



HAL
open science

Méthodes optiques résolues en temps pour la tomographie de fluorescence dans les milieux diffusants

Aurélie Laidevant

► **To cite this version:**

Aurélie Laidevant. Méthodes optiques résolues en temps pour la tomographie de fluorescence dans les milieux diffusants. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00122185

HAL Id: tel-00122185

<https://theses.hal.science/tel-00122185>

Submitted on 27 Dec 2006

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
Spécialité : Physique

Aurélie LAIDÉVANT

Méthodes optiques résolues en temps pour la tomographie de fluorescence dans les milieux diffusants

Soutenue le 5 octobre 2006

Composition du jury

M. Patrick Poulet	Rapporteur
M. Gianluca Valentini	Rapporteur
M. Jacques Derouard	Examinateur
Mme Françoise Peyrin	Examinateur
M. Claude Boccara	Directeur de thèse
M. Jean-Marc Dinten	Encadrant

Laboratoire Imagerie et Systèmes d'Acquisition - Cea-Leti Grenoble

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au Laboratoire Imagerie et Systèmes d'Acquisitions du Département Technologies pour la Biologie et la Santé (DTBS). Je remercie le chef de Département Jean Chabbal et le chef de Service Olivier Peyret pour leur accueil. Je remercie également le chef de Laboratoire Philippe Rizo pour les moyens mis à ma disposition et son suivi enthousiaste du projet.

Je tiens à remercier Patrick Poulet et Gianluca Valentini pour avoir accepté d'être rapporteurs ce travail. Je remercie également les autres membres du jury, Jacques Derouard et Françoise Peyrin.

J'exprime ma gratitude à Claude Boccara qui a dirigé cette thèse depuis le Laboratoire d'Optique de l'ESPCI. Nos rencontres et nos échanges ont été très enrichissants.

J'exprime ma chaleureuse reconnaissance à Jean-Marc Dinten pour son intérêt, ses qualités scientifiques, sa rigueur, son discernement et ses encouragements tout au long de mon travail.

Mes remerciements sincères vont ensuite aux membres actuels et anciens de l'équipe IMO3D et aux collaborateurs proches qui ont travaillé à mes côtés. Votre soutien a été très précieux, autant du point de vue technique que pour la bonne ambiance. Une mention spéciale pour Anabelle qui, entre autres, m'a initiée au sujet, a répondu sans relâche à mes questions et m'a supportée dans le bureau. Une autre mention spéciale à Philippe P., Michel, Henri, et Jérôme pour leur aide indispensable au labo et leur disponibilité. Merci enfin à Lionel (conseiller en astuces matlab), Anne, Isabelle, Emilie, et Olivier.

Au cours de ce travail, j'ai collaboré avec différentes équipes que je tiens à remercier pour leur accueil et tout ce qu'elles m'ont apporté : l'équipe de Patrick Poulet de Strasbourg au tout début de ma thèse ; l'équipe du Pr. Saint-Jalmes à Lyon (Julie, Raphaël et Emmanuel) avec laquelle nous avons réalisé des mesures en commun ; l'équipe du Pr. Cubeddu de Milan (Cosimo, Lorenzo et Gianluca) qui m'a permis de réaliser des mesures avec leur caméra.

Je n'oublie pas non plus l'ensemble des personnes du labo, et des labos d'à côté, permanents, thésards ou stagiaires, qui m'ont accompagnée au quotidien au cours de

ces trois années. Je ne peux pas citer tous les noms mais vous avez rendu les journées agréables par vos « bonjours », vos petits mots, vos blagues ou les discussions à la cantine. Sans parler de ceux que je venais embêter régulièrement avec mes petites questions ou ceux qui ont accepté que je prenne le croissant du matin en « take away ».

Merci enfin à ceux qui m'ont soutenu aussi en dehors du travail, mes amis, mes parents, mon frère et Jean.

Pour résumer et n'oublier personne, que tous ceux qui m'ont soutenue pendant ces années trouvent ici l'expression de ma reconnaissance, et de mon amitié.

Table des matières

Introduction	1
1 Principes et contexte de l'imagerie optique diffusive	5
1.1 Introduction	7
1.1.1 Les systèmes d'imagerie	7
1.1.2 L'imagerie optique de fluorescence	8
1.2 Les principes d'interaction de la lumière avec les tissus biologiques . . .	9
1.2.1 Absorption	9
1.2.2 Diffusion	11
1.2.3 Autofluorescence	13
1.2.4 Propriétés optiques des tissus	13
1.3 Marqueurs fluorescents en imagerie optique	14
1.3.1 Marqueurs exogènes	14
1.3.2 Marqueurs endogènes	15
1.4 Modélisation de la propagation de la lumière	16
1.4.1 Équation de transfert radiatif	16
1.4.2 Équation de la diffusion	17
1.4.3 Méthode Monte Carlo	20
1.4.4 Théorie de la marche aléatoire	20
1.4.5 Introduction de la fluorescence et du facteur temps	21
1.5 Instrumentation optique	22
1.5.1 Continu	22
1.5.2 Fréquentiel	23
1.5.3 Temporel	23
1.5.4 Comparaison entre les méthodes	24
1.6 État de l'art en imagerie optique temporelle de fluorescence	25
1.6.1 Modèle direct de fluorescence	25
1.6.2 Méthodes de reconstruction	25
2 Mise en place du système d'acquisition TCSPC	29
2.1 Présentation de la chaîne d'acquisition	31
2.2 Choix des éléments du système	31
2.2.1 Source laser	31
2.2.2 Autres éléments du banc optique	33
2.2.3 Photomultiplicateur	35

2.2.4	Préamplificateur	35
2.2.5	Chaîne de comptage	36
2.2.6	Pilotage de la carte en mode balayage	39
2.3	Réglages de la chaîne de comptage	39
2.3.1	Mesure de la réponse de l'instrument	39
2.3.2	Banc optique	41
2.3.3	Réglages de la carte TCSPC	41
2.4	Évaluation des performances du système	42
2.4.1	Ergodicité de la plage de mesure	42
2.4.2	Description des sources de bruit	42
2.4.3	Stabilité temporelle	43
2.5	Prétraitement des données	45
2.5.1	Mesures en diffusion seule	45
2.5.2	Mesures en fluorescence	46
3	Détermination des propriétés optiques en milieu infini et en milieu semi-infini	49
3.1	Théorie	51
3.1.1	Solutions de l'équation de diffusion en milieu infini	51
3.1.2	Quantité mesurable	52
3.1.3	Solutions de l'équation de diffusion en milieu semi-infini	54
3.2	Expression analytique du signal mesurable en milieu semi-infini	56
3.2.1	Expression analytique	56
3.2.2	Influence de la profondeur des fibres	57
3.2.3	Comparaison entre les conditions aux limites	59
3.3	Procédure de détermination des propriétés optiques	60
3.3.1	Objectifs	60
3.3.2	Minimisation	60
3.4	Réalisation de fantômes optiques	63
3.4.1	Description d'un fantôme optique	63
3.4.2	Propriétés des éléments choisis	64
3.4.3	Réalisation des fantômes	65
3.5	Validation du modèle direct	67
3.5.1	Mesures en surface et en milieu infini	67
3.5.2	Mesures à différentes profondeurs sous la surface	70
3.6	Résultats	72
3.6.1	Résultats de la procédure d'ajustement pour des mesures en surface et en milieu infini	72
3.6.2	Résultats de la procédure d'ajustement pour des mesures à différentes profondeurs sous la surface	74
3.6.3	Discussion	78
3.7	Comparaison avec une autre technique : réflectance intégrale	79
3.7.1	Description de la méthode	79
3.7.2	Résultats	81

4	Établissement et validation du modèle direct en fluorescence en milieu infini et en milieu semi-infini	85
4.1	Théorie	87
4.1.1	Solution générale de l'équation de diffusion en temporel en fluorescence	87
4.1.2	Solution analytique simplifiée en milieu infini	88
4.2	Calcul des deux premiers moments	90
4.2.1	Généralités sur les moments	91
4.2.2	Expressions analytiques en milieu infini	92
4.2.3	Ordres de grandeur	94
4.2.4	Choix de la géométrie de mesure	94
4.3	Établissement des expressions analytiques en milieu semi-infini	96
4.3.1	Calcul du temps moyen	96
4.3.2	Calcul de la variance	98
4.3.3	Comparaison	99
4.4	Validation expérimentale du modèle direct en milieu infini	101
4.4.1	Système et géométrie de mesure	101
4.4.2	Signaux temporels	102
4.4.3	Comparaison des TPSFs expérimentales avec leur expression théorique en milieu infini	103
4.4.4	Calcul du temps d'amplitude maximale	106
4.4.5	Mesures des moments en milieu infini pour différentes positions de l'inclusion sous les fibres	106
4.4.6	Discussion	109
4.5	Validation expérimentale du modèle direct en milieu semi-infini	110
4.5.1	Système et géométrie de mesure	110
4.5.2	Mesures des moments en surface pour différentes positions de l'inclusion sous les fibres	110
5	Localisation d'une inclusion fluorescente : résolution du problème inverse	113
5.1	Utilisation du temps moyen pour une mesure absolue au-dessus d'une inclusion fluorescente	115
5.1.1	Expression du problème inverse	115
5.1.2	Résultats	115
5.2	Mesures différentielles : balayage au-dessus d'une inclusion	117
5.2.1	Géométrie de mesure	117
5.2.2	Expression du problème inverse	118
5.2.3	Simulations	119
5.2.4	Résultats pour des grilles de détecteurs centrées	121
5.2.5	Résultats pour des grilles de détecteurs décentrées	127
5.2.6	Autres résultats	128
5.3	Extension à une distribution spatiale de fluorophores	132
5.3.1	Généralités	132
5.3.2	Adaptation de la méthode différentielle	136

5.4	Utilisation d'une caméra rapide	138
5.4.1	Description du dispositif	138
5.4.2	Analyse des mesures	140
5.4.3	Résolution du problème inverse	144
	Conclusion et perspectives	149
A	Photomultiplicateur R3809U-50	151
A.1	Principe de fonctionnement	151
A.2	Caractéristiques principales	152
B	Mesures avec une plaque réfléchissante placée dans le plan des fibres	155
C	Passage en représentation fréquentielle	159
D	Propriétés et calculs sur les moments	161
D.1	Opérations sur les moments	161
D.1.1	Passage fréquentiel-temporel	161
D.1.2	Moment d'ordre zéro	162
D.1.3	Temps moyen	163
D.1.4	Moment d'ordre deux	164
D.1.5	Variance	164
D.2	Calculs sur des fonctions d'intérêt	165
D.3	Relation entre les moments et les séries de Fourier	165
E	Publications et participations à congrès	167
	Bibliographie	169

Résumé

L'imagerie optique diffuse de fluorescence est un outil émergent de diagnostic pour la localisation et la quantification de sondes fluorescentes dans les tissus biologiques. Les techniques temporelles constituent l'un des modes de réalisation de ce type d'imagerie. Le principe est d'utiliser une source de lumière pulsée qui va interagir avec le milieu puis de mesurer la déformation de l'impulsion au point de détection. Dans ce contexte, ce travail de thèse s'articule autour de l'étude de modèles de propagation lumineuse dans le cadre de l'approximation de la diffusion. Le but est de fournir des méthodes de caractérisation des propriétés optiques et de localisation d'une inclusion fluorescente dans un milieu diffusant, en tenant compte de sa géométrie.

Nous présentons tout d'abord la mise en œuvre d'un banc de mesure des courbes temporelles utilisant une chaîne de comptage de photons uniques TCSPC (pour *Time Correlated Single Photon Counting*). Cette chaîne a été modélisée de façon à extraire les signaux d'intérêt à partir des mesures.

Ce système nous a permis de mesurer les coefficients d'absorption et de diffusion réduit de fantômes optiques dans les conditions classiques de mesures en surface et en milieu infini. Nous avons proposé un modèle qui permet de faire le lien entre ces conditions classiques en traitant des mesures à n'importe quelle profondeur sous la surface. Les limitations du modèle vis-à-vis des perturbations provoquées par l'interface ont été mises en évidence.

Nous avons décrit le modèle direct de fluorescence en milieu infini qui donne l'expression analytique du signal mesuré ainsi que celle des deux premiers moments. Une expression de ces derniers adaptée à la géométrie semi-infinie a été proposée. Les mesures expérimentales ont montré un bon accord pour les conditions de milieu infini mais n'ont permis qu'une validation partielle en milieu semi-infini, soulignant ainsi à nouveau les perturbations liées à l'interface.

Le problème inverse de localisation de l'inclusion a été résolu en milieu infini homogène à la fois avec et sans *a priori* sur sa position en (x,y) . Une méthode originale d'inversion permettant de s'affranchir de la connaissance du temps de vie du fluorophore ainsi que du temps moyen de la réponse de l'instrument a été proposée. Nous avons également étendu le principe de cette méthode à une distribution spatiale quelconque de fluorophores. Nous présentons finalement l'adaptation de notre méthode à un autre système de détection constitué d'une caméra rapide.

Abstract

Time-resolved optical methods for fluorescence tomography in turbid media

Fluorescence diffuse optical imaging is an emerging diagnostic tool for localization and quantification of fluorescent probes in biological tissues. Time-resolved approaches are one of these techniques. An incident impulse of excitation light is sent to the medium and its temporal distribution is measured at the detection point. In this context, this thesis work deals with the study of light propagation models within the diffusion approximation. The aim is to provide methods for the characterization of the optical properties and the localization of a fluorescent inclusion in a turbid medium, according to its geometry.

We first present our experimental set up using a time-correlated single photon counting TCSPC detection system. It was modeled in order to extract only the signal of interest. This system allowed us to measure the absorption and reduced scattering coefficients of optical phantoms by performing classical measurements at the surface and in the infinite geometry. We proposed a theoretical model which can account for measurements at any depths below the surface, in order to link these two kinds of boundary conditions. Limitations of the diffusion model for surface measurements were shown.

We describe the forward fluorescence model in an infinite medium which gives an analytical expression of the measured signal and of the two first moments, for a punctual fluorophore. We analytically derived the expression of the moments in the semi-infinite geometry. We validated these expressions for within medium measurements but only partially for surface measurements. This underlines again the perturbations due to the surface.

The inverse problem for localization was achieved in an homogeneous infinite medium with and without the knowledge of the (x,y) inclusion position. An original inversion method was proposed which does not require *a priori* knowledge of either the fluorescence lifetime or the mean time of the instrument response function. We also extended our method to a spatial distribution of fluorophores. We finally presented the adaptation of the method to another experimental system based on a gated CCD camera.

Introduction

L'imagerie optique diffuse de fluorescence constitue une nouvelle modalité de diagnostic optique pour identifier, localiser et quantifier des sondes moléculaires fluorescentes au sein des tissus biologiques. Ces agents de contraste exogènes, appelés fluorophores, parcourent la circulation sanguine ou les canaux lymphatiques et viennent marquer des tissus cibles qui peuvent être par exemple des tumeurs cancéreuses. Elles sont repérées soit par l'expression de récepteurs spécifiques sur lesquels viennent se fixer les fluorophores, soit simplement par accumulation des fluorophores due à une augmentation de la vascularisation autour de la tumeur. Le temps de vie de fluorescence des marqueurs est également un indicateur de l'environnement des tissus car il peut varier avec l'oxygénation ou le pH du milieu. Ces éléments justifient l'intérêt de l'imagerie de fluorescence pour le diagnostic médical. De plus, son intérêt clinique provient de la nature non ionisante de la lumière, du caractère non invasif de la mesure et de sa grande sensibilité. En effet, elle apporte plus de sensibilité et de contraste que l'imagerie optique diffuse dans le proche infrarouge où le contraste est uniquement dû aux différences de propriétés optiques entre les tissus.

Les tissus biologiques possèdent une fenêtre de transparence dans le rouge et le proche infrarouge dans laquelle la lumière peut pénétrer les tissus jusqu'à quelques centimètres. Pour détecter les photons de fluorescence émis par des objets en profondeur, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission doivent donc se trouver dans cette zone spectrale. Cependant, plus la sonde fluorescente est localisée en profondeur dans le tissu, plus le signal détecté est affecté par les interactions lumière-tissu à la fois pour la lumière d'excitation et pour la lumière de fluorescence. Les propriétés de diffusion des tissus perturbent les trajets des photons qui ne se déplacent pas en ligne droite. Il n'est alors pas possible de déduire les trajets des photons pour retrouver la source fluorescente par simple rétroprojection, comme c'est le cas pour l'imagerie par rayons X pour retrouver les structures absorbantes.

Pour répondre à ce problème, il faut considérer des techniques de tomographie avec différents couples source-détecteur combinés à un modèle théorique (appelé « modèle direct ») décrivant la propagation de la lumière dans les tissus. On peut ensuite retrouver la distribution spatiale de fluorescence grâce à la résolution du « problème inverse ». Ces techniques sont classées selon la source de lumière utilisée (continue, modulée en intensité ou impulsionnelle).

Les méthodes utilisant une source de lumière continue ont été les premières à être développées car elles présentent l'avantage d'une instrumentation simple à mettre en œuvre. Notre laboratoire a mis au point un tomographe optique en continu dédié à l'application sur le petit animal. Il permet de localiser des tumeurs présentes dans les organes de la souris. Cependant, la résolution spatiale reste limitée : on ne peut pas distinguer en profondeur deux inclusions fluorescentes séparées de moins de 4 mm centre à centre, dans un objet typique de 1.5 cm d'épaisseur. Une possibilité pour gagner en résolution est de passer à des sources modulées en intensité ou des sources impulsionnelles, c'est-à-dire utiliser des méthodes dépendantes du temps. Ces méthodes permettent d'obtenir plus de données que la simple intensité de fluorescence. Nous avons choisi une instrumentation résolue en temps car elle contient potentiellement plus d'informations que si l'on exploite une méthode fréquentielle. Le principe des méthodes temporelles est d'utiliser une source qui envoie des impulsions de lumière très courtes dans le milieu à étudier et de mesurer la déformation ces impulsions après traversée du milieu. La répartition temporelle donne des informations sur les temps de parcours des photons et donc sur les propriétés du milieu. On observera, par exemple, les phénomènes suivants :

- plus le milieu est diffusant, plus les photons exploreront des chemins longs, et plus l'impulsion sera étendue dans le temps,
- en revanche si le milieu est opaque ou absorbant, très peu de photons pourront effectuer de longs trajets, ce qui diminue leur temps moyen d'arrivée,
- par ailleurs, si le milieu contient des éléments fluorescents, cela modifiera également la forme de l'impulsion et son temps d'arrivée.

Une stratégie pour exploiter les signaux temporels et retrouver la distribution spatio-temporelle de fluorescence est d'établir un modèle physique représentatif de la réalité des mesures sur l'objet à imager, et de complexité raisonnable pour pouvoir l'inverser. Une méthode proposée par Lam *et al.* [1] consiste par exemple à exploiter un indice extrait des courbes temporelles, le temps moyen d'arrivée des photons de fluorescence. Le temps moyen est le premier moment de la courbe temporelle ; la variance, le moment centré d'ordre deux, peut également être exploitée. Le modèle théorique utilisé par ces auteurs est basé sur le modèle d'approximation de la diffusion. Ils ont développé un instrument performant qui permet de montrer des résultats de localisation de tumeurs sur la souris. La méthode nécessite toutefois de faire l'hypothèse de géométrie infinie pour l'objet à imager et de connaître *a priori* le temps de vie du fluorophore.

