétriques restent encore un défi pour les scientifiques. La technique proposée nous avons essayé de la valider par études *in vivo* de l'oxygénation locale dans le cerveau des animaux trouvés en conditions d'hypoxémie graduée ou ischémie or par la comparaison des données spectroscopiques avec des résultats obtenus utilisant des techniques déjà consacrées et utilisées à large échelle dans le domaine médical (*LDF, RMN*). A côté des études *in vivo*, notre intérêt a été lié et d'autres aspects concernant la spectroscopie du milieu bio-

logique comme la sous estimation de l'atténuation du rayonnement optique en milieux troubles où les espèces absorbantes sont compartimentées spatialement.

### *Tomographie Optique Cohérente*

La tomographie optique cohérente est une technique relative récente, utilisée par les scientifiques pour l'imagerie du tissu oculaire. A coté de l'imagerie, l'OCT a potentialité aussi d'être utilisée pour l'oxymétrie du tissu oculaire. Cependant, la mise au point d'un système OCT fonctionnant à plusieurs longueurs d'onde se heurte à des problèmes très sérieux. Nous avons cherché à réaliser un système OCT utilisant un miroir résonant qui peut fournir des images rapides transversales de bonne qualité. Le dispositif expérimental que nous avons réalisé a prouvé sa capacité de fonctionner suivant trois modes : transversal, longitudinal et quasi séquentiel OCT-SLO

### *Perspectives*

L'utilisation de la spectroscopie d'absorption pour des études d'oxygénation des tissus biologiques a l'avantage d'équipements à coût réduit, mais malheureusement la mise au point d'un système capable de fournir des résultats fiables sur la saturation tissulaire en oxygène en différentes conditions expérimentales est une tâche très difficile. Nos études nous ont indiqué quelques directions qu'il faudrait suivre pour l'amélioration du système : l'utilisation du rayonnement optique du domaine proche infrarouge, la connaissance exacte des propriétés optiques du sang et l'effet du son confinement, mise au point des méthodes non invasive, éventuellement par transillumination. D'autre part, nous avons présenté dans ce travail des résultats démontrant les possibilités de la tomographie optique cohérente dans le domaine de l'imagerie du tissu oculaire de produire des images 3D à grande vitesse et haute résolution spatiale. Certainement, un tel système peut être amélioré. Il nous semble que les premiers aspects qu'il faudrait étudier sont ceux liés aux problèmes au niveau de la détection. Enfin, l'utilisation des sources de rayonnement optique de large bande spectrale permet d'envisager l'utilisation de l'OCT pour l'oxymétrie. Il est aussi possible que dans le futur les systèmes OCT remplaceront avec succès les ophtalmoscopes conventionnels utilisés actuellement en clinique.

---

## Simulations de Monte Carlo en conditions de localisation de l'absorbance : aspects techniques

---

Le programme de simulation numérique de Monte Carlo que nous avons réalisé écrit en C++ est compilé avec le compilateur GCC est installé sur un PC (*Athlon, 1.8GHz, 256MHz RAM*) fonctionnant sous *Linux* (noyau 2.6). La durée typique de la simulation dont schéma logique est présentée dans la figure A.1 est environ de 10-15 minutes pour chaque million de photons lancés.

### *La génération du pas du photon*

Dans les simulations de Monte Carlo les plus simples les mouvements des photons se font avec de pas de longueur plus petite que le parcours libre moyen des photons. Pour éviter les problèmes liés au choix de la valeur adéquate du pas<sup>1</sup> nous optons pour un modèle dans lequel le photon

---

<sup>1</sup>Le choix du pas  $l$  du photon dans les simulations de Monte Carlo est un problème délicat. Une valeur trop petite de  $l$  fait que le photon va interagir rarement avec le tissu tandis que une valeur trop grande fait que le photon parcourt des trajectoires qui sont loin de ce qui s'arrive en réalité.

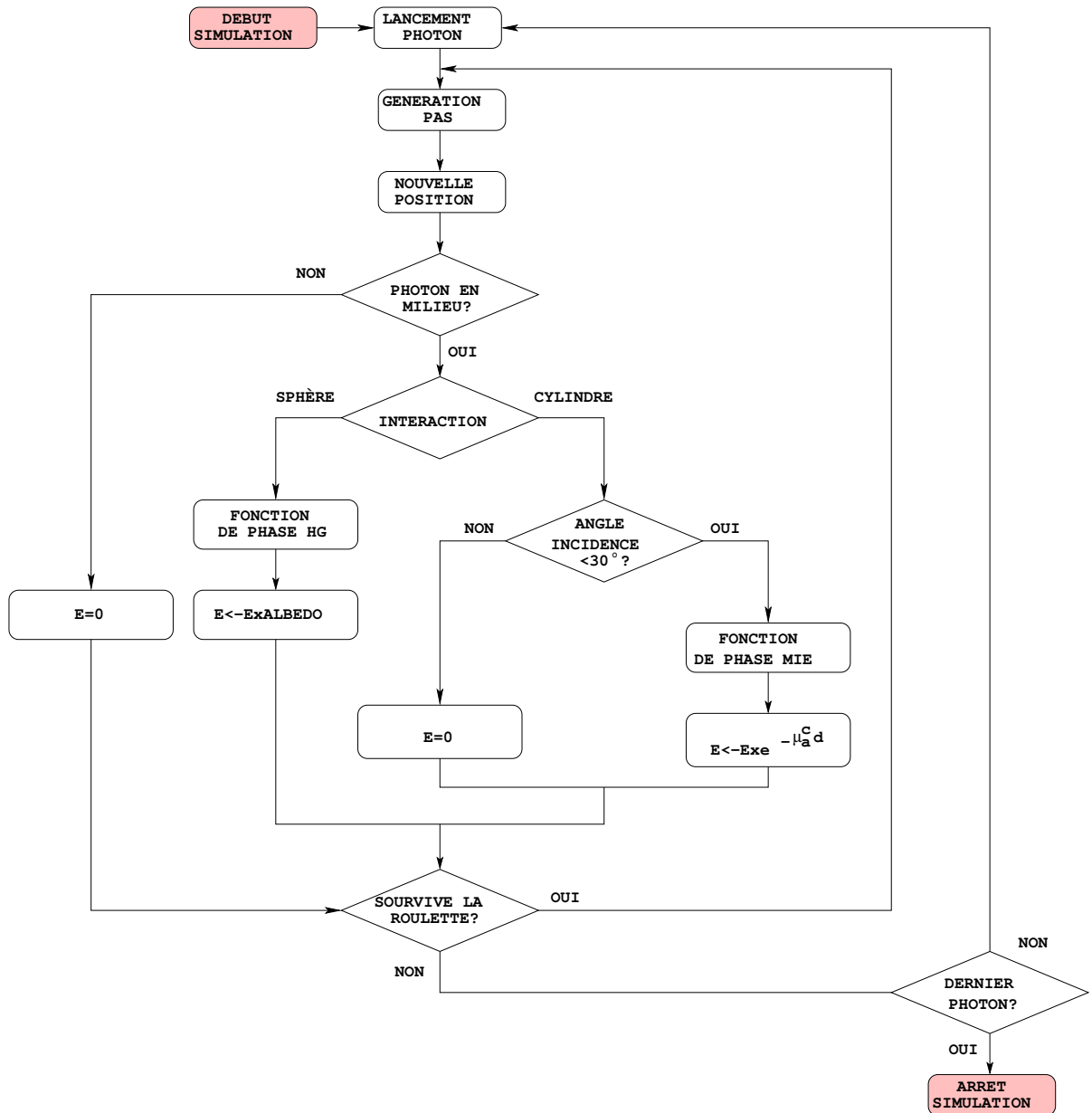


FIG. A.1 – Le "schéma logique" de la simulation numérique de Monte Carlo en conditions de localisation de l'absorbance en cylindres.