Cette thèse a été menée pour évaluer la représentativité du modèle d'approximation de la diffusion et dans le but de localiser une inclusion fluorescente dans un milieu diffusant, en s'appuyant sur ce modèle, et dans différentes géométries. Pour cela, notre travail est divisé en deux sous-domaines :

- l'étude des propriétés optiques dont la connaissance est indispensable à l'interprétation des mesures de fluorescence,
- l'étude du signal de fluorescence proprement dit.

Lors de chaque étape, nous avons cherché à utiliser un modèle physique existant et à le compléter pour mieux décrire les différentes géométries ; puis nous l'avons confronté aux mesures avant d'aborder la résolution du problème inverse. Les milieux diffusants que nous avons utilisés sont des fantômes optiques homogènes, c'est-à-dire des objets simplifiés représentant les propriétés optiques moyennes des tissus. Notre démarche s'organise de la façon suivante :

Le **chapitre 1** introduit les principes et le contexte de l'imagerie optique diffuse de fluorescence, ainsi que l'état de l'art concernant les mesures résolues en temps en fluorescence.

La démarche consiste d'abord à mettre en place le dispositif expérimental de mesure et à modéliser les différentes étapes de formation du signal sur le banc de mesure (**chapitre 2**). Il s'agit d'un dispositif de comptage de photons TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting) pour mesurer la dispersion temporelle d'une impulsion lumineuse après traversée d'un milieu diffusant. L'illumination et la collection de la lumière sont effectuées par des fibres optiques.

Nous aborderons ensuite les mesures de diffusion pour en extraire les coefficients optiques d'un milieu homogène (**chapitre 3**). Ces mesures sont classiquement réalisées pour des fibres positionnées soit en surface, soit en profondeur. De façon à faire le lien entre ces deux types de mesures, nous chercherons à établir un modèle plus général qui donne l'expression du signal mesuré pour des positions des fibres source et détecteur à n'importe quelle profondeur en dessous de la surface. Nous présenterons la procédure d'inversion de ces équations et la préparation des fantômes optiques. Nous testerons ensuite le modèle et présenterons les résultats. Ceux-ci seront enfin comparés à une autre technique expérimentale appelée réflectance intégrale, et utilisant un modèle différent.

Dans le **chapitre 4**, les mesures de fluorescence sont étudiées en ajoutant une inclusion fluorescente dans le modèle de propagation de la lumière. Des équations décrivant le signal de fluorescence en milieu infini ont été relevées dans la littérature. Les deux premiers moments sont des paramètres simples qui peuvent en être extraits et dont une expression analytique est connue. Cependant, comme les hypothèses de milieu infini ne sont pas très réalistes, nous établirons une expression analytique des moments pour des mesures en surface. Nous vérifierons l'adéquation de ces différents modèles avec des mesures en milieu infini et en surface.

Cette étude du modèle direct nous donne les moyens pour exprimer et résoudre le problème inverse (**chapitre 5**), c'est-à-dire dans notre cas, retrouver la position d'une inclusion à partir d'un jeu de mesures dont on exploite des paramètres choisis. Deux perspectives de ce travail seront finalement envisagées. Nous explorerons d'une part le problème plus général de reconstruction d'une distribution quelconque de fluorophores. D'autre part, nous chercherons à étendre notre technique à un autre système de détection de façon à obtenir plus d'informations. A cet effet, nous présenterons l'adaptation de notre protocole de mesure à une caméra CCD rapide, en collaboration avec l'Institut Polytechnique de Milan.

Chapitre 1

Principes et contexte de l'imagerie optique diffuse

L'objectif de ce premier chapitre est de donner les éléments nécessaires à la compréhension des phénomènes mis en jeu dans l'imagerie de fluorescence, puis de situer le sujet de thèse parmi les travaux des autres équipes. Pour cela, nous commencerons par une brève introduction dédiée aux systèmes d'imagerie. Nous décrirons ensuite les phénomènes qui entrent classiquement en jeu lors de la propagation de la lumière dans les milieux biologiques : l'absorption, la diffusion et l'autofluorescence. Puis nous introduirons les différents marqueurs qui permettent d'apporter du contraste de fluorescence. Nous aurons également besoin de présenter des modèles pour mettre en équation la propagation de la lumière dans ces milieux. Enfin, les deux dernières parties préciseront les avantages et les inconvénients des différentes techniques d'imagerie existantes, pour finir par établir une synthèse de l'état de l'art des méthodes résolues en temps utilisant la fluorescence.

Sommaire

1.1	Introduction	7
1.1.1	Les systèmes d'imagerie	7
1.1.2	L'imagerie optique de fluorescence	8
1.2	Les principes d'interaction de la lumière avec les tissus biologiques	9
1.2.1	Absorption	9
1.2.2	Diffusion	11
1.2.3	Autofluorescence	13
1.2.4	Propriétés optiques des tissus	13
1.3	Marqueurs fluorescents en imagerie optique	14
1.3.1	Marqueurs exogènes	14
1.3.2	Marqueurs endogènes	15
1.4	Modélisation de la propagation de la lumière	16
1.4.1	Équation de transfert radiatif	16
1.4.2	Équation de la diffusion	17
1.4.3	Méthode Monte Carlo	20
1.4.4	Théorie de la marche aléatoire	20
1.4.5	Introduction de la fluorescence et du facteur temps	21
1.5	Instrumentation optique	22
1.5.1	Continu	22
1.5.2	Fréquentiel	23
1.5.3	Temporel	23
1.5.4	Comparaison entre les méthodes	24
1.6	État de l'art en imagerie optique temporelle de fluorescence	25
1.6.1	Modèle direct de fluorescence	25
1.6.2	Méthodes de reconstruction	25

1.1 Introduction

1.1.1 Les systèmes d'imagerie

L'imagerie optique est une technique d'imagerie émergente parmi les techniques d'imagerie déjà couramment utilisées en hôpital ou pour les recherches sur le petit animal. Avant d'aborder ces techniques, rappelons que toutes les techniques d'imagerie sont basées sur l'interaction de différentes formes d'énergies avec les tissus, dans le but de créer une image. Elles peuvent également reposer sur l'utilisation d'agents de contraste. Les applications peuvent être soit sur l'homme soit sur les souris ou autres animaux modèles de laboratoire. L'objectif des paragraphes suivants est de passer brièvement en revue les autres systèmes d'imagerie pour situer l'imagerie optique. De plus amples détails sur les techniques et leurs applications médicales peuvent être trouvées dans la référence [2].

La radiographie est la première technique d'imagerie utilisée, à partir de la découverte des rayons X par Wilhelm Roentgen en 1895. Ils consistent en un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde comprise entre 1 picomètre et 10 nanomètres. A partir des années 70, le scanner X s'est développé, permettant de fournir des images en trois dimensions. L'inconvénient des rayons X est leur pouvoir ionisant et cancérigène à forte dose. Cette technique est cependant très utilisée car elle fournit des informations anatomiques avec une très bonne résolution.

Une autre technique majeure en imagerie médicale est l'imagerie par résonance magnétique (IRM) mise en place au début des années 80. Elle repose sur l'interaction des protons des tissus avec un champ magnétique. Cette technique est très sensible aux tissus mous et son champ d'application s'est encore élargi avec l'arrivée d'agents de contraste.

Nous citerons également l'utilisation des ultrasons, démarrée dans les années 80, dans la technique de l'échographie. Les ultrasons sont surtout sensibles aux propriétés mécaniques des tissus.

La dernière grande catégorie représente l'imagerie nucléaire, qui détecte la présence de marqueurs radio-actifs. La tomographie par émission de photon unique (SPECT pour *Single Photon Emission Computerized Tomography* en anglais) détecte le rayonnement gamma émis par les radio-isotopes. La tomographie par émission de positon (TEP) utilise pour sa part d'autres marqueurs dont les émissions secondaires vont émettre deux photons simultanément dans des directions opposées.

Quelques caractéristiques des systèmes d'imagerie pour le cas du petit animal sont résumées dans le tableau 1-I. Les termes concernant les techniques optiques seront décrits dans la section suivante. Le choix de la technique dépend bien évidemment du phénomène à imager et ces techniques sont souvent utilisées de façons complémentaires. Les recherches sur ces sujets impliquent des équipes de recherche pluridisciplinaires de physiciens, mathématiciens, informaticiens, électroniciens, chimistes et biologistes et médecins. Ces domaines sont en effet très larges : de l'instrumentation, aux méthodes, au développement de marqueurs jusqu'aux protocoles cliniques. Des éléments concernant

des développements récents sur ces recherches ainsi que sur de nouvelles techniques pourront être trouvés dans la revue [3].

Technique	Agent de contraste	Profondeur	Résolution	Temps
CT	iode	Pas de limite	$5 \mu\text{m}$	mn
IRM	gadolinium	Pas de limite	$10\text{-}100 \mu\text{m}$	mn/heures
Ultrasons	microbulles	mm	$50 \mu\text{m}$	mn
PET	^{18}F , ^{11}C , ^{15}O	Pas de limite	1 à 2 mm	mn
SPECT	$^{99\text{m}}\text{Tc}$, chelates	Pas de limite	1 à 2 mm	mn
FRI	Marqueurs fluo	$\leq 1\text{cm}$	qq mm	sec/min
Tomo fluo	Marqueurs fluo	$\leq 10 \text{ cm}$	1 mm	min
Microscopie intravitale	Marqueurs fluo	de $500 \mu\text{m}$ (confocal) à $800 \mu\text{m}$ (biphoton)	$1 \mu\text{m}$	sec/min

TAB. 1-I: Tableau récapitulatif des différentes techniques d'imagerie médicale pour le petit animal (adapté de [4]) : CT : scanner à rayons X, FRI : Fluorescence Reflectance Imaging pour imagerie de surface en fluorescence, Tomo fluo : tomographie de fluorescence.

1.1.2 L'imagerie optique de fluorescence

Les techniques d'imagerie optiques sont très nombreuses et certaines d'entre elles ont été récemment transférées à l'hôpital. Une revue des dernières avancées est présentée par Gibson *et al* [5]. Notre champ d'investigation sera plus particulièrement celui de l'imagerie moléculaire de fluorescence.

Nous rappelons brièvement le principe général de la fluorescence. Une molécule est dite fluorescente si elle absorbe la lumière à une longueur d'onde spécifique et qu'elle en réémet, après un temps très court appelé temps de vie de fluorescence τ , à une autre longueur d'onde (supérieure généralement, loi de Stokes [6]). La longueur d'onde absorbée est appelée longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde émise par la molécule est appelée longueur d'onde d'émission. Les différents niveaux d'énergie impliqués dans l'absorption et l'émission de lumière par un fluorophore sont présentés dans le diagramme de Jablonski (figure 1.1).

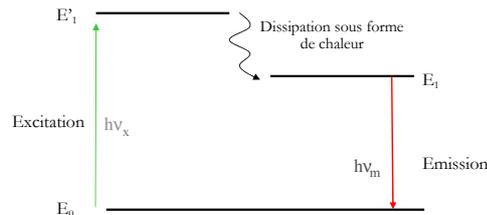


FIG. 1.1: Diagramme de Jablonski pour une excitation à un photon [6].

Comme décrit en introduction, le principe de l'imagerie moléculaire est de marquer et détecter des cellules grâce à des molécules fluorescentes appelées fluorophores. On distingue les techniques microscopiques et les techniques d'optique diffuse. Ces dernières se situent à une échelle plus macroscopique et constituent notre sujet. Parmi celles-ci, nous avons cité deux catégories principales dans le tableau 1-I :

- la technique appelée FRI (pour *Fluorescence Reflectance Imaging* en anglais) ou imagerie de réflectance consiste à éclairer l'objet de façon uniforme et à prendre l'image de la fluorescence avec une caméra. L'information est limitée en deux dimensions.
- la technique de tomographie de fluorescence consiste à éclairer l'objet point par point et de mesurer le signal en différents points de détection. Le but est de reconstruire la distribution de fluorescence dans le volume par la résolution du problème inverse. Comme pour les autres techniques d'imagerie, celui-ci repose sur un modèle direct qui décrit l'interaction de la lumière avec le milieu.

Pour situer ce contexte général, nous commençons donc par décrire, dans les deux premières parties, les principes d'interactions de la lumière avec les tissus puis le mode de fonctionnement des marqueurs fluorescents.

1.2 Les principes d'interaction de la lumière avec les tissus biologiques

De façon générale, les interactions de la lumière avec les tissus sont gouvernées par les processus d'absorption, de diffusion, et d'émission de fluorescence. Détaillons ces trois grands processus qui sont à l'origine du contraste en imagerie optique.

1.2.1 Absorption

Coefficient d'absorption A l'échelle macroscopique et dans un milieu homogène et non diffusant, le coefficient d'absorption μ_a , en cm^{-1} , permet d'exprimer l'intensité lumineuse I d'un faisceau collimaté en fonction de l'épaisseur x de milieu traversée et de l'intensité lumineuse incidente I_0 (figure 1.2). Cette équation est appelée loi d'atténuation de Beer-Lambert :

$$I = I_0 \exp[-\mu_a(\lambda)x] \quad (\text{Eq. 1-1})$$

Ce coefficient est fonction de la longueur d'onde λ du faisceau considéré.

A l'échelle microscopique, l'inverse du coefficient d'absorption $l_a = 1/\mu_a$ est le libre parcours moyen d'absorption. Il est défini comme la distance moyenne parcourue par un photon avant son absorption. Pour un type de particules donné, le coefficient d'absorption peut être relié à la densité de particules ρ et à leur section efficace d'absorption σ_a :

$$\mu_a = \rho \sigma_a \quad (\text{Eq. 1-2})$$

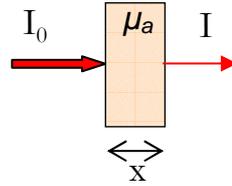


FIG. 1.2: Absorption de la lumière dans un milieu non diffusant.

De nombreux composants biologiques absorbent la lumière, ils sont appelés chromophores. Une autre quantité très utilisée est le coefficient d'extinction molaire propre à chaque chromophore. Le coefficient d'absorption est relié à leur concentration C grâce au coefficient d'extinction molaire ϵ exprimé en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$: $\mu_a = \epsilon \times C$. Ainsi le coefficient d'absorption pour un mélange de chromophores est-il égal à

$$\mu_a = \sum_n \epsilon_n \times C_n \quad (\text{Eq. 1-3})$$

Nous ne décrivons ensuite que les deux principaux absorbeurs des tissus biologiques qui sont l'eau et les différentes formes de l'hémoglobine.

Absorption de l'eau Le spectre d'absorption de l'eau est représenté sur la figure 1.3. Elle présente une forte absorption dans l'infrarouge. De nombreux articles sur cette mesure sont donnés dans la référence suivante [7]. On y trouvera également des informations sur les autres absorbeurs des tissus.

Absorption de l'hémoglobine L'hémoglobine est présente sous deux formes selon son état d'oxygénation : l'hémoglobine oxygénée HbO_2 (ou oxyhémoglobine) et désoxygénée Hb (ou désoxyhémoglobine). Son spectre (figure 1.3), qui dépend des concentrations, montre une forte absorption au-dessous de 600 nm.

Définition de la fenêtre thérapeutique Ces considérations sur les spectres d'absorption de l'eau et de l'hémoglobine ont conduit à définir une zone spectrale appelée « fenêtre thérapeutique » située entre 600 et 900 nm dans le rouge et le proche infrarouge où l'absorption des tissus est minimale.

Indice de réfraction Nous aurons également besoin de connaître l'indice de réfraction moyen du milieu car il détermine la vitesse de phase de l'onde électromagnétique qui s'y propage. L'indice de réfraction de l'eau est 1.33. Dans les tissus biologiques, il est assez difficile à mesurer et peut varier de 1.35 à 1.45 selon la teneur en eau du tissu. On suppose généralement qu'il est égal à 1.4, ce qui est une valeur moyenne entre celle des lipides et celle de l'eau.

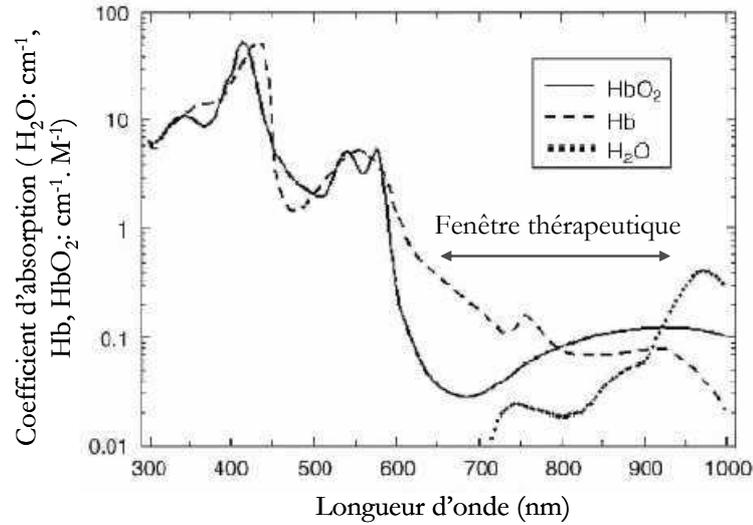


FIG. 1.3: Spectres d'absorption de l'eau, de l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée; représentation de la « fenêtre thérapeutique » (adapté de [8]).

1.2.2 Diffusion

Coefficient de diffusion Les phénomènes de diffusion s'expliquent par des différences d'indices de réfraction à l'échelle microscopique [9], notamment lors de la traversée des membranes cellulaires. La théorie est basée sur la propagation des ondes électromagnétiques et son interaction avec une particule d'indice de réfraction différent du milieu environnant. Chaque particule se comporte alors comme un dipôle induit par l'onde incidente. Les caractéristiques de l'onde diffusée dépendent de la longueur d'onde et de la taille de la particule.

On distingue généralement trois régimes de diffusion en fonction de la taille de la particule vis-à-vis de la longueur d'onde. Il est intéressant de les citer car ces modèles peuvent servir à calculer de façon théorique les propriétés de diffusion si l'on connaît la taille des particules. Pour des particules petites devant la longueur d'onde, le régime est celui de la diffusion Rayleigh où la diffusion est isotrope. La théorie de Mie est plus générale car elle englobe le régime précédent mais décrit aussi le régime (appelé diffusion de Mie) où la taille des particules est de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde. Enfin, pour des particules de taille macroscopique comme des gouttes d'eau, les lois de la diffraction peuvent s'appliquer.

Les tissus biologiques possèdent cependant une structure très complexe, présentant des tailles variées. Nous pouvons présenter un coefficient de diffusion de manière analogue au coefficient d'absorption. Pour un milieu homogène et non absorbant, si on considère une source collimatée, le coefficient de diffusion μ_s , en cm^{-1} permet d'exprimer I la partie de lumière non diffusée à la sortie du milieu, en fonction de l'épaisseur

x de milieu traversée et de l'intensité lumineuse incidente I_0 :

$$I = I_0 \exp[-\mu_s(\lambda)x] \quad (\text{Eq. 1-4})$$

A l'échelle microscopique, l'inverse du coefficient de diffusion $l_s = 1/\mu_s$ est le libre parcours moyen de diffusion. Il est défini comme la distance parcourue par un photon avant diffusion. Pour un type de particules donné, le coefficient de diffusion peut être relié à la densité de particules ρ et à leur section efficace de diffusion σ_s :

$$\mu_s = \rho \sigma_s \quad (\text{Eq. 1-5})$$

Anisotropie de diffusion Les propriétés de diffusion des tissus biologiques sont souvent décrites en termes de coefficient de diffusion réduit μ'_s . Celui-ci exprime le fait que la lumière est diffusée dans une direction privilégiée, vers l'avant pour les tissus biologiques. Pour une direction d'incidence \hat{s} , la fonction de phase f donne la probabilité d'être diffusée dans une direction \hat{s}' .