parcourus des pas de longueurs aléatoires [2][4] :

$$l = -\frac{\ln \xi}{\mu_a^b + \mu_s^b + \mu_a^c + \mu_s^c} = -\frac{\ln \xi}{\mu_t} \quad (\text{A.1})$$

où  $\xi$  est un nombre généré uniformément, de manière aléatoire entre 0 et 1, et  $\mu_a^b, \mu_s^b$  et  $\mu_a^c, \mu_s^c$  sont les coefficients d'absorption et de diffusion du milieu entourant les cylindres et respectivement des cylindres. Ces coefficients sont déterminés par des calculs de Mie pour sphères et respectivement cylindres infinis longs. Pour justifier la relation A.1 on va noter par  $p(l)$  la fonction de distribution des longueurs des pas des photons. La relation entre  $\xi$  et  $p(l)$  est [4] :

$$\xi = \int_{l_{min}}^l p(l') dl' \quad (\text{A.2})$$

où  $l_{min}$  est la plus petite valeur de la longueur du trajet des photons. D'autre part, on peut montrer que la relation entre la fonction de distribution  $p(l)$  et le coefficient d'interaction de la lumière avec le milieu  $\mu_t$  s'exprime par :

$$p(l) = \mu_t e^{-\mu_t l} \quad (\text{A.3})$$

ainsi que, à l'aide de deux dernières équations on peut exprimer la longueur des pas des photons par :

$$l = -\frac{\ln(1 - \xi)}{\mu_t} \quad (\text{A.4})$$

Cette relation est identique à la relation A.1 parce que on peut substituer  $1 - \xi$  par  $\xi$  à cause de la symétrie de  $\xi$  autour de 0.5.

#### *L'absorption et la modification de la direction de propagation*

Au cours de la propagation dans le milieu, le nombre des photons dans les paquets diminue suivant le type de particule rencontrée conformément au paragraphe 1.3.3. La fonction de phase de Henyey-Greenstein est intégrée dans le programme de simulation tandis que la fonction de Mie est générée séparément par un programme écrit en *Octave* et basé sur le code de Bohren et al [1]. La justification de cette approche réside dans le fait que l'intégration du calcul de la fonction de phase de Mie dans le programme de simulation conduit à une augmentation importante des temps de calcul. Afin d'être intégrée dans le programme de simulation à cause du fait que la fonction de phase de Mie ne varie pas de manière monotone avec l'angle de diffusion (voir l'exemple de la figure suivante) nous avons réalisé un programme de Mie donnant directement la fonction de



phase cumulative [3].

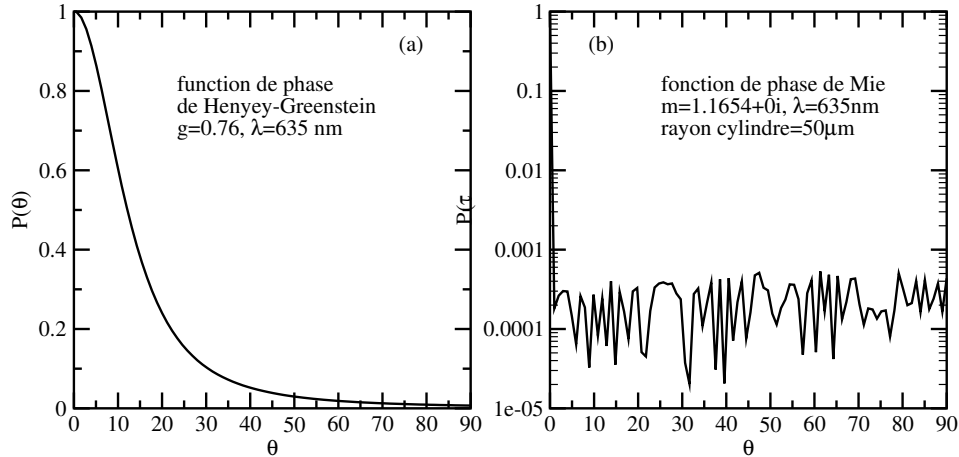


FIG. A.2 – Exemples de fonctions de phase de Henyey-Greenstein et respectivement de Mie pour un cylindre infini long.

### La roulette

Au cours de la simulation les paquets ne sont jamais vidés de ses photons. Pratiquement on considère qu'un paquet ne contient plus de photons quand le nombre de photons se réduit de  $10^{-4}$  fois par rapport au moment du lancement du paquet. La roulette a le rôle de "remplir" 1 de 10 paquets vidés, de manière aléatoire, de sorte que la loi de la conservation de l'énergie soit respectée.

## Bibliographie

- [1] C.F. Bohren and D.R. Huffman. *Absorption and Scattering by Small Particles*. John Wiley and Sons Inc, New York, 1998.
- [2] S.A. Prahl, M. Keijzer, S.L. Jacques, and A.J. Welch. A Monte Carlo model of light propagation in tissue. *SPIE Institute Series*, IS 5 :102–111, 1989.
- [3] L. Wang and S. Jacques. Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues in standard c. Technical report, <http://omlc.ogi.edu>, 1998.

- [4] L.W. Wang, S.L. Jacques, and L. Zheng. Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. *Computer Methodes and Programs in Biomedicine*, 47 :131–146, 1998.

---

### Le logiciel fitofinvivo

---

Le logiciel contient un nombre de neuf feuilles normales (forms), une feuille *MDI* et un nombre de huit modules (pour une meilleure compréhension des termes *feuille* et *module* voir par exemples les références [2],[1]). Les feuilles représentent en général l'interface graphique avec laquelle l'utilisateur peut manipuler le programme d'ajustement mais aussi le code concernant d'habitude les positions des différents objets présentes sur chaque feuille. La feuille *MDI* est la feuille parent étant la feuille de démarrage du logiciel. Les fichiers associés à chaque feuille sont présentés dans le tableau B.1 page suivante et les fichiers associés aux modules dans le tableau B.2 page suivante. Chaque module contient des procédures qui doivent résoudre des différentes tâches. Ainsi, le module :

- ① contient les procédures : *SvdFit*, *SvdCmp*, *Svdksb*, *Funcs*, *Sign*, *Maximum*.

Les premières trois procédures réalisent l'ajustement numérique de la courbe expérimentale. Les trois utilisent les fonctions *Sign* qui trouvent la valeur d'une variable en fonction du signe d'une autre variable et *Maximum* qui calcule la valeur maximale de deux variables. La procédure *Funcs* contient l'expression de la fonction après laquelle on réalise l'ajustement numérique.

Les propriétés "caption" et "name" des feuilles	Fichiers correspondants
Form1	Frmright.frm
Form2	Frmleft.frm
Form3	FrmSetData.frm
Form4	FrmRate.frm
Form5	FrmResults.frm
Form6	FrmSetFilter.frm
Form7	FrmAlone.frm
Form8	FrmSelect.frm
Form9	FrmStart.frm
MDIForm1	FrmMDI.frm

TAB. B.1 – Les fichiers associés aux feuilles du logiciel.

Le nom des modules	Fichiers correspondants
Module1	ModuleFit1.bas
Module2	ModuleSetData2.bas
Module3	ModuleSetFile3.bas
Module4	ModuleFindOrder4.bas
Module5	ModuleFitR5.bas
Module6	ModuleFitL6.bas
Module7	ModuleMinMax7.bas
Module8	ModuleAdd8.bas

TAB. B.2 – Les fichiers associés aux modules du logiciel.

- ② contient les procédures : *OpenDataSet*, *SaveDataSet*, *ShowDataSet*, *CloseDataSet*, *OpenRateSet*, *SaveRateSet*, *ShowRate Set*, *CloseRateSet*. Toutes les huit procédures du module sont des procédures utilisées pour la manipulation des fichiers à accès direct. Les quatre premières sont utilisées pour ouvrir, sauver, afficher et fermer les données concernant la feuille 3 (Form3) et les dernières ont comme tâche les mêmes opérations que la feuille 4.
- ③ contient les procédures : *OpenFileFilter*, *SaveFileFilter*, *ShowFileFilter*, *CloseFileFilter*. Elles sont utilisées pour ouvrir, sauver, afficher et fermer des fichiers à accès direct ayant comme but la manipulation de la feuille 6.
- ④ contient les procédures : *FindOrderFile* (procédure pour la recherche des fichiers à partir d'un filtre donné et mettre ces fichiers dans une ordre établi par l'utilisateur), *Makerapport* (calcule le logarithme du rapport entre un fichier de référence et les fichiers trouvés par

*FindOrderFile* ), *FindNbFile* (trouve le nombre de fichiers qui correspond à un filtre donné) et *MakeRappConsec* (fait les rapports des fichiers consécutifs trouvés par *FindOrderFile*).