On fait généralement l'hypothèse que la fonction de phase ne dépend que de l'angle θ entre \hat{s} et \hat{s}' , $\cos(\theta) = \hat{s} \cdot \hat{s}'$. Le coefficient d'anisotropie est défini comme la valeur moyenne du cosinus de l'angle de diffusion, pondéré par f :

$$g = \int_{-1}^1 f(\cos(\theta)) \cos(\theta) d(\cos(\theta)) \quad (\text{Eq. 1-6})$$

Ce facteur est nul pour une diffusion parfaitement isotrope et vaut 1 pour une diffusion uniquement vers l'avant. Dans les tissus biologiques, la diffusion se fait de façon préférentielle vers l'avant. Ce coefficient est généralement estimé à 0.9 et peut varier entre 0.7 et 0.99 [10, 11]

Le coefficient de diffusion réduit est lié à ce coefficient par la formule :

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g) \quad (\text{Eq. 1-7})$$

Cette quantité sera utilisée dans l'approximation de la diffusion. Elle peut être interprétée comme un coefficient de diffusion isotrope équivalent. Le chemin parcouru par un faisceau collimaté avant qu'il devienne isotrope est $l^* = 1/\mu'_s$. Autrement dit, c'est la distance au bout de laquelle un photon a perdu la mémoire de sa direction initiale. Le schéma de la figure 1.4 représente l'équivalence entre une diffusion anisotrope de coefficient d'anisotropie $g = 0.86$ et de libre parcours moyen l_s et une diffusion isotrope ($g = 0$) de libre parcours moyen l^* .

Coefficient d'extinction Il est défini par :

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \quad (\text{Eq. 1-8})$$

Il permet d'exprimer l'atténuation totale due à l'absorption et à la diffusion. La composante balistique de la lumière après traversée d'un milieu d'épaisseur x vaut : $I = I_0 \exp[-\mu_t(\lambda)x]$.

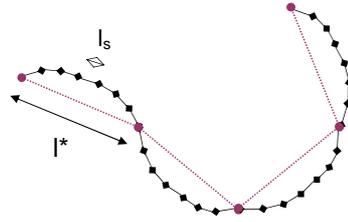


FIG. 1.4: Libre parcours moyen l_s pour une diffusion anisotrope de coefficient d'anisotropie $g = 0.86$ et la façon de l'interpréter comme une diffusion isotrope ($g = 0$) de libre parcours moyen l^* (adapté de [7]).

1.2.3 Autofluorescence

Les tissus peuvent émettre un signal de fluorescence suite à une excitation lumineuse, en l'absence de marquage fluorescent externe. Ce phénomène est appelé autofluorescence des tissus.

Dans certains cas (œsophage, poumon, col de l'utérus), ce signal est étudié car il constitue une signature des tissus et donne des informations sur leur composition [12]. Par exemple, la composition en NADH et en collagène peut permettre de discriminer des tissus normaux de tissus cancéreux [13].

Cependant, dans d'autres cas où l'on souhaite détecter un signal fluorescent spécifique, ce phénomène devient un signal parasite dont on souhaite s'affranchir.

1.2.4 Propriétés optiques des tissus

La description des phénomènes d'absorption et de diffusion apporte une compréhension globale des propriétés optiques des tissus. Cependant, même si l'on pouvait les mesurer précisément, il est difficile de transférer les propriétés de chaque composant du tissu pour avoir les propriétés macroscopiques du tissu. Celles-ci sont très difficiles à mesurer, en particulier dans des conditions *in vivo*. Des revues des valeurs obtenues sur de nombreux organes sont détaillées dans les références [11, 14]. Dans le tableau 1-II, nous reportons quelques valeurs mesurées *in vivo*. Nous retiendrons que les résultats représentent des valeurs moyennes et sont très variables selon les méthodes de mesures et selon les patients.

Tissu	λ	μ_a (cm ⁻¹)	μ'_s (cm ⁻¹)	Référence
Sein	694	0.03	-	[15]
Tumeur du sein	694	0.1	-	[15]
Peau	633	0.62	32	[16]
Avant bras	800	0.23	6.8	[17]
Cerveau (cortex)	674	≥ 0.2	10	[18]

TAB. 1-II: Propriétés optiques de quelques tissus mesurées *in vivo* (tiré de [14, 15]).

La connaissance des propriétés optiques est un outil de diagnostic pour le médecin. Le premier élément est bien évidemment la couleur du tissu, si elle est directement accessible, qui renseigne sur la nature du tissu. Ensuite, nous avons dans le tableau 1-II un exemple où le coefficient d'absorption d'une tumeur du sein (carcinome ductal) est environ trois fois supérieur à celui d'un sein normal [15]. Ceci est dû à la forte vascularisation des tissus tumoraux. Par ailleurs, le coefficient de diffusion permet d'avoir des informations sur la structure du tissu car des cellules cancéreuses auront plutôt une structure désordonnée [19, 17].

Cependant, le contraste peut demeurer faible si l'on se limite au contraste d'absorption et de diffusion. C'est pourquoi nous nous intéressons aux marqueurs fluorescents. Voyons comment ils peuvent augmenter ce contraste et quelle est leur nature.

1.3 Marqueurs fluorescents en imagerie optique

Les marqueurs fluorescents ou sondes fluorescentes sont classés en deux grandes catégories : les marqueurs exogènes, c'est-à-dire étrangers au tissu étudié, et les marqueurs endogènes, générés en propre par le tissu. Les marqueurs exogènes visent plutôt à imager des protéines exprimées par la cellule alors que les marqueurs endogènes traduisent l'expression des gènes. Nous ne reporterons ici que les éléments essentiels à la compréhension du contexte de l'imagerie moléculaire. Ces éléments sont extraits de revues des équipes de chimistes [20, 21, 22, 8] dont les recherches tendent à améliorer la synthèse et l'efficacité de ces marqueurs.

1.3.1 Marqueurs exogènes

Les marqueurs non spécifiques De façon analogue aux agents de contraste en CT ou en IRM, des molécules fluorescentes ou sondes optiques peuvent être injectées dans les tissus pour augmenter le contraste optique. Ces molécules n'ont pas de récepteurs spécifiques. Cependant, elles iront se loger de manière préférentielle dans les tumeurs grâce à la forte vascularisation de celles-ci par simple transport ou par liaison avec des protéines du plasma.

Rappelons les critères de sélection d'un marqueur fluorescent, à la fois vis-à-vis de l'efficacité de fluorescence et vis-à-vis de la contrainte *in vivo*. Il doit posséder :

- des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission dans la fenêtre thérapeutique. Eventuellement, un fort déplacement de Stokes qui permet de mieux filtrer le signal d'excitation.
- un coefficient d'extinction molaire élevé.
- un fort rendement quantique (c'est-à-dire un fort signal de fluorescence).
- une bonne photostabilité ou résistance au photobleaching.
- un caractère hydrophile.
- une faible toxicité.

Les marqueurs fluorescents se décomposent en trois grandes catégories que nous ne détaillerons pas ici, et qui possèdent chacune des propriétés optiques spécifiques : les fluorophores organiques, les complexes inorganiques de lanthanides et les systèmes à base de nanoparticules. Le Vert d'Indocyanine (ICG pour Indocyanine Green, $\lambda_{ex}=780$ nm) est un exemple de marqueur fluorescent organique non spécifique. Il a été approuvé dans les années 70 pour des injections à l'homme pour des tests hépatiques. Un autre fluorophore injectable chez l'homme est la fluorescéine mais ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont moins favorables à l'imagerie optique *in vivo* ($\lambda_{ex}=490$ nm).

Généralement, les expérimentateurs attendent que le surplus de marqueurs qui n'est pas allé dans les tumeurs soit éliminé le plus possible par l'organisme avant de faire l'acquisition. Le plus grand problème est donc la différenciation entre le bruit de fond et la cible. C'est pourquoi les marqueurs spécifiques ont été développés.

Les marqueurs spécifiques Un ligand spécifique est accroché au marqueur fluorescent pour que l'ensemble aille se fixer sur une cible choisie conjuguée reconnue par le ligand. Ce ligand peut être un anticorps, une protéine, ou un peptide par exemple. Cependant, même si le rapport signal à bruit est amélioré par rapport aux marqueurs non spécifiques, il reste encore un bruit de fond ou une accumulation possible dans certains organes. Une solution pratique est apportée par les marqueurs activables.

Les marqueurs activables Ce type de marqueurs, introduit par Weissleder *et al.* [23], repose sur le concept d'activation de la fluorescence par l'environnement chimique ciblé. Sur la sonde optique, la molécule fluorescente est « quenchée », c'est-à-dire que la proximité d'un autre groupement sur la sonde bloque la fluorescence. La sonde est activée par une cible spécifique (une enzyme) grâce à un changement de conformation qui permet l'émission du signal de fluorescence. Cette méthode est très avantageuse car le signal de fluorescence n'est présent qu'à l'endroit de la cible, et une même cible peut activer plusieurs sondes : ceci augmente l'efficacité du processus. Ce procédé est vraiment spécifique aux méthodes optiques et n'est pas possible pour le marquage nucléaire. Une amplification du rapport signal à bruit d'un facteur 10 à 1000 est annoncée par rapport aux sondes non activables [24]. Les principes des différents marqueurs sont résumés sur la figure 1.5.

1.3.2 Marqueurs endogènes

Une catégorie de gènes du petit animal peut être modifiée génétiquement de telle sorte que les protéines produites après l'étape de transcription soient fluorescentes. Ces gènes sont appelés « gènes rapporteurs ». Les deux systèmes rapporteurs les plus connus sont les protéines fluorescentes de la famille des GFPs (Green Fluorescent Protein) et la protéine luciférase qui émet de la lumière par bioluminescence lors de l'activation de son substrat luciférine en présence d'ATP.

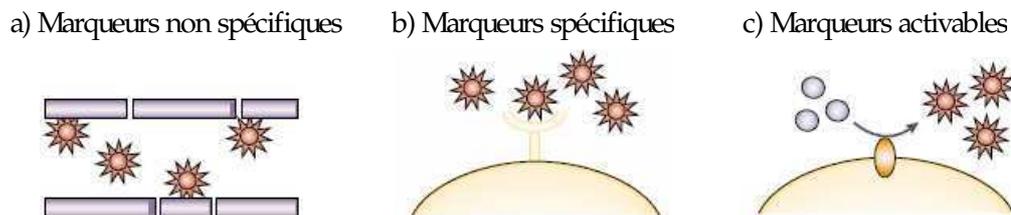


FIG. 1.5: Illustration des différents types de marqueurs fluorescents (adaptée de [20]).

1.4 Modélisation de la propagation de la lumière

Après avoir décrit les principes de base d'interactions de la lumière dans les tissus, nous abordons ici les modèles mathématiques qui décrivent la propagation de la lumière dans les milieux diffusants. Ces modèles directs sont essentiels pour résoudre le problème inverse.

1.4.1 Équation de transfert radiatif

L'équation de transfert radiatif (ETR) décrit la propagation de la lumière dans un milieu diffusant. Elle est aussi appelée *équation de transport de Boltzman*. Elle a été introduite tout d'abord pour décrire des phénomènes de diffusion en astrophysique [25] puis en diffusion de neutrons [26], avant d'être appliquée entre autres au domaine de l'optique [27]. Cette approche est une alternative aux équations de Maxwell qui décrivent de manière plus fondamentale les phénomènes électromagnétiques. Par ailleurs, le lien peut être montré entre les deux approches [28].

L'ETR s'intéresse aux transferts d'énergie dans le milieu à travers la grandeur photométrique appelée *luminance* (ou *radiance* en anglais). Nous détaillons un peu cette grandeur avant d'énoncer l'ETR. La luminance $L(\mathbf{r}, t, \hat{s})$ est la densité moyenne d'énergie lumineuse, pour une surface élémentaire et pour un angle solide élémentaire dans la direction \hat{s} , au temps t . L'ETR s'exprime de la façon suivante :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial L(\mathbf{r}, t, \hat{s})}{\partial t} + \hat{s} \cdot \nabla L(\mathbf{r}, t, \hat{s}) + (\mu_a(\mathbf{r}) + \mu_s(\mathbf{r})) L(\mathbf{r}, t, \hat{s}) = \mu_s(\mathbf{r}) \int_{4\pi} f(\hat{s}, \hat{s}') L(\mathbf{r}, t, \hat{s}') d^2 s' + q(\mathbf{r}, t, \hat{s}) \quad (\text{Eq. 1-9})$$

avec les différents paramètres :

- c est la vitesse de propagation de la lumière dans le milieu. Si l'on note n l'indice de réfraction du milieu, alors $c = c_0/n$ avec c_0 la vitesse de propagation de la lumière dans le vide.
- $\mu_a(\mathbf{r})$ et $\mu_s(\mathbf{r})$ sont les coefficients d'absorption et de diffusion du milieu au site \mathbf{r} .
- $f(\hat{s}, \hat{s}')$ est la fonction de phase normalisée associée aux particules du milieu. Elle représente la probabilité de diffusion dans la direction \hat{s} pour une incidence dans la direction \hat{s}' .

- $q(\mathbf{r}, t, \hat{s})$, exprimée en $\text{W.m}^{-3}.\text{sr}^{-1}$, est la distribution angulaire et spatiale de la source.

L'ETR décrit un bilan des transferts d'énergie sur un volume élémentaire arbitraire situé en \mathbf{r} et à l'instant t (figure 1.6). Les variations de la luminance (temporelles : 1^{er} terme) et spatiales (2^e terme de flux de photons) sont causées par les pertes dues à l'absorption et à la diffusion (3^e terme), par les gains dus à la diffusion (4^e terme) et à la présence de sources lumineuses (5^e terme).

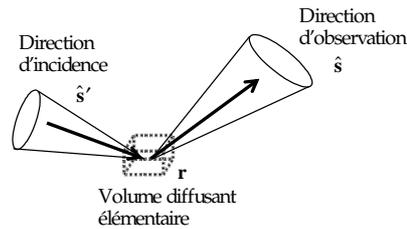


FIG. 1.6: Schéma représentant le volume élémentaire sur lequel est effectué le bilan d'énergie pour l'établissement de l'ETR.

Résolution Des solutions analytiques particulières existent pour des géométries bien particulières [29] mais il n'y en a pas pour des cas plus généraux. Il faut alors soit employer des méthodes numériques, soit faire des approximations supplémentaires. Les méthodes numériques utilisent en général des résolutions par la méthode Monte Carlo qui peuvent être coûteuses en temps. Nous avons choisi de décrire dans les deux sections suivantes un modèle déterministe et deux modèles stochastiques qui découlent de l'équation de transfert radiatif.

1.4.2 Équation de la diffusion

Le modèle déterministe le plus utilisé est régi par l'équation de la diffusion. C'est ce modèle que nous utiliserons dans la suite de ce travail. Soulignons ici qu'il existe différentes façons de dériver l'équation de la diffusion à partir de l'ETR. Chacune d'elle possède ses propres approximations, ce qui peut apporter quelques modifications sur l'équation de la diffusion, notamment sur la définition du coefficient de diffusion D que nous verrons à la fin de ce paragraphe. Une discussion très complète des approximations de l'équation de la diffusion peut être trouvée au chapitre 2 de la référence [30] et dans la référence [31].

1.4.2.1 Approximation de la diffusion

Différentes approximations sont effectuées pour obtenir une équation simplifiée appelée *équation de la diffusion*. Un passage de l'équation de transfert radiatif à l'équation de la diffusion est détaillé dans la référence [31]. Seules les grandes étapes sont mentionnées ici.

Approximation P_N Le système est supposé à symétrie sphérique, c'est-à-dire composé de diffuseurs sphériques. Sous cette hypothèse, la fonction de phase ne dépend plus que de l'angle de diffusion ψ tel que $\cos(\psi) = \hat{s} \cdot \hat{s}'$. Les fonctions sont alors développées en série d'harmoniques sphériques ou en polynômes de Legendre. En pratique, la série est tronquée à un ordre fini N (d'où le nom de l'approximation).

Approximation P_1 Le problème est encore simplifié à l'ordre 1. On considère des quantités indépendantes de l'angle d'observation. Si l'on intègre la luminance en un point \mathbf{r} sur tous les angles solides, on obtient la *densité de photons* ϕ (ou *fluence* en anglais, exprimée en W.m^{-2}) en ce point :

$$\phi(\mathbf{r}, t) = \int_{4\pi} L(\mathbf{r}, t, \hat{s}) d^2\hat{s} \quad (\text{Eq. 1-10})$$

Si l'on intègre la luminance en un point \mathbf{r} sur tous les angles solides, on obtient le flux de photons Γ en ce point :

$$\mathbf{j}(\mathbf{r}, t) = \int_{4\pi} L(\mathbf{r}, t, \hat{s}) \cdot \hat{s} d^2\hat{s} \quad (\text{Eq. 1-11})$$

On peut alors montrer que la luminance se décompose comme la somme d'un terme isotrope composé de la densité de photons, et d'un terme anisotrope composé du flux. Nous utiliserons cette expression au chapitre 3, ainsi les différents termes que nous avons définis :

$$L(\mathbf{r}, t, \hat{s}) = \frac{1}{4\pi} \phi(\mathbf{r}, t) + \frac{3}{4\pi} \mathbf{j}(\mathbf{r}, t) \cdot \hat{s} \quad (\text{Eq. 1-12})$$

Approximation de la diffusion Deux hypothèses supplémentaires sont effectuées pour obtenir l'équation de la diffusion :

– le flux varie lentement,

$$\frac{\partial \mathbf{j}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = 0 \quad (\text{Eq. 1-13})$$

– la source est supposée isotrope, c'est-à-dire les termes de source non isotropes ne sont pas pris en compte.

Ces hypothèses permettent d'écrire le flux \mathbf{j} sous la forme d'une loi de Fick, en fonction de la densité de photons ϕ :

$$\mathbf{j}(\mathbf{r}, t) = -D \nabla \phi(\mathbf{r}, t) \quad (\text{Eq. 1-14})$$

Après des étapes de calcul reposant sur ces approximations, l'équation de la diffusion a finalement pour expression :

$$\boxed{\frac{1}{c} \frac{\partial \phi(\mathbf{r}, t)}{\partial t} - \nabla \cdot (D(\mathbf{r}) \nabla \phi(\mathbf{r}, t)) + \mu_a \phi(\mathbf{r}, t) = S(\mathbf{r}, t)} \quad (\text{Eq. 1-15})$$

avec S un terme de source isotrope, et D le coefficient de diffusion défini par :

$$D = \frac{1}{3(\mu_a + \mu'_s)} \quad (\text{Eq. 1-16})$$

Cette expression est celle présentée par Patterson *et al* dans la référence [32]. En utilisant d'autres approximations, on peut obtenir d'autres expressions de D , notamment $D = 1/(3\mu'_s)$ proposée par Furutsu *et al* [33]. Un débat est ouvert pour savoir si D dépend ou non de l'absorption [34, 35, 36, 37]. Il existe également d'autres formes proposées de D avec un paramètre devant le coefficient d'absorption [38] ou même un D qui dépend du temps [39]. Nous n'entrerons pas dans ce débat qui est déjà bien argumenté. Nous commenterons la valeur de D dans le chapitre 3 au moment de la détermination des coefficients optiques.

1.4.2.2 Résolution

Des solutions analytiques de l'équation de diffusion existent pour des géométries simples, telles que le milieu infini, semi-infini, ou la tranche infinie [32, 40]. Le principe est de partir de la solution en milieu infini puis d'ajouter les conditions aux limites. Nous expliciterons les solutions pour les milieux infinis et semi-infinis dans le chapitre 3.

Cependant, pour d'autres géométries, il faut effectuer une résolution numérique de l'équation de diffusion. Différentes méthodes existent pour résoudre les équations aux dérivées partielles, nous citerons les deux principales qui sont les résolutions par *différences finies* et par *éléments finis*. Elles présentent l'avantage de pouvoir calculer la solution pour une géométrie arbitraire avec éventuellement des inhomogénéités de coefficients optiques. La méthode des différences finies est basée sur la discrétisation de l'équation aux dérivées partielles. La méthode des éléments finis discrétise quant à elle le domaine de calcul, cette discrétisation est appelée maillage, et les points de calculs les noeuds.

1.4.2.3 Limitations

Les limitations viennent des différentes approximations et hypothèses qui peuvent être faites lors de la dérivation de l'équation de la diffusion. Nous nous reportons à nouveau aux références [30, 31] pour plus de précisions sur des approximations. Nous citons ici les principales limitations que nous retrouverons dans notre étude. Une des limitations de l'équation de la diffusion est $\mu_a \ll \mu'_s$. Cette hypothèse est satisfaite dans la plupart des milieux biologiques. Des études comparatives entre l'approximation de la diffusion et la théorie du transfert radiatif [41] ont montré que les deux études présentaient bien des résultats similaires pour les régions où $\mu_a \ll \mu'_s$, mais pouvaient diverger si cette condition n'était pas remplie. Une seconde limitation découle de l'approximation P1. Elle implique que les variations spatiales de la densité de photons doivent être petites sur des distances de l'ordre de $l^* = 1/\mu'_s$. Cette hypothèse n'est plus valable pour $\mu'_s = 0$ (ce qui rejoint la limitation précédente) ou quand les dimensions de l'objet ou des chemins considérés sont de l'ordre de $1/\mu'_s$. Pour des études sur des objets de petites dimensions comme sur les doigts par exemple pour l'étude de l'arthrite ou sur le cerveau du petit animal [42], le retour à l'équation de transfert radiatif peut être nécessaire pour s'affranchir des erreurs dues à l'équation de diffusion.

1.4.3 Méthode Monte Carlo

La méthode de Monte Carlo est une méthode numérique qui permet de traiter le phénomène de diffusion de manière stochastique, en simulant directement l'équation de transfert radiatif et sans passer par la résolution explicite de celle-ci [43]. La lumière est simulée par un grand nombre de photons qui sont envoyés dans le milieu et qui se déplacent en ligne droite entre deux interactions (événement d'absorption ou de diffusion). L'avantage principal est de pouvoir considérer une géométrie quelconque et éventuellement hétérogène ; l'inconvénient est le temps de calcul. En effet, la précision de ces calculs dépend du nombre de photons envoyés et comme les photons dépendent d'une statistique de Poisson, le rapport signal sur bruit augmente comme la racine du nombre de photons envoyés.

Précisons brièvement le principe de la méthode. Le milieu est décrit par sa géométrie, par le coefficient d'absorption μ_a , le coefficient de diffusion μ_s et la fonction de phase $f(\hat{s}, \hat{s}')$. Un photon est émis par la source, avec une direction qui dépend de sa collimation. Exprimons la distance qu'il va parcourir avant d'être diffusé. Son « poids » initial est fixé à 1. Sa probabilité de parcourir une longueur l avant d'être diffusé est :

$$P(l) = e^{-\mu_s l} \quad (\text{Eq. 1-17})$$

On peut exprimer l en fonction du tirage d'un nombre aléatoire r_1 compris entre 0 et 1 :

$$l = -\frac{1}{\mu_s} \ln(r_1) \quad (\text{Eq. 1-18})$$

Il reste à déterminer l'angle avec lequel le photon va repartir après l'événement de diffusion. C'est là qu'intervient la fonction de phase que nous avons déjà définie. En deux dimensions, l'angle θ avec lequel le photon repartira est défini par :

$$\int_0^\theta f(\theta') d\theta' \equiv r_2 \quad (\text{Eq. 1-19})$$

avec r_2 un nombre aléatoire compris entre 0 et 1. De plus, après chaque événement de diffusion, le poids du photon est recalculé et diminué d'un facteur $e^{-\mu_a l}$, de façon à prendre en compte l'absorption, avec l la distance parcourue depuis le dernier événement. Ces étapes sont répétées, soit jusqu'à ce que le poids du photon devienne négligeable (on considère alors que le photon est absorbé), soit jusqu'à ce que le photon sorte du domaine. Au point de détection, on note le temps d'arrivée du photon pour reconstruire le profil temporel par exemple.

1.4.4 Théorie de la marche aléatoire

Cette théorie est appelée *Random Walk Theory* (RWT) en anglais. Elle est basée sur le phénomène de marche aléatoire sur un réseau pour décrire de manière statistique les phénomènes de diffusion. Elle a été développée par Bonner *et al* en 1987 [44] puis Gandjbackhche *et al* [45] pour décrire la diffusion dans les tissus biologiques. L'équivalence avec les résultats issus de l'approximation de la diffusion a été démontrée.

A chaque pas, le photon peut se déplacer vers un de ses six voisins les plus proches. Le pas du réseau est proportionnel à $1/\mu'_s$. Le paramètre $\mu = \mu_a/\mu'_s$ est la probabilité d'absorption d'un photon à chaque pas. Le modèle peut aussi prendre en compte une diffusion anisotrope. Pour un grand nombre de pas parcourus sur le réseau, des expressions analytiques de certaines grandeurs physiques ont été dérivées, ce qui représente un avantage pour les temps de calcul. Un autre avantage de cette théorie concerne plus particulièrement les phénomènes de fluorescence. En effet, elle permet de prendre en compte les trajets multiples des photons sur un site fluorescent [46].

1.4.5 Introduction de la fluorescence et du facteur temps

Généralités Considérons un milieu fluorescent dilué, non diffusant, de temps de vie τ . Dans le domaine temporel, une impulsion de lumière d'excitation va créer de la lumière de fluorescence $I_m(t)$. Elle est généralement modélisée par une décroissance exponentielle au cours du temps :

$$I_m(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (\text{Eq. 1-20})$$

où I_0 est l'intensité d'émission à $t = 0$. Si le fluorophore possède plusieurs temps de vie, alors il faut en tenir compte en considérant une somme d'exponentielles avec des amplitudes et des temps de vie différents. Nous restreindrons cette discussion à un temps de vie unique. Pour obtenir l'expression du terme de fluorescence dans le domaine fréquentiel $I_m(\omega)$, il faut prendre la transformée de Fourier du terme temporel. Or $TF(\theta(t) \exp(-at)) = 1/(a + i\omega)$ d'où :

$$I_m(\omega) = I_0 \frac{\tau}{1 + i\omega\tau} \quad (\text{Eq. 1-21})$$

Extension à un milieu diffusant Nous nous plaçons toujours dans le cadre de l'approximation de la diffusion. Nous considérons maintenant un milieu absorbant et diffusant, qui contient des fluorophores. Pour raisonner de façon visuelle sur un fluorophore, nous pouvons nous appuyer sur la figure 1.7. La lumière d'excitation, à la longueur d'onde λ_x , excite le fluorophore qui réémet de la lumière de fluorescence, à la longueur d'onde λ_m , avec un temps de vie τ .

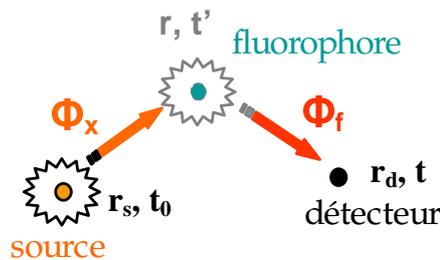


FIG. 1.7: Illustration de la propagation de la lumière de la source au fluorophore, puis du fluorophore au détecteur.

L'équation de propagation de la lumière d'excitation a la forme de l'équation de diffusion (Eq. 1-15) que nous avons déjà vue et s'écrit :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial \phi_x(\mathbf{r}, t)}{\partial t} - \nabla \cdot (D_x(\mathbf{r}) \nabla \phi_x(\mathbf{r}, t)) + (\mu_{ax \rightarrow m} + \mu_{ax \rightarrow}) \phi_x(\mathbf{r}, t) = S_x(\mathbf{r}_s, t) \quad (\text{Eq. 1-22})$$

et celle de la lumière d'émission s'écrit :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial \phi_m(\mathbf{r}, t)}{\partial t} - \nabla \cdot (D_m(\mathbf{r}) \nabla \phi_m(\mathbf{r}, t)) + \mu_{am \rightarrow} \phi_m(\mathbf{r}, t) = \frac{\eta \mu_{ax \rightarrow m}}{\tau} \int_0^t \exp\left(-\frac{(t-t')}{\tau}\right) \phi_x(\mathbf{r}, t') dt' \quad (\text{Eq. 1-23})$$

avec :

- ϕ_x et ϕ_m les densités de photons aux longueurs d'onde d'excitation (indice x) et d'émission (indice m).
- $\mu_{ax \rightarrow}$ et $\mu_{am \rightarrow}$ sont les coefficients d'absorption liés à la concentration locale de chromophores à la longueur d'onde d'excitation et d'émission respectivement.
- $\mu_{ax \rightarrow m}$ est le coefficient d'absorption lié à la concentration locale de fluorophores à la longueur d'onde d'excitation.
- D_x et D_m les coefficients de diffusion aux longueurs d'onde d'excitation (indice x) et d'émission (indice m).
- $S_x(\mathbf{r}_s, t)$ est le terme de source.
- le terme de droite de l'équation (Eq. 1-23) est interprété comme un terme de source fluorescent.

L'équation (Eq. 1-23) qui est assez complexe, ne possède pas en général de solution analytique [47]. Des solutions peuvent cependant être obtenues par des méthodes numériques [48]. Pour notre part, nous effectuerons des approximations pour obtenir une expression analytique de ϕ_m [49, 50, 51]. Cette démarche sera rappelée au début du chapitre 5.

1.5 Instrumentation optique

Maintenant que nous avons décrit les interactions lumière-tissu puis leur modélisation, nous passons aux aspects instrumentaux de l'imagerie optique diffuse. De nombreux types d'appareil de mesure ont été développés. Nous aborderons ici quelques points techniques de ces systèmes qui se divisent généralement en trois grandes catégories selon la source de lumière utilisée : les appareils en continu, les systèmes fréquentiels et les systèmes temporels. Leur principe de fonctionnement est illustré sur la figure 1.8. Le dernier paragraphe de cette section propose une discussion comparative sur ces différentes méthodes.

1.5.1 Continu

Les instruments utilisant une source de lumière continue ont été les premiers à être développés en imagerie optique. La source de lumière peut être soit une source blanche

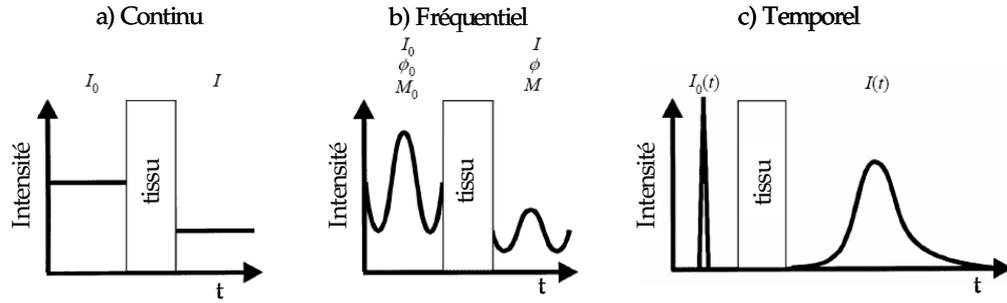


FIG. 1.8: Schéma des trois principaux types d'imagerie optique (adapté de [52]).

filtrée, soit le plus souvent une source laser monochromatique. Les détecteurs mesurent l'atténuation de l'intensité lumineuse (figure 1.8 (a)). Ce sont soit des détecteurs ponctuels (photomultiplicateurs, photodiodes ou photodiodes à avalanches), soit des caméras CCD refroidies. Un filtre de fluorescence adapté est placé devant le ou les détecteurs.

1.5.2 Fréquentiel

La deuxième catégorie d'instruments utilise de la lumière modulée en intensité, à une fréquence donnée. La source lumineuse est généralement une source laser modulée en intensité à des fréquences radio (quelques centaines de MHz). Le détecteur mesure à la fois l'amplitude M de l'intensité lumineuse et sa phase ϕ par rapport à la source [19, 53] (figure 1.8 (b)).

1.5.3 Temporel

La dernière catégorie utilise des impulsions lumineuses comme source de lumière. Le détecteur mesure la distribution temporelle de la lumière à la sortie du tissu (figure 1.8 (c)). Les sources sont soit des diodes laser pulsées picosecondes (longueur d'onde fixe), soit des lasers (accordables ou non) pico ou femtosecondes. Leur taux de répétition est de l'ordre de 50 à 100 MHz.

La détection peut soit se faire point à point avec un balayage, soit en parallèle selon le type de capteur. Nous citerons les trois types de systèmes les plus fréquents.

Le premier est un système de comptage de photons corrélés dans le temps (TCSPC pour Time Correlated Single Photon Counting) [54] que nous détaillerons davantage dans la partie expérimentale. Le détecteur est souvent un tube photomultiplicateur (PM). Le principe de la mesure est de détecter au maximum un photon par impulsion lumineuse. Le temps écoulé entre l'impulsion de synchronisation et l'arrivée de chaque photon est enregistré par une électronique spécifique. L'acquisition est effectuée sur un grand nombre d'impulsions laser ce qui permet de reconstituer l'histogramme du profil temporel des temps d'arrivée des photons (TPSF).

Une caméra à balayage de fente [55] peut aussi être utilisée pour enregistrer les TPSF sur quelques points simultanément avec une résolution temporelle de 1 à 10 ps.

Enfin, le développement récent de caméras rapides intensifiées permet de réaliser des images résolues en temps mais avec une moindre résolution (acquisition sur une porte de 200 ps) [56]. Nous détaillerons également son fonctionnement dans la dernière partie.

1.5.4 Comparaison entre les méthodes

Il existe des liens entre les trois méthodes. L'information continue peut être obtenue en prenant la composante continue de la source modulée en fréquentiel ou en intégrant par rapport au temps les signaux temporels. Par ailleurs, la transformée de Fourier lie les approches temporelles et fréquentielles. Nous allons préciser ces relations, en ajoutant les informations fournies par chacune des méthodes, pour comprendre les spécificités de chacune d'elles.

Les systèmes en continu sont les plus simples et les plus économiques à mettre en oeuvre. Ils présentent l'avantage de fournir des acquisitions rapides. Ils possèdent cependant quelques inconvénients :

- les mesures sont surtout sensibles aux propriétés optiques en surface. Ceci est dû à la forme en banane du volume sondé en fonction des positions de la source et du détecteur pour des mesures en réflectance [57].
- si l'illumination se fait par une fibre en contact avec le milieu, l'intensité est très sensible au couplage. On peut en avoir une idée en regardant les variations d'intensité lorsque l'on presse plus ou moins fort une fibre contre sa main.
- enfin, la mesure d'intensité pour une position source-détecteur ne permet pas de déterminer à la fois μ_a et μ'_s , par exemple pour un milieu homogène.

Les méthodes fréquentielles et temporelles permettent de s'affranchir des problèmes d'intensité et de sonder les tissus plus en profondeur. De plus, à partir d'une mesure unique sur un milieu homogène, les coefficients optiques peuvent être déterminés. Ces faits établis, la comparaison entre les méthodes fréquentielles et temporelles prolonge un débat ouvert il y a plus d'une dizaine d'années.

Un premier point de comparaison concerne les éléments techniques des deux montages, sur les plans des coûts et des performances. Les sources modulées en fréquence et leurs détecteurs sont d'un prix moins élevé que les sources pulsées et les détecteurs associés. Du point de vue de la sensibilité, les systèmes à comptage de photons sont très performants mais on peut aussi leur reprocher leur temps d'acquisition.

Un second argument en faveur du temporel est que les systèmes résolus en temps détectent un signal temporel qui est l'équivalent de mesures fréquentielles sur un grand nombre de fréquences. Ceci implique donc que les données temporelles sont théoriquement plus riches en informations qu'une mesure fréquentielle à une seule fréquence. Cependant, si uniquement l'amplitude et le temps moyen des courbes temporelles sont exploités, alors il a été montré que ces données sont équivalentes à l'amplitude et à la phase en fréquentiel (voir [58] et annexe D section D.3). Toute la richesse des courbes temporelles reste à exploiter. L'exploitation de ces autres informations (par exemple les moments d'ordre supérieur) peut conduire à des problèmes inverses difficiles et ces données sont plus sensibles au bruit. Nous avons choisi un système temporel pour sa sensibilité, sa résolution et le contenu informationnel de ses signaux.

1.6 État de l'art en imagerie optique temporelle de fluorescence

La littérature concernant les méthodes temporelles en fluorescence est assez restreinte comparée à celle des méthodes fréquentielles. Il est intéressant d'en faire une revue pour comprendre quels sont les axes de recherche et les domaines explorés. Nous allons séparer les références en deux catégories, la première est celle où les auteurs proposent uniquement des modèles directs pour interpréter la fluorescence, la seconde est celle où une méthode de reconstruction est proposée.

1.6.1 Modèle direct de fluorescence

Patterson et Pogue [47] ont introduit les équations décrivant la fluorescence dans le domaine temporel, puis les ont adaptées dans le cadre de l'approximation de la diffusion. Sadoqui *et al.* [59] proposent des modèles analytiques de fluorescence dans le cadre de l'approximation de la diffusion pour différentes géométries. Ils valident leurs modèles par comparaison à des mesures expérimentales.

Gandjbakhche *et al.* [46, 60, 61] adaptent le modèle statistique appelé RWT (présenté à la section 1.4.4) à la fluorescence et ils comparent ce modèle à des mesures expérimentales.

1.6.2 Méthodes de reconstruction

Plusieurs méthodes de reconstruction ont été proposées, nous en proposons une liste non exhaustive pour avoir une idée de leur diversité :

Le premier article date de 1995 par Wu *et al.* [62, 63]. Le système expérimental est constitué d'un laser et d'un système de fibres, la détection se fait par une caméra à balayage de fente. La méthode de localisation utilise la détection des photons les premiers arrivés, avec un modèle qui donne une formule analytique du temps de demi-montée. Ce temps est le temps de demi-montée par rapport au temps qui correspond au maximum d'amplitude. Cette méthode permet une bonne localisation d'un objet unique. Ensuite, cette même équipe a amélioré sa méthode tout en conservant le même système expérimental [64]. Elle propose un algorithme de reconstruction, utilisant toujours les photons les premiers arrivés, basé sur l'utilisation de la transformée de Laplace.