- ⑤ contient la procédure *GraphFitRight*. Cette procédure a pour but la représentation graphique de la dépendance de la courbe expérimentale et la courbe obtenue par ajustement numérique en fonction de la longueur d'onde pour les données correspondant à l'hémisphère cérébral droit. Cette procédure est utilisée lorsque nous ne possédons que des résultats expérimentaux pour une seul hémisphère.
- ⑥ contient la procédure *GraphFitLeft*. Elle a le même but que la procédure *GraphFitRight* mais pour l'hémisphère gauche.
- ⑦ contient la procédure *MinMax* qui trouve les valeurs minimale et maximale d'une chaîne de nombres réels et *CaptionsF8* qui fonctionne avec la feuille 8 en représentant en fait l'interface graphique nécessaire pour sauver, ouvrir, imprimer des différents fichiers.
- ⑧ contient les procédures : *ReadFile*, *WriteFile*, *WriteFileCoeff*, *SelectOrSave*. *ReadFile* est la procédure la plus utilisée. Elle lit des fichiers à accès séquentiel. *WriteFile* écrit des fichiers texte avec les données en colonnes, *WriteFileCoeff* sauve dans un fichier les valeurs calculées des concentrations et *SelectOrSave* facilite l'utilisation d'une boîte de dialogue standard.

Le logiciel *FITOFINVIVO* est capable de calculer des saturations en oxygène ou concentrations de chromophores en différentes situations expérimentales. Il peut garder ou éliminer des données en fonction de la qualité de l'ajustement numérique. Il est vraiment efficace : on peut pratiquement résoudre quelques centaines des fichiers en quelques minutes.

Ce logiciel est un outil très pratique dans le dépouillement des données, étant utilisé avec succès au sein du groupe d'optique biomédicale. De plus, il présente l'avantage de traiter directement les binaires produits par le logiciel d'acquisition des données (*WINSPEC*) de telle sorte que nous n'avons plus été obligé de transformer les gros fichiers *SPE* en fichiers *ASCII* avant de les analyser.

## **Bibliographie**

[1] G. Doens. *Visual Basic 6*. Ed. Dunod, 1998.

[2] Web Site. [http ://visualbasic.about.com](http://visualbasic.about.com). Technical report, Web Site, 1998.

---

## Le calcul de la fréquence du signal OCT transversal

---

### C.1 Le cas d'un faisceau au centre du miroir

Pour établir l'expression de la fréquence du signal hétérodyne généré par le balayage du miroir vibrant Y à une fréquence  $F_y$ , on se reportera à la figure 4.6 page 121.

Conformément à cette figure la différence entre les longueurs du bras de l'interféromètre,  $OPD$  peut s'exprimer par :

$$OPD = 2\overline{PN} = 2(\overline{O'N} - r) \quad (C.1)$$

Comme  $\overline{O'N} = r / \cos \alpha$ , il en résulte :

$$OPD = 2r \left( \frac{1}{\cos \alpha} - 1 \right) \simeq 2r \cdot \frac{1 - \cos \alpha}{\cos \alpha} \simeq r \cdot \alpha^2 \quad (C.2)$$

D'autre part, parce qu'entre les grandissements transversal et angulaire de la lentille L il y a la relation  $M_t \cdot M_a = 1$ , on peut exprimer la relation entre les angles  $\beta$  et  $\alpha$  par  $\delta\beta = \frac{z_2}{z_1} \cdot \delta\alpha$ . Ainsi, en

développant en série de Taylor la fonction  $1/\cos \alpha$  autour de  $\alpha = 0$ , il en résulte :

$$\delta\beta = \frac{z_2}{z_1} \cdot \frac{OPD}{2r\alpha} \quad (\text{C.3})$$

Si  $\delta\beta = 4\zeta_y U_y F_y \delta t$  représente l'angle entre deux rayons consécutifs correspondants à deux maxima consécutifs d'interférence ( $OPD = \lambda$ ), on trouve que la fréquence des signaux transversaux générés par le balayage du miroir Y est :

$$v_h = \frac{1}{\delta t} = 8\zeta_y U_y F_y \cdot \frac{z_1}{z_2} \cdot \frac{r\alpha}{\lambda_0} \quad (\text{C.4})$$

Pour déterminer les rayons des cercles d'interférence, on extrait l'angle  $\alpha$  de la relation C.2 dans  $R = r \tan \alpha$ , et on trouve :

$$R = \sqrt{\frac{OPD^2}{4} + r \cdot OPD} \quad (\text{C.5})$$

Si les cercles vont correspondre à des intensités d'interférence maximale, alors  $OPD = m\lambda$ , et dans les conditions où on peut négliger la valeur carrée d'OPD :

$$R_m^{max} \simeq \sqrt{r \cdot OPD} \quad (\text{C.6})$$

## C.2 Le cas d'un faisceau hors du centre du miroir

On se reportera à la figure 4.8 page 124.