Une méthode complète de reconstruction est proposée par Quan *et al* [65]. Elle repose sur le calcul de temps de vol des photons. Elle est validée sur des données simulées. Gao *et al.* [66] a pour sa part mis en œuvre une méthode de reconstruction basée sur un modèle direct numérique en éléments finis, utilisant les deux premiers moments de Laplace. Des résultats sur des simulations sont présentés. Plus récemment, l'équipe de Gandjbakhche [67] applique un algorithme de reconstruction basé sur la méthode RWT à des simulations.

Une autre méthode testée sur des fantômes optiques permet de reconstruire directement le temps de vie de fluorescence [68]. Elle présente l'avantage de pouvoir, par exemple, discriminer deux fluorophores avec deux temps de vie différents.

Enfin, une dernière équipe autour de la société ART [69] traite les mesures temporelles. Hall *et al.* [51] propose une méthode simple utilisant le temps détecté au maximum d'amplitude du signal de fluorescence. Ce temps est noté t_{max} . Il est très sensible à la profondeur d'une inclusion fluorescente et une bonne précision est obtenue sur la profondeur à partir de mesures de calibration. Cependant, ce paramètre n'est pas très robuste sur des mesures temporelles bruitées qui présentent un pic assez plat.

Lam *et al* [1] ont ensuite choisi d'extraire deux nouveaux paramètres des courbes de fluorescence. Ces paramètres sont les deux premiers moments (le temps moyen et la variance) des courbes temporelles, normées par la courbe d'excitation. Ils étaient déjà utilisés pour la tomographie diffuse sans fluorescence. Le modèle direct est basé sur les expressions analytiques des deux moments de fluorescence en milieu infini. La distribution spatiale des éléments fluorescents dans le volume est reconstruite grâce à un algorithme de type ART (Algebraic Reconstruction Technique [70]). Les reconstructions sont testées sur des simulations. Les reconstructions (avec un modèle direct bruité) donnent de meilleurs résultats en utilisant les moments plutôt que l'intensité seule, même avec un fond fluorescent. Un des avantages de l'utilisation des moments est qu'ils permettent de s'affranchir d'artefacts causés par la surface quand on n'utilise que l'intensité (la variance est plus sensible aux pixels profonds). Cette méthode s'applique pour un seul type de fluorophore, c'est-à-dire que son temps de vie est le même en tous les points du volume et est supposé connu.

Ces travaux sont accompagnés de dépôts de nombreux brevets sur l'appareillage et les méthodes de mesures temporelles [71, 72, 73] et ont conduit au développement d'un appareil commercial nommé ExplorOptics. Cet appareil utilise un système TCSPC. Un article par Bloch *et al* [69] réalisé en collaboration avec des biologistes a permis de tester les performances de cet appareil commercial *in vivo* sur des souris présentant des tumeurs marquées. La reconstruction est effectuée grâce à la méthode de l'article précédent avec les deux premiers moments. Cette étude montre l'efficacité de cet appareil sur des souris marquées. Deux types d'images permettent d'interpréter les résultats : une image de temps de vie de fluorescence et une image en 3D de la distribution spatiale de la concentration de fluorophores. Nous notons également que cette équipe a exploré les possibilités d'utilisation d'une caméra rapide pour l'imagerie de fluorescence [72].

Nous allons pour notre part nous placer dans le cadre de l'approximation de la diffusion, déjà utilisée pour le tomographe en continu du laboratoire. Pour les mesures de fluorescence, nous avons choisi l'exploitation des moments, dans la continuité des travaux de l'équipe autour de la société ART. Leur méthode est basée sur un modèle de géométrie infinie, et fait donc une approximation sur la géométrie de l'objet. Nous nous attacherons à commencer par valider ce modèle dans un cas simple de fluorophore ponctuel puis à en proposer une version adaptée à la géométrie semi-infinie. Nous reviendrons également sur la contrainte de connaître le temps de vie de fluorescence pour utiliser les moments.

Nous finissons ce chapitre en citant deux applications *in vivo* sur l'homme. Elles montrent les champs d'applications possibles et le besoin de méthodes de reconstructions.

Certaines équipes se sont intéressées aux applications en mammographie. Cependant, l'essentiel des appareils en temporel sont dédiés aux applications en diffusion, sans fluorescence, avec plusieurs longueurs d'onde [74, 75, 76]. Les appareils en fluorescence sont plutôt développés dans le domaine fréquentiel. Nous n'avons recensé qu'un seul article décrivant l'utilisation d'un mammographe en fluorescence résolue en temps. Ebert *et al.* [77] ont adapté un mammographe déjà utilisé sur des patients en diffusion pour le tester sur des fantômes de 5 cm d'épaisseur contenant une inclusion fluorescente. Le fluorophore est une molécule de type cyanine (appelée SIDAG). Des mesures *ex vivo* ont montré la spécificité du marqueur sur les tumeurs. Ce travail a établi la faisabilité de la détection en fluorescence résolue en temps et présente aussi l'intérêt de montrer que le contraste est supérieur à celui obtenu en absorption seule. Néanmoins, les TPSFs ne sont pas entièrement exploitées, seul le nombre total de photons dans certaines fenêtres temporelles a été utilisé pour faire ressortir le contraste.

Un article de l'équipe de Liebert [78] a récemment présenté pour la première fois des mesures temporelles de fluorescence *in vivo* sur le cerveau humain. Ils montrent ainsi la faisabilité de ce type d'imagerie. Ils avaient déjà démontré que des changements d'absorption pouvaient être détectés par des méthodes temporelles. Ici, le colorant ICG a été injecté par voie intraveineuse à deux sujets sains. Les deux premiers moments des courbes temporelles permettent d'avoir des informations sur la profondeur sondée. Ils s'appuient pour cela sur des simulations Monte Carlo du crâne mais ne disposent pas de boucle de reconstruction complète.

Bilan du chapitre

La description des phénomènes de propagation de la lumière dans les tissus biologiques a souligné leur caractère très diffusant et la possibilité d'avoir des informations sur les tissus grâce à leurs propriétés optiques. De plus, nous avons vu l'intérêt de l'utilisation de marqueurs fluorescents dans le cadre de l'imagerie optique de fluorescence. Ils permettent en effet d'obtenir un contraste spécifique. Nous avons ensuite passé en revue des modèles théoriques pour décrire l'interaction de la lumière avec les tissus pour situer l'approximation de la diffusion que nous allons utiliser dans la suite de ce travail. Nous avons également distingué les différents systèmes d'imagerie optique existants et montré les avantages des systèmes résolus en temps. Enfin, la revue de l'état de l'art des méthodes de fluorescence résolues en temps a mis en évidence la diversité des modèles directs utilisés et le faible nombre d'applications sur fantôme expérimental ou *in vivo*. Nous allons dans le chapitre suivant détailler le système expérimental résolu en temps que nous avons mis en oeuvre dans le cadre de cette thèse.

Chapitre 2

Mise en place du système d'acquisition TCSPC

L'objectif de cette partie est de présenter la mise en place du dispositif de mesure de courbes temporelles pour la caractérisation des milieux diffusants, c'est-à-dire la chaîne complète pour mesurer la dispersion temporelle d'une impulsion lumineuse après traversée d'un milieu diffusant. Pour cela, nous avons choisi les différents éléments puis décrit les réglages de la chaîne et évalué les performances globales. Cette analyse nous a donné les éléments nécessaires au prétraitement des données de manière à isoler, dans la mesure, le seul signal d'intérêt.

Sommaire

2.1	Présentation de la chaîne d'acquisition	31
2.2	Choix des éléments du système	31
2.2.1	Source laser	31
2.2.2	Autres éléments du banc optique	33
2.2.3	Photomultiplicateur	35
2.2.4	Préamplificateur	35
2.2.5	Chaîne de comptage	36
2.2.6	Pilotage de la carte en mode balayage	39
2.3	Réglages de la chaîne de comptage	39
2.3.1	Mesure de la réponse de l'instrument	39
2.3.2	Banc optique	41
2.3.3	Réglages de la carte TCSPC	41
2.4	Évaluation des performances du système	42
2.4.1	Ergodicité de la plage de mesure	42
2.4.2	Description des sources de bruit	42
2.4.3	Stabilité temporelle	43
2.5	Prétraitement des données	45
2.5.1	Mesures en diffusion seule	45
2.5.2	Mesures en fluorescence	46

2.1 Présentation de la chaîne d'acquisition

La figure 2.1 montre un schéma global de la chaîne d'acquisition TCSPC (*Time Correlated Single Photon Counting*) que nous allons présenter brièvement dans cette section. Une diode laser envoie un faisceau lumineux focalisé sur l'entrée d'une fibre qui va éclairer le milieu diffusant. La lumière est collectée par une seconde fibre dont l'autre extrémité est placée devant un photomultiplicateur (PM). Le système de mesure utilise une carte à comptage de photon unique pour exploiter le signal du photomultiplicateur et générer les courbes temporelles. Les éléments entre parenthèses sur la figure sont utilisés lors des mesures de fluorescence. Le principe de chaque type de mesure sera précisé dans le chapitre concerné.

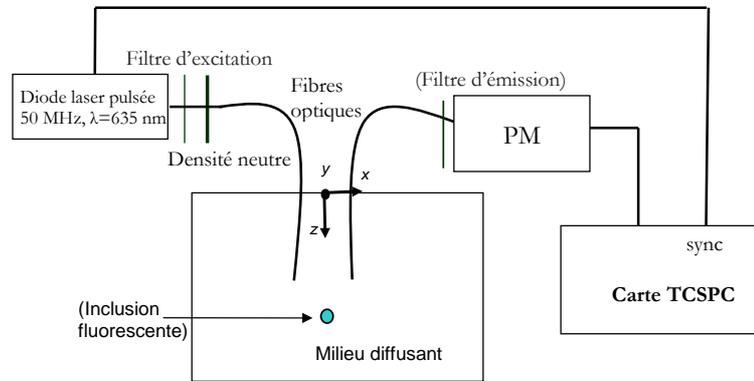


FIG. 2.1: Schéma de la chaîne d'acquisition.

Nous avons effectué les mesures avec le fluorophore Cy5, le système de filtrage est donc choisi pour ses caractéristiques. Il présente un maximum d'absorption à 649 nm. Son maximum d'émission se situe à 664 nm. Son temps de vie a été mesuré par une technique classique sur une solution diluée, en tenant compte de la réponse de l'instrument [6]. La valeur de $\tau = 1.02 \text{ ns} \pm 0.10 \text{ ns}$ a été mesurée. La démarche pourra s'adapter à d'autres fluorophores.

Nous allons maintenant décrire plus en détails chacun des éléments cités pour comprendre leurs spécificités et le fonctionnement du système.

2.2 Choix des éléments du système

2.2.1 Source laser

La source laser utilisée est une diode laser émettant à 635 nm qui fait partie d'un module BHL-600 fourni par Becker&Hickl. Cette longueur d'onde permet est compatible avec le Cy5 (considérant une absorbance de 100 % à 649 nm, elle est de 80 % à 635 nm). Le taux de répétition est fixé à 50 MHz. Un signal de synchronisation est généré

par le module et est envoyé sur la carte de comptage. La puissance crête maximum est d'environ 100 mW et la puissance moyenne peut varier de 100 à 500 μW .

Forme de l'impulsion selon la puissance du laser La puissance se règle par un potentiomètre sur la diode. La forme des impulsions dépend de la puissance fournie, la largeur à mi-hauteur varie de 40 à 100 ps environ. Sur la figure 2.2 sont représentées les formes des impulsions lumineuses pour différentes puissances décroissantes. Nous détaillerons ci-dessous comment sont mesurées ces impulsions. Ces données sont bien en accord avec la notice de la diode. La largeur à mi-hauteur est plus faible pour les fortes puissances mais la forme de l'impulsion présente un « rebond » marqué. La largeur à mi-hauteur augmente lorsque la puissance diminue et le rebond est de moins en moins marqué.

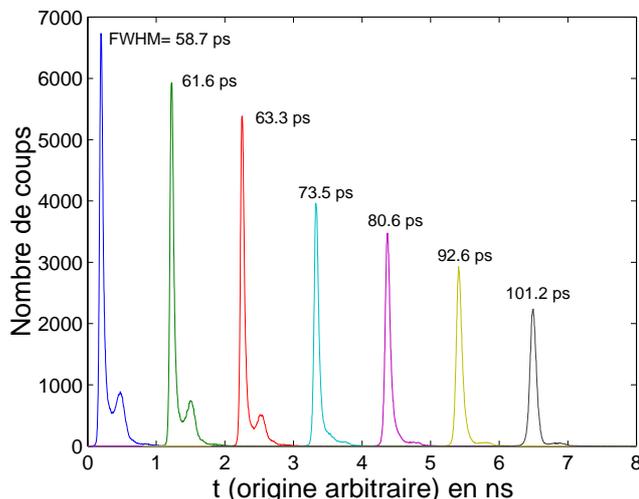


FIG. 2.2: *Forme des impulsions lumineuses de la diode BHL-600 pour des puissances lumineuses décroissantes.*

Pour effectuer les mesures, nous avons choisi la puissance qui donnait une largeur à mi-hauteur de l'ordre de 80 ps. Cette puissance moyenne est d'environ 140 μW en sortie de fibre.

Caractéristiques spectrales La mesure du spectre de la diode montre que celui-ci est centré sur 631 nm (figure 2.3 (a)). Ce spectre a été mesuré avec un spectromètre à fibre, en utilisant des densités neutres de l'ordre de 6 devant le laser (atténuation d'un facteur 10^6). Le spectre possède une base assez large, ce qui est caractéristique des diodes à semi-conducteurs.

Nous pouvons observer son spectre au-delà de 631 nm en mettant devant la diode un filtre passe-haut (RG665, Schott, voir son spectre sur la figure 2.4) et en retirant les densités. Le filtre atténue d'un facteur environ 10^5 l'intensité de la diode jusqu'à

650 nm. Le spectre obtenu est représenté sur la figure 2.3 (b) où le spectre de la diode (mesuré précédemment avec le même temps d'intégration) est superposé. Nous observons du signal jusqu'à 750 nm. Même si ces composantes au-delà de 631 nm sont bien évidemment faibles en intensité, elles sont gênantes : d'une part, car elles peuvent engendrer une faible dispersion temporelle, d'autre part, car elles peuvent perturber les mesures de fluorescence. C'est pourquoi, il est nécessaire de placer un filtre d'excitation (HQ620\60x, Chroma) devant la diode laser. Il s'agit d'un filtre interférentiel passe-bande, sa coupure haute se trouve sur la figure 2.4.

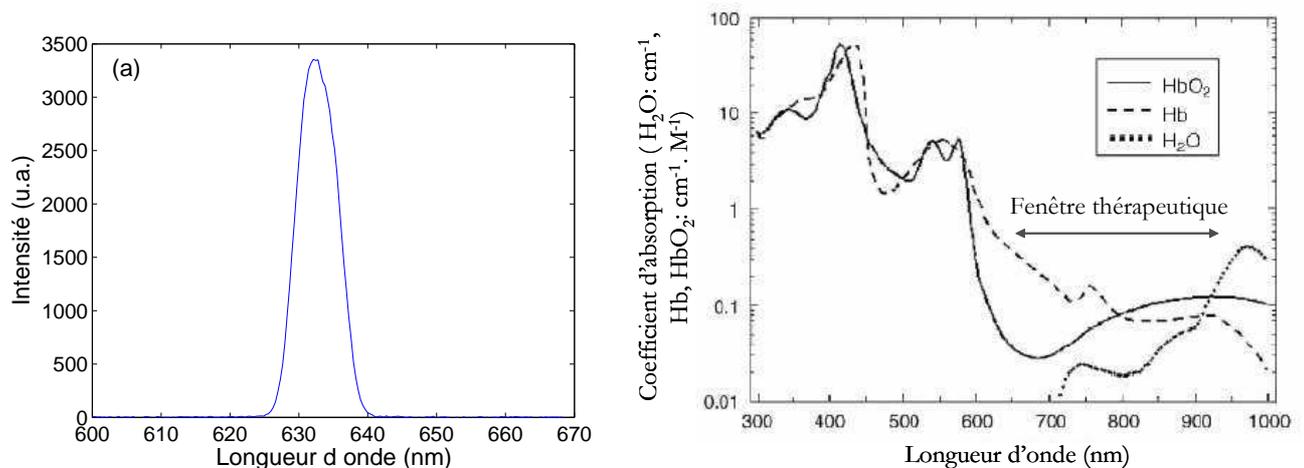


FIG. 2.3: (a) Spectre de la diode BHL-100, centré sur 631 nm (mesuré avec des densités neutres atténuant d'un facteur environ 10^6). (b) Le spectre de la figure (a) (en pointillés) est superposé au spectre de la diode (sans les densités) mesuré avec un filtre passe-haut RG665, de manière à observer des longueurs d'onde au-delà de 631 nm.

2.2.2 Autres éléments du banc optique

Filtres de fluorescence Nous décrivons les filtres d'émission de fluorescence que nous avons utilisés pour les mesures avec le fluorophore Cy5. Nous avons utilisé un filtre interférentiel passe-haut (HQ665LP, Chroma) doublé par un filtre passe-haut en verre coloré (RG665, Schott) que nous avons déjà mentionné ci-dessus. Le filtre interférentiel est très sensible à une incidence non normale. Comme les filtres sont placés entre l'extrémité de la fibre de réception et le photomultiplicateur, nous ne pouvons pas imposer une incidence normale de la lumière sur le filtre interférentiel, à cause de l'ouverture numérique de la fibre. Le filtre coloré est donc là pour corriger les défauts du filtre interférentiel. Nous avons effectivement constaté une amélioration du filtrage lors de l'ajout du filtre coloré.

Densités optiques La puissance de la source de lumière doit être ajustée pour ne pas détériorer le photomultiplicateur (voir section suivante). Un jeu de densités optiques également appelées densités neutres permet d'atténuer le faisceau laser.

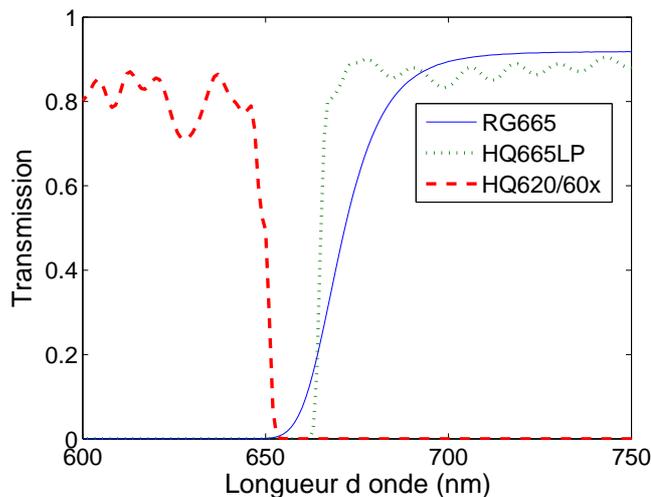


FIG. 2.4: *Transmission des différents filtres utilisés sur le montage. Le filtre HQ620\60x est le filtre d'excitation placé devant la diode laser. Les filtres HQ665LP et RG665 sont les deux filtres de fluorescence placés devant le photomultiplicateur.*

Fibres La fibre d'émission est une fibre multimode de diamètre de coeur $65 \mu\text{m}$. Celle de réception est une fibre multimode de diamètre de coeur $600 \mu\text{m}$, entourée d'une gaine plastique d'un diamètre de 1 mm.

L'extrémité de la fibre d'émission a été modifiée car nous souhaitions plonger les fibres dans un liquide, sans être gêné par le connecteur. Pour cela, la fibre a été dénudée et glissée dans un embout métallique rigide et fin (diamètre 0.5 mm). Au départ, la fibre de réception était similaire à celle d'émission mais nous sommes passés à la fibre de diamètre supérieur de façon à recueillir plus de signal. Nous avons vérifié que la forme des signaux temporels était bien la même avec les deux fibres de taille de coeur différentes, même si l'amplitude changeait. Ceci montre bien que la différence de dispersion temporelle entre les deux fibres est négligeable.



FIG. 2.5: *Photo des fibres utilisées : en haut, la fibre d'émission dans son embout métallique, en bas, la fibre de détection.*

Support pour les fibres Nous avons utilisé différents supports pour les fibres. Les plus simples étaient des plaques percées de trous à différentes distances. L'épaisseur de la plaque suffisait pour maintenir les fibres en place. Cependant, comme elles étaient un peu flexibles, la distance qui les séparait devait être mesurée à leur extrémité et non entre les trous sur la plaque.

Le support pour les fibres est fixé sur une monture reliée à deux tables de translation motorisées (course de 25 mm) de façon à pouvoir effectuer un balayage en (x, y) . Ce balayage sera utilisé pour les mesures de fluorescence du chapitre 5. Lors de ces mesures, nous avons eu besoin de connaître avec précision la position des fibres et donc d'avoir un système plus rigide, toujours avec un encombrement minimal. Une nouvelle plaque a été usinée, avec des tubes en métal pour guider les fibres (figure 2.6).

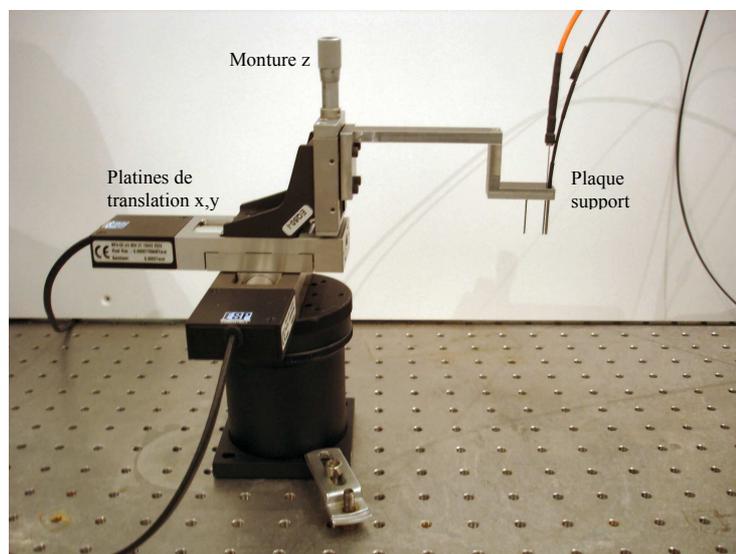


FIG. 2.6: Photo du support des fibres.

2.2.3 Photomultiplicateur

Le détecteur utilisé est un photomultiplicateur Hamamatsu à une anode R3809U-50. Le principe de fonctionnement et ses principales caractéristiques sont donnés en annexe A. Les critères de choix ont été sa sensibilité dans le proche infrarouge (efficacité quantique de la photocathode à 600 nm : 7 %) et surtout sa rapidité, c'est-à-dire son aptitude à mesurer des impulsions courtes. Cette aptitude est évaluée par sa dispersion du temps de transit (25 ps) et ses temps de montée et de descente. Plus de détails sur ces éléments peuvent être trouvés dans l'Annexe A.

2.2.4 Préamplificateur

Un amplificateur (HFAC-26, Becker&Hickl) est placé en sortie du PM pour augmenter l'amplitude des signaux avant la carte de comptage. En effet, malgré le fort gain

du PM, ceux-ci ont une amplitude assez faible car ils correspondent à la détection d'un photon unique. Une fonction de détection de courant permet de couper l'alimentation haute tension du PM en cas de surcharge en courant.

2.2.5 Chaîne de comptage

Le système utilisé est le module Becker&Hickl SPC-730. Le logiciel SPCM fourni avec la carte permet de contrôler la carte et l'alimentation haute tension du PM. Ces cartes sont appelées TCSPC pour « Time Correlated Single Photon Counting ».

Principe du TCSPC Ce système repose sur la détection de photon unique : un seul photon (ou aucun) est détecté par impulsion lumineuse. Le temps d'arrivée de ce photon, par rapport au signal de synchronisation de la source laser, est enregistré. Ce processus est répété un grand nombre de fois, à la fréquence de répétition de la source laser. Ainsi un histogramme des temps d'arrivée des photons est-il construit au bout d'un grand nombre de répétitions (figure 2.7). Cet histogramme, aussi appelé TPSF (*Temporal Point Spread Function*) reflète la forme de l'impulsion lumineuse.

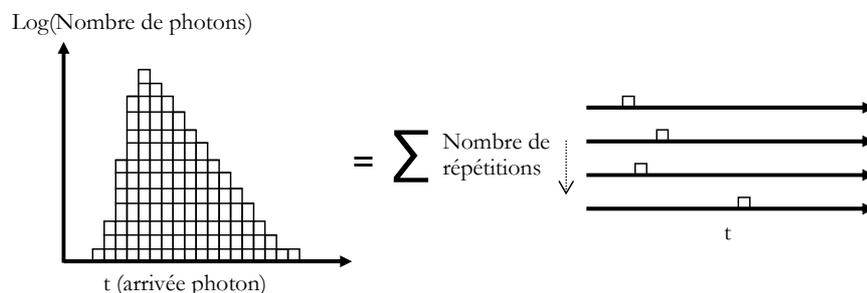


FIG. 2.7: Schéma illustrant la construction de l'histogramme des temps d'arrivée des photons (TPSF) par la carte TCSPC.

Une des hypothèses pour le bon fonctionnement de ce système est de se placer en régime de comptage de photon unique. La probabilité de détection d'un seul photon par période doit être inférieure à 0.1 afin d'être sûr que la probabilité de détecter deux photons soit négligeable. Le constructeur conseille de limiter le taux de comptage du PM à quelques $2 \cdot 10^4$ photons par seconde (voir Annexe A) pour les applications en comptage de photons. Nous atténuons la puissance du laser avec des densités neutres pour rester autour de ce taux de comptage. Or la fréquence de répétition de la source est de 50 MHz. On a donc une probabilité d'environ $4 \cdot 10^{-4}$ de détecter un photon par impulsion, ce qui est largement au-dessous du seuil cité. On notera par ailleurs que c'est le photomultiplicateur qui limite le taux de comptage du système.

Fonctionnement du TCSPC Un photon incident sur la photocathode génère un signal sous forme d'une impulsion électrique dont l'amplitude peut être un peu variable (dû aux fluctuations du gain du PM). Ce qui nous intéresse est de connaître avec précision le temps d'arrivée de ce photon, indépendamment de l'amplitude de l'impulsion et donc de ses éventuelles variations. C'est le circuit DFC (Discriminateur à Fraction Constante) qui va permettre de déterminer ce temps.

Dans un premier temps, le DFC rejette les signaux qui ont une tension inférieure à un seuil (limite basse du DFC), ce qui permet de s'affranchir d'une partie du bruit dû au PM.

La seconde fonction est de s'affranchir des variations d'amplitude du signal d'entrée. Le principe est de détecter l'instant de franchissement d'une fraction constante de l'amplitude, c'est-à-dire détecter un zéro sur un signal modifié. Cette fonction est réalisée par une construction électrique qui décompose le signal d'entrée en deux (figure 2.8). Il atténue la première partie, inverse et retarde la seconde avant de les sommer. Le résultat est un signal bipolaire qui a la propriété de passer par zéro toujours au même instant quelle que soit l'amplitude du signal d'entrée, si celui-ci conserve la même forme. Cette propriété est illustrée sur la figure 2.9. Un comparateur repère le point qui passe par zéro et produit un signal électrique qui sera interprété comme un « start » pour le module suivant. Ce n'est plus exactement le temps d'arrivée du photon que l'on détecte mais un temps qui dépend des retards et de l'atténuation appliqués.

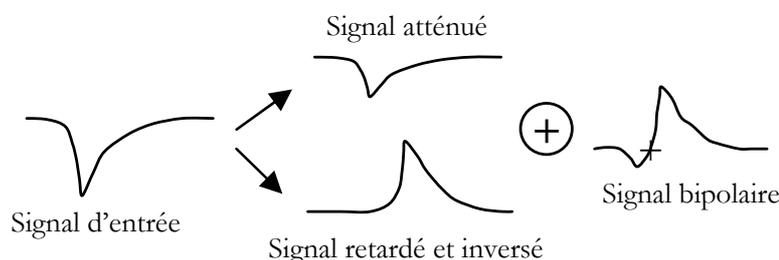


FIG. 2.8: Traitement du signal d'entrée par le DFC.

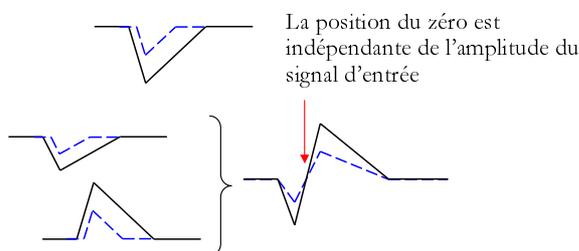


FIG. 2.9: Illustration de la position du zéro du signal bipolaire pour deux signaux d'entrée d'amplitudes différentes.

Le convertisseur temps-amplitude (CTA) permet de déterminer le temps d'arrivée du photon détecté par rapport à l'impulsion de référence issue de la diode pulsée et qui

sera elle-même passée par le DFC. Le convertisseur se déclenche au « start » produit à l'arrivée d'un photon donné par le DFC. Une rampe linéaire de tension de pente connue démarre et est stoppée à la détection de la prochaine impulsion de référence. Le CTA délivre donc une tension qui permet de connaître le temps δt écoulé entre le photon et la prochaine référence. Le temps d'arrivée est alors $T - \delta t$, avec T la période du laser. Ce système est plus efficace que de déclencher la rampe à chaque impulsion de référence car il n'y a pas toujours de photon détecté à chaque impulsion. Le principe de la mesure est récapitulé sur la figure 2.10.

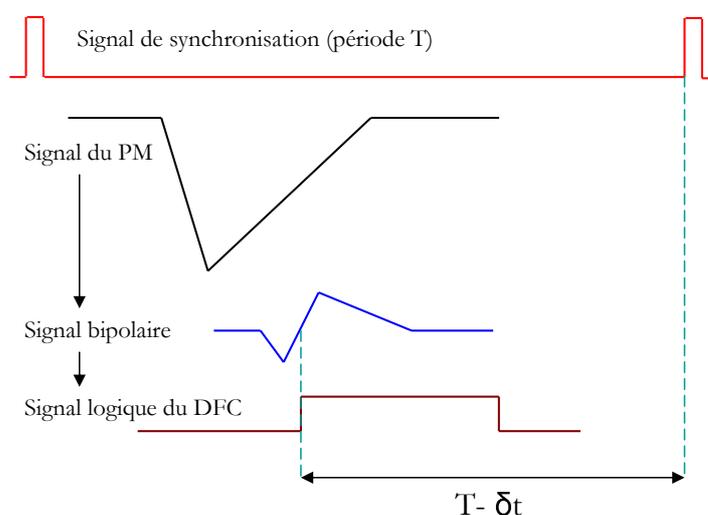


FIG. 2.10: Récapitulatif des étapes pour passer du signal de sortie du PM au déclenchement du signal logique du DFC.

Le convertisseur analogique-numérique (CAN) convertit le signal du CTA amplifié en un signal numérique. L'ensemble des éléments de la carte est regroupé sur le schéma suivant (figure 2.11).

Un des avantages du système est donc sa résolution temporelle car celle-ci n'est pas limitée par la réponse impulsionnelle du PM. Même si la réponse impulsionnelle du PM est large (environ 300 ps à mi-hauteur - donnée constructeur, voir annexe A), elle est détectée de façon bien plus précise par la chaîne électronique. La résolution en temps est donc limitée par la dispersion des temps de transit du PM et par la précision de la carte de comptage.

Importance des câbles Nous soulignons ici l'importance des câbles électriques utilisés dans le montage. La nature des câbles doit être choisie pour ne pas altérer le signal et leur longueur doit être compatible avec la chronologie des signaux.

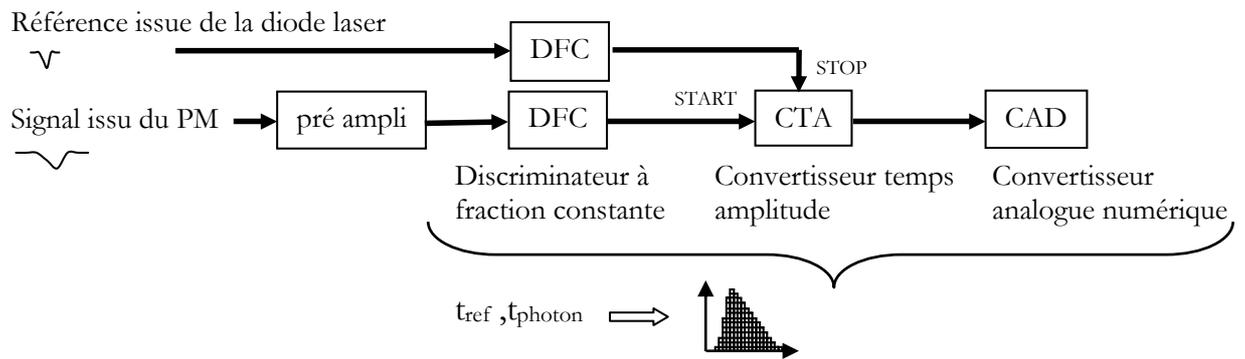


FIG. 2.11: Les différents éléments qui composent la carte de comptage TCSPC.

2.2.6 Pilotage de la carte en mode balayage

Nous souhaitons réaliser des mesures automatiques en différents points après déplacements de platines de translation. Il existe de nombreux modes opératoires plus ou moins complexes proposés par le logiciel SPCM, notamment pour des couplages avec des microscopes.

Nous avons choisi le mode *trigger*. Dans ce mode, il faut définir à l'avance le nombre de mesures et la mesure est déclenchée par un signal sur une entrée trigger de la carte. Nous avons réalisé une interface Labview qui permet de piloter les platines de translation et de déclencher l'acquisition TCSPC. Le déclenchement se fait grâce à une commande Labview qui envoie une impulsion de tension sur une des broches du port parallèle. Nous avons assemblé un câble adapté pour relier cette broche du port parallèle vers la broche trigger de l'entrée de la carte TCSPC.

2.3 Réglages de la chaîne de comptage

2.3.1 Mesure de la réponse de l'instrument

Définition La réponse de l'instrument, (appelée IRF pour *Instrument Response Function* en anglais), représente la répartition temporelle de l'impulsion laser détectée par la chaîne de mesure, sans milieu diffusant. Les conditions doivent être les mêmes que pour la mesure qui suivra sur le milieu diffusant. Elle pourrait être interprétée comme une réponse impulsionnelle si l'excitation laser était un Dirac parfait. Or la source laser possède sa propre largeur temporelle, l'IRF est donc la convolution de la réponse de la diode et de la réponse impulsionnelle. Cette dernière comprend pour sa part la réponse de l'ensemble des autres éléments du système : les densités optiques, les fibres optiques, le PM et toute la chaîne électronique. Chaque élément apporte un retard et/ou un élargissement temporel du signal.

Importance de l'IRF La connaissance de l'IRF est cruciale car tout signal mesuré par le système est convolué par l'IRF. Or la mesure de l'IRF est complexe et peut être source d'erreurs, c'est pourquoi, nous chercherons par la suite à établir des méthodes pour nous affranchir de cette connaissance. L'IRF doit en effet être mesurée dans les mêmes conditions que la mesure qui se fera ensuite. L'idéal serait donc de la mesurer en simultané avec la mesure en séparant le faisceau lumineux si on possède deux canaux de mesure.

Mesure de l'IRF Comme nous n'avons qu'un seul canal de mesure, la mesure de l'IRF se fait indépendamment de la mesure. Le faisceau doit être atténué de façon à ne pas endommager le PM, nous veillons donc à ce que l'épaisseur des verres traversés soit de l'ordre de celle qui sera utilisée pour la mesure. Ceci permet d'avoir les mêmes retards. Les fibres sont positionnées face à face, avec un écart arbitraire, mais connu, de $d = 1.1$ cm pour que la lumière qui sort de la fibre source diverge vers la fibre de réception. La séparation de 1.1 cm dans l'air entraîne un retard de $t = d/c = 1.1/30 = 36.6$ ps dont l'IRF sera corrigée pour être recalée par rapport aux mesures.

Certaines publications [77, 79, 80] mentionnent la nécessité d'utiliser un papier diffusant positionné entre les fibres de façon à exploiter tous les modes de la fibre de réception, comme c'est le cas dans un milieu diffusant. Nous avons mesuré les réponses de l'instrument dans les deux cas, avec et sans papier diffusant (figure 2.12). Il existe un décalage entre les courbes de l'ordre de la quinzaine de picosecondes. Nous avons considéré ce décalage comme négligeable et effectué les mesures sans papier diffusant.

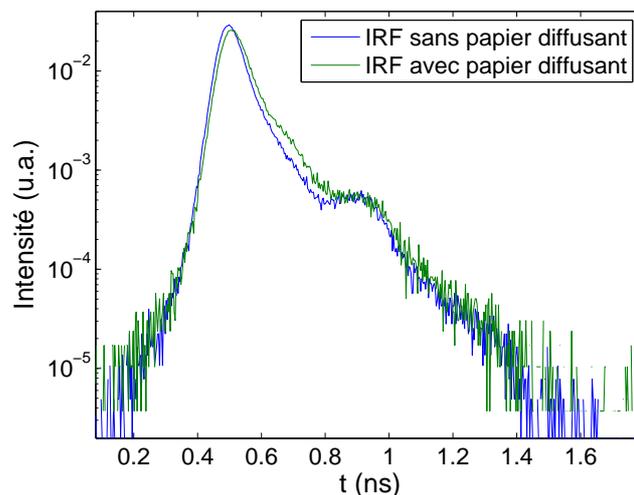


FIG. 2.12: Comparaison de deux mesures de réponse de l'instrument, l'une sans papier diffusant, l'autre avec un papier diffusant situé entre les fibres qui sont séparées de 1.1 cm. Les courbes sont normées à la même aire.