L'OPD correspondant au cas d'un faisceau au centre du miroir s'exprime, pour une valeur petite de  $\alpha$  par :

$$OPD = 2r \frac{2 \sin^2 \frac{\alpha}{2}}{\cos \alpha} \simeq r\beta^2 \left( \frac{z_1}{z_2} \right)^2 \quad (\text{C.7})$$

Dans le cas d'un faisceau hors du centre, le faisceau va parcourir une distance entre le miroir



vibrant et la cible approximativement raccourcie de  $\beta\delta$ . Ainsi, l'OPD peut s'exprimer par :

$$OPD \simeq r\beta^2 \left( \frac{z_1}{z_2} \right)^2 - 2\delta\beta \quad (\text{C.8})$$

Comme entre deux maxima d'interférence l'OPD varie de  $\lambda$  et l'angle  $\beta$  de  $\delta\beta$ , par la dérivation de la dernière équation on trouve :

$$\lambda = 2\beta \left( \frac{z_1}{z_2} \right)^2 r d\beta - 2\delta d\beta \quad (\text{C.9})$$

et comme  $d\beta = 4\zeta_y U_y F_y dt$ , il en résulte que la fréquence hétérodyne du signal généré par le balayage d'un faisceau hors du centre du miroir est :

$$v'_h = \frac{8\kappa U_y F_y}{\lambda} \left[ -\delta + 4\zeta_y U_y F_y \left( \frac{z_1}{z_2} \right)^2 r t \right] \quad (\text{C.10})$$

---

## La liste de publications et communications

---

Les travaux qui ont mené à la réalisation de cette thèse ont fait l'objet de quelques publications et communications à différentes conférences et congrées. Les références de ces articles et communications sont :

### D.1 Publications

- **A.Bradu**, J.Derouard, *Spectrophotometry in turbid media using small optical fiber probes*, OSA Technical Digest (OSA, Washington DC), pg.430-432, 1999
- **A.Bradu**, R.Sablong, C.Julien, J.F.Payen, J.Derouard, *In vivo absorption spectroscopy in brain using small optical fiber probes : effect of blood confinement*, Proc.SPIE, 4432, pg.85-90, 2001
- **A.Bradu**, Gh.Singurel, Gh.Popa, *Light propagation in turbid media and its applications to tissue diagnosis*, Annals of A.I.I.Cuza University, XLVII, pg.17-30, 2001
- **A.Bradu**, J.Derouard, Gh.Popa, Gh.Singurel, *Investigation of the correction factor effect for inhomogeneously distributed absorbers in turbid media as biological tissues*, Annals of

Al.I.Cuza University, XLVIII, pg.77-86, 2002

- A.Gh.Podoleanu, **A.Bradu**, R.G.Cucu, R.B.Rosen *T-scan based OCT using a resonant scanner* (en rédaction)

## D.2 Communications

- **A.Bradu**, R.Sablong, O.Hugon, J.F.Payen, J.Derouard, *Spectroscopy of the rat cerebral tissue with fiber optics probes*, OPTODIAG, Paris, 2000
- **A.Bradu**, Gh.Singurel, J.Derouard, *Influence of the absorber on spectrophotometric measurements in turbid media*, 4<sup>th</sup> General Conference of the Balkan Physical Union, Veliko Turnovo, 2000
- **A.Bradu**, R.Sablong, O.Hugon, J.Derouard, *The absorbance compartmentation and optical properties of the turbid media. Applications to the biological tissue spectroscopy*, OPTIX, Marseille, 2001
- A.Gh.Podoleanu, **A.Bradu**, R.G.Cucu, J.Rogers, D.Jackson, R.Rosen, *Fast en-face OCT system for the retina*, The IOP Physics Congress, Edinburgh, 2003