Remarques :

- Si l'on disposait d'une carte de comptage et de détecteurs permettant plusieurs points de mesures (avec des fibres de détection différentes), alors il faudrait considérer autant d'IRF que de moyens de détection. L'IRF est spécifique à sa chaîne de mesure.
- Comment mesurer l'IRF pour des mesures de fluorescence ? Cette question peut être reformulée par : faut-il laisser le filtre de fluorescence, pour être dans les mêmes conditions que les mesures ? La réponse est non, ce qui semble contredire les règles énoncées ci-dessus. En effet, si on laisse le filtre de fluorescence, la longueur d'onde reste celle d'excitation puisqu'il n'y a pas d'objet fluorescent. La longueur d'onde d'excitation est bloquée par le filtre et la mesure n'est pas réalisable (nous notons cependant qu'une faible partie du signal d'excitation peut passer à travers le filtre qui n'est pas parfait : mais ce signal n'est pas exploitable car le filtre de fluorescence apporte des distorsions de l'impulsion si elle est à la longueur d'onde d'excitation). En fluorescence, l'IRF se mesure donc de la même façon que pour les mesures de diffusion seule, sans le filtre d'émission.

2.3.2 Banc optique

Les réflexions optiques sur le banc expérimental peuvent constituer une source de signal parasite. Elles provoquent l'apparition de pics de plus faible amplitude après le pic principal. Ils peuvent être facilement identifiables si leur position bouge quand on déplace les éléments réfléchissants. Nous en avons détectés qui étaient dus à des réflexions sur le PM et sur le support de la fibre. Ils ont été éliminés en recouvrant le support de papier noir et en donnant un léger angle au socle du PM.

2.3.3 Réglages de la carte TCSPC

De nombreux réglages sont disponibles sur les différents éléments (DFC, CTA et CAN) de la carte de comptage. Les consignes du manuel d'utilisation [81] donnent des conseils pour ces réglages dont nous citerons les deux principaux.

Le premier est la limite basse du DFC. Il permet de fixer un seuil en amplitude au-dessous duquel les signaux sont rejetés. Cela permet de s'affranchir de la partie du signal qui ne correspond pas aux photons du signal d'intérêt et qui a généralement une amplitude plus faible que ces derniers. Ces impulsions peuvent venir soit du photomultiplicateur (émission thermique), soit du bruit électronique. Cette valeur n'est pas critique pour nos mesures pour lesquelles nous avons généralement un fort signal.

Le second concerne le réglage du *Zero Crossing Level*. Ce paramètre ajuste le niveau de zéro du trigger pour la détection du zéro de la courbe bipolaire. Son ajustement décale légèrement l'origine et la largeur temporelle des courbes, mais a aussi pour effet d'éliminer la présence d'éventuels pics parasites que nous avons observés avant le pic principal. Nous avons donc augmenté sa valeur juste assez au-dessus de zéro pour éliminer le pic parasite.

2.4 Évaluation des performances du système

2.4.1 Ergodicité de la plage de mesure

Il est important de vérifier l'équivalence des différents canaux de mesure pour assurer la validité des mesures temporelles. En effet, la forme des TPSFs repose bien sur l'équivalence entre les canaux. De plus, la vérification de cette hypothèse d'ergodicité permettra d'effectuer des mesures de bruit sur une seule acquisition temporelle, en prenant les différents canaux comme une même mesure répétée autant de fois que le nombre de canaux.

Par ailleurs, la carte de comptage possède un système de correction des erreurs du convertisseur analogique-numérique. Ce système permet d'améliorer la précision du CAN et éventuellement de palier les défauts d'un canal temporel par un moyennage des caractéristiques du CAN.

Vérification expérimentale Un fond continu a été enregistré pendant une minute, sur vingt mesures différentes. La figure 2.13 représente la moyenne de chaque canal. On remarque que les 130 premiers et les 130 derniers canaux ont été sacrifiés pour le système de correction du CAN et nous éviterons de les utiliser. Les autres canaux sont bien constants autour d'une valeur moyenne (écart type de 0.73 autour d'une moyenne de 9.74). On peut donc bien considérer le système comme ergodique.

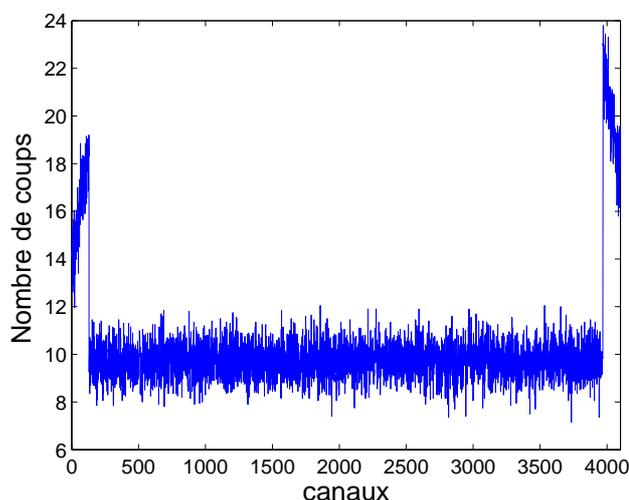


FIG. 2.13: Moyenne sur les 4096 canaux pour 20 mesures d'un fond continu.

2.4.2 Description des sources de bruit

Signal thermique Le signal thermique, aussi appelé bruit d'obscurité, est lié à un signal que le photomultiplicateur délivre lorsqu'il est sous tension même s'il ne reçoit

pas de photons. Des électrons sont spontanément générés par la photocathode et les dynodes en dehors de l'effet photoélectrique. Ce signal, croissant de façon exponentielle avec la température, est d'origine thermique.

Cette génération de charges obéit à une statistique de Poisson. Par définition, le bruit associé à ce signal, c'est-à-dire l'écart type du nombre de charges thermiques, est égal à la racine carrée du nombre de charges thermiques. Ainsi le signal thermique est-il proportionnel au temps d'intégration de la mesure.

Signal d'obscurité Le signal d'obscurité est un signal additif parasite que l'on ne qualifie pas de « bruit » et qui provient de l'environnement de l'expérience. Il est proportionnel au temps d'intégration.

Nous décomposerons les signaux thermiques et d'obscurité en un signal moyen et une partie aléatoire centrée. Nous précisons dans la section prétraitement comment cette valeur moyenne peut être éliminée.

Bruit de photons Le bruit de photons est indépendant du détecteur. Il est lié à la nature statistique (statistique de Poisson) de la distribution des photons émis par la source. Il correspond au bruit du signal utile. Nous le modélisons par un bruit gaussien centré et d'écart type $\sqrt{N_{ph}}$ où N_{ph} est le nombre de photons détectés par la photocathode.

2.4.3 Stabilité temporelle

Stabilité de la puissance du laser Nous avons étudié la puissance moyenne du laser en fonction du temps. Un puissance-mètre, placé devant la diode et relié à l'ordinateur par un boîtier USB, a permis d'enregistrer la valeur de la puissance moyenne du laser (figure 2.14). La diode se stabilise autour d'une valeur moyenne au bout d'environ 4 heures (de $190 \mu\text{W}$ à $208 \mu\text{W}$), ce qui correspond à une augmentation de puissance d'environ 8 %. Ses fluctuations de puissance sont d'environ $6 \mu\text{W}$, soit 3 % de sa valeur moyenne.

Cette stabilisation apparaît très longue et est vraisemblablement due à une mauvaise stabilisation thermique du laser.

Stabilité de la carte de comptage Nous avons choisi de l'étudier à travers l'étude de la stabilité temporelle de la réponse de l'instrument. Nous avons effectué des acquisitions au cours du temps, pendant deux heures, à raison d'une acquisition toutes les 5 minutes. Nous avons pris le soin de mettre en route le laser au moins quatre heures auparavant, pour que sa puissance soit stabilisée. En ce qui concerne le temps de chauffe du PM, la haute tension est restée à 70 % de sa valeur maximale pendant quatre heures puis à 85 % (réglage maximal autorisé par la carte) pendant deux heures.

Le premier critère que nous avons évalué est le temps moyen de la courbe, représenté sur la figure 2.15. Le temps moyen est le premier moment de la courbe, défini par : $\langle t \rangle = \sum_i t_i N_i / \sum_i N_i$, où N_i est le nombre de coups mesurés par canal. Sa valeur

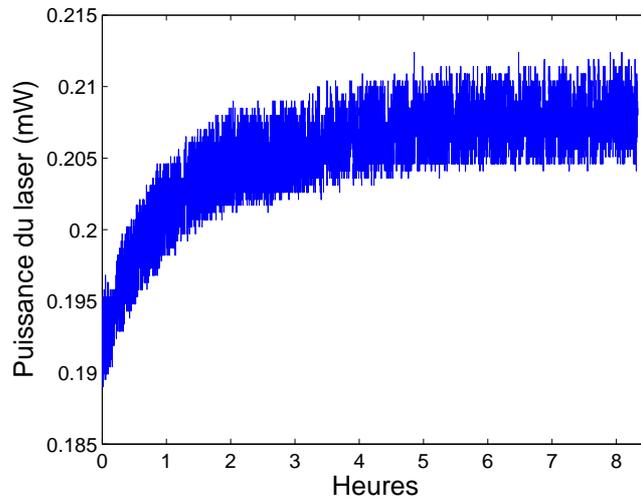


FIG. 2.14: Valeur moyenne de la puissance de la diode laser en fonction du temps.

absolue n'est pas significative, ce sont ses variations qui nous intéressent ici. Le point important est que ce temps moyen est très stable, son écart maximum observé est de 2 ps sur les deux heures (écart de $\pm 0.15\%$ par rapport à sa valeur moyenne). Nous pouvons donc considérer que le système est stable temporellement du point de vue du temps moyen de l'IRF, à 2 ps près sur une heure.

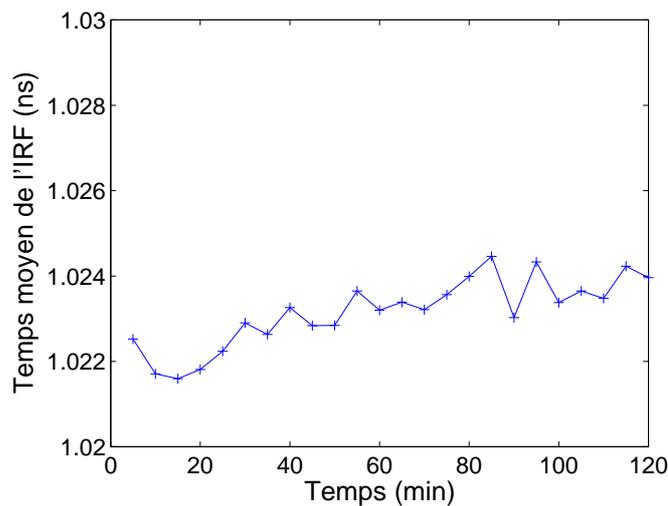


FIG. 2.15: Temps moyen de la réponse de l'instrument, mesuré en fonction du temps sur une période de deux heures.

Nous avons également évalué la variance des courbes (figure 2.16). La variance est définie par $V = \frac{\sum_i (t_i - \langle t \rangle)^2 N_i}{\sum_i N_i}$. Elle présente des variations inférieures à $6 \cdot 10^{-3} \text{ ns}^2$ (écart de $\pm 2\%$ par rapport à sa valeur moyenne).

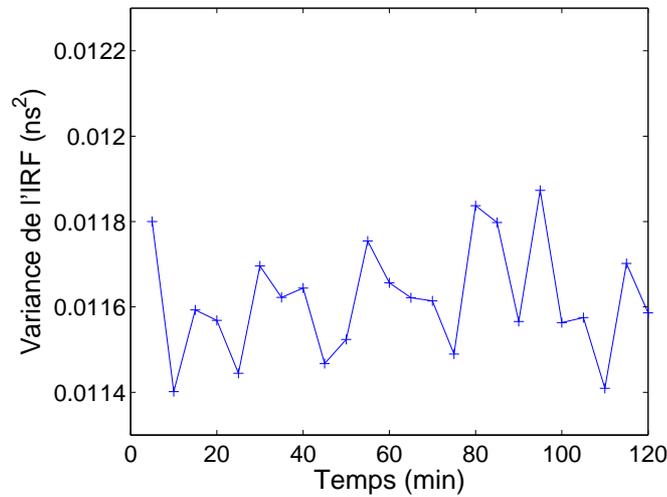


FIG. 2.16: Variance de la réponse de l'instrument, mesurée en fonction du temps sur une période de deux heures.

2.5 Prétraitement des données

Grâce à la description des caractéristiques de mesures de la chaîne, des sources de bruit et à la compréhension du fonctionnement, nous pouvons désormais établir un modèle simplifié qui fait le lien entre la TPSF mesurée et la TPSF « vraie » de l'objet. La TPSF vraie pourra être comparée aux modèles théoriques de diffusion développés.

2.5.1 Mesures en diffusion seule

Nous commençons par les phénomènes de diffusion seule dans le milieu diffusant, sans changement de longueur d'onde (c'est-à-dire sans phénomène de fluorescence).

Modélisation La TPSF mesurée, appelée *mesure*, est, en première approximation, la somme de la $TPSF_{vraie}$ convoluée par la réponse de l'instrument, et d'un terme, qui inclut le signal thermique, le signal d'obscurité et le bruit photonique (figure 2.17).

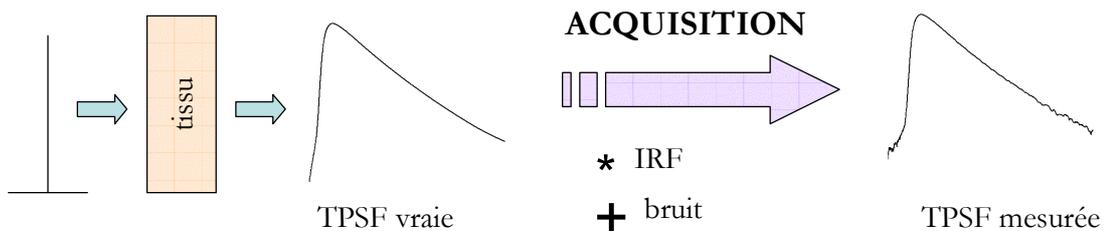


FIG. 2.17: L'acquisition transforme la TPSF vraie et donne la TPSF mesurée en sortie.

Nous pouvons écrire ce modèle de la façon suivante :

$$\begin{aligned}
 \text{mesure} &= \text{signal} + \text{bruit} \\
 &= \text{TPSF}_{\text{vraie}} * \text{IRF} + \varepsilon(b_{ph}) + \text{signal}_{\text{obsc}} + \text{signal}_{\text{th}} \\
 &= \text{TPSF}_{\text{vraie}} * \text{IRF} + \varepsilon(b_{ph}) + \langle \text{signal}_{\text{obsc}} \rangle + \varepsilon(\text{signal}_{\text{obsc}}) + \langle \text{signal}_{\text{th}} \rangle + \varepsilon(\text{signal}_{\text{th}})
 \end{aligned}
 \tag{Eq. 2-1}$$

où nous rappelons que :

- l'IRF a été elle-même décrite à la section 2.3.1 comme la convolution de la réponse de la source, du détecteur et de la chaîne électronique.
- le terme que nous notons *bruit* de façon schématique, a été décrit en 2.4.2 et comprend le signal d'obscurité noté $\text{signal}_{\text{obsc}}$, le signal thermique $\text{signal}_{\text{th}}$ et le bruit de photons $\varepsilon(b_{ph})$. La notation $\langle \rangle$ représente la valeur moyenne et ε la variable aléatoire.

Ces données sont résumées schématiquement sur la figure 2.18.

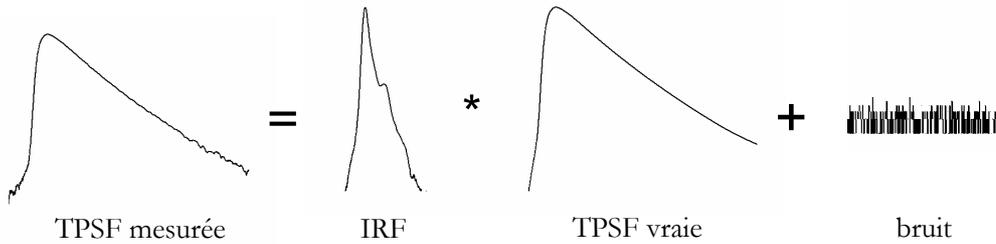


FIG. 2.18: Schéma résumant le lien entre la TPSF mesurée et la TPSF vraie (équation Eq. 2-1).

Traitement Pour soustraire les signaux parasites de valeur moyenne non nulle et obtenir la courbe *signal* qui nous intéresse, nous avons choisi de soustraire à la courbe sa valeur moyenne prise sur une plage en dehors du pic de diffusion (Eq. 2-2). Cette méthode évite d'avoir à effectuer une mesure supplémentaire du niveau moyen. Un filtre médian d'ordre 5 est finalement appliqué au signal.

$$\text{signal} = \text{mesure} - \langle \text{mesure} \rangle \text{ (intervalle en dehors du pic)} \tag{Eq. 2-2}$$

2.5.2 Mesures en fluorescence

Modélisation Lors des mesures sur un milieu contenant une inclusion fluorescente, un signal parasite s'ajoute au signal de fluorescence. Ce signal parasite contient l'autofluorescence du milieu diffusant mais aussi une très faible partie de l'impulsion d'excitation qui a traversé les filtres de fluorescence. Nous pouvons mesurer ce signal en effectuant une mesure, sur le milieu diffusant sans l'inclusion fluorescente (figure 2.19).

Nous pouvons écrire ce modèle de la façon suivante :

$$\begin{aligned} \text{mesure}_{fluo} &= \text{signal}_{fluo} + \text{signal}_{par} + \text{bruit} \\ \text{mesure}_{par} &= \text{signal}_{par} + \text{bruit} \end{aligned} \quad (\text{Eq. 2-3})$$

où

- mesure_{fluo} est la TPSF mesurée avec l'inclusion fluorescente,
- signal_{fluo} le signal de fluorescence qui nous intéresse,
- signal_{par} est le signal parasite,
- mesure_{par} est la mesure effectuée sur le milieu diffusant, dans les mêmes conditions que la mesure de fluorescence mais sans l'inclusion fluorescente.

Traitement On extrait le signal de fluorescence en soustrayant mesure_{par} à la mesure de fluorescence. Cette soustraction permet également de s'affranchir du signal moyen. Comme le système est linéaire vis-à-vis des temps d'intégration, les temps d'intégration des deux mesures (respectivement T_{fluo} et T_{par}) sont pris en compte s'ils sont différents, pour une même puissance de la source d'excitation :

$$\text{signal}_{fluo} = \text{mesure}_{fluo} - \frac{T_{fluo}}{T_{par}} \text{mesure}_{par} \quad (\text{Eq. 2-4})$$

Sur la figure 2.19, nous présentons un exemple de mesure en fluorescence, le signal parasite et leur soustraction qui donne le signal fluorescent résultant.

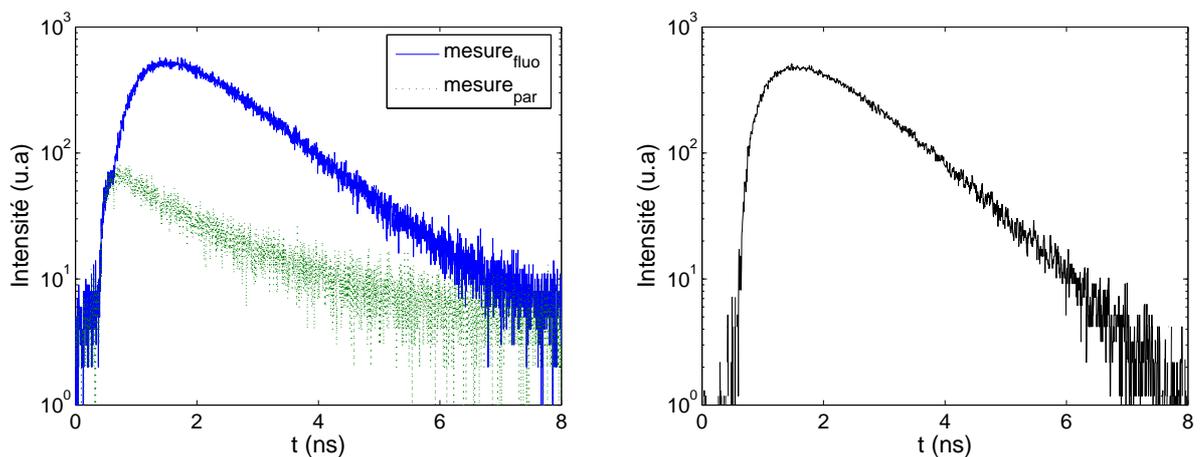


FIG. 2.19: A gauche, mesure sur un milieu possédant une inclusion fluorescente et mesure du signal parasite issu du milieu sans l'inclusion. Le signal parasite vient de l'auto fluorescence du milieu diffusant. A droite, signal résultant de la soustraction des deux signaux.

Bilan du chapitre

Nous avons donc un appareil de mesure pour l'acquisition de courbes temporelles. Plusieurs facteurs ont été pris en compte, tels que le filtrage optique ou le réglage de la carte de comptage. La compréhension du fonctionnement du système nous a permis d'établir un modèle des données et d'effectuer un prétraitement pour pouvoir les exploiter dans les parties suivantes. Nous verrons au chapitre suivant comment nous pouvons coupler mesures et modèles lors de la prochaine étape de détermination des propriétés optiques.

Chapitre 3

Détermination des propriétés optiques en milieu infini et en milieu semi-infini

Après avoir vu le fonctionnement de la chaîne de mesure ainsi que le prétraitement des données, nous cherchons désormais à déterminer les propriétés optiques de milieux diffusants homogènes. Les mesures s'effectuent généralement en surface ou à l'intérieur du milieu. Nous avons besoin d'un modèle direct qui relie les paramètres optiques au signal de mesure dans les différents cas, puis d'une procédure d'inversion pour retrouver les propriétés optiques à partir d'une mesure. Pour commencer, nous rappelons des éléments de théorie nécessaires à l'établissement du modèle direct dans le cadre de l'approximation de la diffusion. Cependant, nous avons identifié un manque dans la littérature concernant des mesures à une profondeur quelconque à l'intérieur du milieu. Pour répondre à nos besoins, nous établissons ensuite une expression analytique du signal mesurable en milieu semi-infini, valable pour une profondeur quelconque des fibres source et détecteur au-dessous de la surface [82]. Nous présentons la procédure d'ajustement des paramètres pour la résolution du problème inverse. Après une description des fantômes optiques utilisés, nous testons la validité du modèle direct. Les mesures présentées sont effectuées en surface et en profondeur sur des fantômes de coefficients d'absorption et de diffusion variables. Des mesures à profondeur variable sont aussi présentées sur deux fantômes. Les résultats de la procédure de détermination des propriétés optiques sont finalement donnés sur différents types de fantômes et pour différentes profondeurs des fibres. Par ailleurs, nous comparons notre méthode avec une autre technique appelée réflectance intégrale.

Sommaire

3.1	Théorie	51
3.1.1	Solutions de l'équation de diffusion en milieu infini	51
3.1.2	Quantité mesurable	52
3.1.3	Solutions de l'équation de diffusion en milieu semi-infini	54
3.2	Expression analytique du signal mesurable en milieu semi-infini	56
3.2.1	Expression analytique	56
3.2.2	Influence de la profondeur des fibres	57
3.2.3	Comparaison entre les conditions aux limites	59
3.3	Procédure de détermination des propriétés optiques	60
3.3.1	Objectifs	60
3.3.2	Minimisation	60
3.4	Réalisation de fantômes optiques	63
3.4.1	Description d'un fantôme optique	63
3.4.2	Propriétés des éléments choisis	64
3.4.3	Réalisation des fantômes	65
3.5	Validation du modèle direct	67
3.5.1	Mesures en surface et en milieu infini	67
3.5.2	Mesures à différentes profondeurs sous la surface	70
3.6	Résultats	72
3.6.1	Résultats de la procédure d'ajustement pour des mesures en surface et en milieu infini	72
3.6.2	Résultats de la procédure d'ajustement pour des mesures à différentes profondeurs sous la surface	74
3.6.3	Discussion	78
3.7	Comparaison avec une autre technique : réflectance intégrale	79
3.7.1	Description de la méthode	79
3.7.2	Résultats	81

3.1 Théorie

Dans cette section, nous présentons la solution de l'équation de diffusion en milieu homogène. Puis nous exprimons le lien entre cette solution et la quantité physique mesurable par la fibre de détection. Enfin, les conditions aux limites pour le passage au milieu semi-infini sont décrites.

3.1.1 Solutions de l'équation de diffusion en milieu infini

Ecrivons ici l'équation de diffusion qui va être utilisée. C'est une adaptation pour un milieu homogène de l'équation (Eq. 1-15), qui décrit la densité de photons $\phi(\mathbf{r}, t)$ (W.m^{-2}). Le coefficient de diffusion D est donc indépendant de \mathbf{r} et l'on peut écrire l'équation de diffusion sous la forme suivante :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial \phi(\mathbf{r}, t)}{\partial t} - D \nabla^2 \phi(\mathbf{r}, t) + \mu_a \phi(\mathbf{r}, t) = S(\mathbf{r}, t) \quad (\text{Eq. 3-1})$$

La solution pour un milieu homogène infini est la plus simple que l'on puisse exprimer. Si l'on suppose le terme de source être une impulsion très brève et ponctuelle, modélisée par une fonction de Dirac : $S(\mathbf{r}, t) = \delta(\mathbf{r} = 0, t = 0)$, et en notant r la distance à la source, la solution pour un milieu infini est de la forme [83] :

$$\phi(\mathbf{r}, t) = \frac{c}{(4\pi Dct)^{3/2}} \exp\left(-\frac{r^2}{4Dct} - \mu_a ct\right) \quad (\text{Eq. 3-2})$$

On peut le vérifier en reportant cette expression dans l'équation et en calculant le Laplacien. Nous donnons également ici la forme fréquentielle de cette solution car nous en aurons besoin au chapitre suivant pour la fluorescence. Cette solution que nous notons Φ est la transformée de Fourier de l'équation (Eq. 3-2) :

$$\Phi(\mathbf{r}, \omega) = \frac{c}{4\pi D} \frac{\exp(i k(\omega) r)}{r} = \frac{c}{4\pi D} G(\mathbf{r}, \omega) \quad (\text{Eq. 3-3})$$

où nous introduisons de plus la fonction $G(\mathbf{r}, \omega) = \frac{\exp(i k r)}{r}$ appelée fonction de Green [84] du système, et où le facteur k est défini par :

$$k(\omega)^2 = -\frac{\mu_a}{D} - \frac{i \omega}{c D} \quad (\text{Eq. 3-4})$$

Ces considérations doivent cependant être confrontées aux contraintes expérimentales. En effet, dans nos expériences, la lumière est apportée par une fibre optique qui possède une ouverture numérique et dont l'émission est directionnelle. Or, il est couramment admis que les photons perdent la mémoire de leur direction initiale au bout d'une distance $l^* = 1/\mu'_s$ [32]. Il est donc classique de considérer qu'il existe une source ponctuelle isotrope située à une distance l^* du bout de la fibre. Nous noterons qu'il peut exister d'autres hypothèses pour la distribution de la lumière près de la source physique, comme des distributions exponentielles par exemple [85]. La position de la source isotrope par rapport aux fibres est schématisée sur la figure 3.1. Nous utiliserons dans la suite un système de coordonnées cylindriques. La coordonnée radiale r représente la distance entre les fibres.

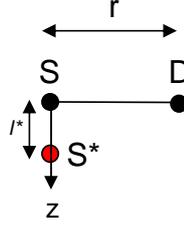


FIG. 3.1: Illustration de la position de la source virtuelle isotrope S^* , par rapport à la source S et au détecteur D .

3.1.2 Quantité mesurable

En pratique, nous devons considérer la quantité qui est mesurée par la fibre optique, notre détecteur placé au point \mathbf{r} . Nous noterons cette quantité *signal*. Nous allons reprendre ici des éléments de discussion données par Haskell *et al* [86]. Il est important de suivre la démarche pour comprendre l'origine des différents termes qui vont intervenir dans le signal.

Le signal ou quantité photométrique mesurée par une fibre optique placée en \mathbf{r} est la luminance L (en $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sr}^{-1}$) à la position \mathbf{r} , dans la direction \hat{s} , intégrée sur la surface A_F de la fibre et sur son ouverture numérique notée Ω_F :

$$\text{signal}(\mathbf{r}, t) = \int_{A_F} dx dy \int_{\Omega_F} L(\mathbf{r}, \hat{s}, t) \hat{s} \cdot \hat{n} d^2 \hat{s} \quad (\text{Eq. 3-5})$$

Les notations sont précisées sur la figure suivante :

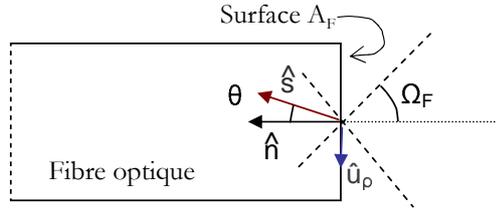


FIG. 3.2: Notations utilisées pour décrire le signal détecté par une fibre optique.

Comme l'équation de la diffusion ne nous donne pas d'information directe sur la luminance, il faut revenir aux approximations faites pour obtenir l'équation de diffusion (section 1.4.2.1). La luminance L est développée en série d'harmoniques sphériques. Si l'on prend les deux premiers termes du développement, la luminance peut être exprimée comme la somme d'un terme isotrope contenant la densité de photons et un terme directionnel avec le flux :

$$L(\mathbf{r}, \hat{s}, t) = \frac{1}{4\pi} \phi(\mathbf{r}, t) + \frac{3}{4\pi} \mathbf{j}(\mathbf{r}, t) \cdot \hat{s} \quad (\text{Eq. 3-6})$$

où nous rappelons également l'expression du flux \mathbf{j} , sous la forme d'une loi de Fick, donnée au chapitre 1 :

$$\mathbf{j}(\mathbf{r}, t) = -D \nabla \phi(\mathbf{r}, t) \quad (\text{Eq. 3-7})$$

Ceci permet de reporter l'expression de la luminance dans l'équation (Eq. 3-5) pour obtenir le signal que nous cherchons :

$$signal(\mathbf{r}, \hat{s}, t) = \int_{A_F} dx dy \int_{\Omega_F} \left[\frac{1}{4\pi} \phi(\mathbf{r}, t) - \frac{3D}{4\pi} \nabla \phi(\mathbf{r}, t) \cdot \hat{s} \right] \hat{s} \cdot \hat{n} d^2 \hat{s} \quad (\text{Eq. 3-8})$$

Nous pouvons montrer que seule la composante du gradient de ϕ selon z doit être considérée car sa composante selon \vec{u}_ρ est nulle :

$$\begin{aligned} \int_{\Omega_F} [\nabla \phi(\mathbf{r}, t) \cdot \hat{s}] \hat{s} \cdot \hat{n} d^2 \hat{s} &= \nabla \phi(\mathbf{r}, t) \cdot \int_{\Omega_F} \hat{s} \hat{s} \cdot \hat{n} d^2 \hat{s} \\ &= \nabla \phi(\mathbf{r}, t) \cdot \int_{\Omega_F} \hat{s} \cos(\theta) d^2 \hat{s} \\ &= \nabla \phi(\mathbf{r}, t) \cdot \hat{z} \int_{\Omega_F} \cos(\theta) d^2 \hat{s} \\ &= \frac{\partial \phi}{\partial z} \int_{\Omega_F} \cos(\theta) d^2 \hat{s} \end{aligned} \quad (\text{Eq. 3-9})$$

avec θ l'angle d'incidence. Nous pouvons donc reprendre l'équation du signal :

$$signal(\mathbf{r}, \hat{s}, t) = \int_{A_F} dx dy \int_{\Omega_F} \left[\frac{1}{4\pi} \phi(\mathbf{r}, t) + \frac{3D}{4\pi} \frac{\partial \phi}{\partial z} \cos(\theta) \right] \cos(\theta) d^2 \hat{s} \quad (\text{Eq. 3-10})$$

La combinaison linéaire du terme dépendant de la densité de photons et de celui dépendant du flux est donc fonction de l'ouverture numérique de la fibre. L'ouverture numérique de nos fibres est d'environ 0.2. Nous pouvons donc faire l'approximation que $\cos(\theta)$ est égal à 1. Effectuons de plus l'approximation que la densité de photon est la même sur la surface de la fibre, de façon à s'affranchir de l'intégrale sur la surface de la fibre. Grâce à ces approximations, le terme entre crochets ne dépend plus de l'angle θ ni de (x, y) et nous pouvons le sortir de l'intégrale. Le signal devient alors proportionnel à l'expression suivante :

$$signal(\mathbf{r}, t) \propto \underbrace{\frac{1}{4\pi} \phi(\mathbf{r}, t)}_{\text{terme de densité de photon}} + \underbrace{\frac{3D}{4\pi} \frac{\partial \phi}{\partial z}(\mathbf{r}, t)}_{\text{terme de flux}} \quad (\text{Eq. 3-11})$$

Il contient deux termes, un terme de densité de photons et un terme de flux.

Nous précisons que nous avons effectué le raisonnement pour un milieu sans changement d'indice. Pour des mesures en surface, où l'indice passe de n à l'indice de l'air 1, la conclusion ne change pas. Il faut multiplier la luminance par le coefficient de transmission de Fresnel $T_{Fres}(\hat{s})$ dans l'équation (Eq. 3-5). En faisant les mêmes hypothèses, ce terme rentre alors dans le coefficient de proportionnalité dû aux intégrales.

En milieu infini, le terme de flux est généralement négligeable (nous le vérifierons à la section 3.2.2). Le signal est noté $signal_\infty$ et est proportionnel à la densité de photons (Eq. 3-2) :

$$signal_\infty(\mathbf{r}, t) \propto \frac{1}{(4\pi Dct)^{3/2}} \exp\left(-\frac{r^2}{4Dct} - \mu_a ct\right) \quad (\text{Eq. 3-12})$$

3.1.3 Solutions de l'équation de diffusion en milieu semi-infini

Pour passer au milieu semi-infini en restant dans le cadre de l'approximation de la diffusion, il faut introduire des conditions aux limites appropriées. Il existe différentes conditions aux limites dont nous citons les trois plus communes. Des détails et des discussions pourront être trouvés dans les revues [86] et [87].

3.1.3.1 Condition aux limites de courant partiel

Cette condition est notée *pcb* (*partial current boundary condition* en anglais). Nous ne détaillerons pas la solution pour ces conditions, car c'est davantage l'expression de ces conditions qui fait apparaître un point d'intérêt. Ces conditions reposent sur la considération des flux de photons. De façon simplifiée, elles expriment que le flux de photons de l'air vers le tissu est nul. Cela traduit le fait que la lumière diffusée qui sort du milieu n'y retourne pas. Le flux rentrant à la surface J_{+z} est donné par :

$$J_{+z} = \frac{\phi(r, z=0, t)}{4} - \frac{AD}{2} \frac{\partial \phi(r, z, t)}{\partial z} \Big|_{z=0} = 0 \quad (\text{Eq. 3-13})$$

avec $A = \frac{1-R_{eff}}{1+R_{eff}}$ où R_{eff} est le coefficient de réflexion qui est dû à la différence d'indice entre l'air et le milieu [86]. Le point important est que ces conditions aux limites font apparaître que pour $z=0$, le flux et la densité de photons sont proportionnels. La dénomination Dirichlet-Neumann peut aussi être utilisée pour nommer cette condition.

La solution [88] utilisée en *pcb* a la forme suivante, que nous donnons à titre d'information :

$$\begin{aligned} \phi(r, z, t) = & \frac{c}{(4\pi Dct)^{3/2}} \exp\left(-\frac{r^2}{4Dct} - \mu_a ct\right) \\ & \left\{ \exp\left(-\frac{(z-l^*)^2}{4Dct}\right) + \exp\left(-\frac{(z+l^*)^2}{4Dct}\right) \right. \\ & \left. - \frac{1}{AD} \int_0^\infty dl \exp\left(-\frac{l^*}{2AD}\right) \exp\left(-\frac{(z+l^*+2AD)^2}{4Dct}\right) \right\} \quad (\text{Eq. 3-14}) \end{aligned}$$

3.1.3.2 Condition de zéro aux limites

Nous appelons cette condition *zbc* pour *zero boundary conditions* en anglais. La densité de photons est fixée à zéro sur la surface du milieu. Cela n'a pas vraiment de signification physique mais cette condition est simple à exprimer mathématiquement. Cette condition peut être satisfaite grâce à la méthode des sources images [32]. Rappelons que la source positive est située à une distance $l^* = 1/\mu'_s$ de la surface du milieu. L'ajout d'une source virtuelle négative placée en $z = -l^*$ permet donc d'assurer la condition $\phi(z=0) = 0$. Si l'on considère les deux sources, deux contributions de la forme de l'équation (Eq. 3-2) sont sommées, avec un signe négatif pour la contribution de la source négative. L'expression de la densité de photons est donc :

$$\phi(\mathbf{r}, t) = \frac{c}{(4\pi Dct)^{3/2}} \exp(-\mu_a ct) \left[\exp\left(-\frac{(z-l^*)^2 + r^2}{4Dct}\right) - \exp\left(-\frac{(z+l^*)^2 + r^2}{4Dct}\right) \right] \quad (\text{Eq. 3-15})$$

3.1.3.3 Condition aux limites extrapolées

Nous notons cette condition *ebc* pour *extrapolated boundary conditions* en anglais. La densité de photons est fixée à zéro sur une surface extrapolée à une distance z_B de la surface du milieu. Cette hypothèse n'a pas forcément plus de signification physique que la précédente, elle permet d'obtenir simplement une solution qui est proche de la réalité.

Cette distance z_B trouve son origine dans la résolution exacte du problème de Milne [26]. Moulton [89] a proposé une expression approchée pour z_B , qui reprend la quantité R_{eff} (dépendant de l'indice du milieu) vue dans la condition *pcb* :

$$z_B = \frac{1 - R_{eff}}{1 + R_{eff}} 2D \quad (\text{Eq. 3-16})$$

On peut la comprendre en prenant l'équation (Eq. 3-13) comme hypothèse, et en extrapolant la densité de photons dans l'air, avec la même pente qu'elle possède en $z = 0$, c'est-à-dire $\partial\phi/\partial z|_{z=0}$ (figure 3.3). Ainsi, on retrouve bien :

$$z_B = \frac{\phi(z=0)}{\partial\phi/\partial z|_{z=0}} = 2AD \quad (\text{Eq. 3-17})$$

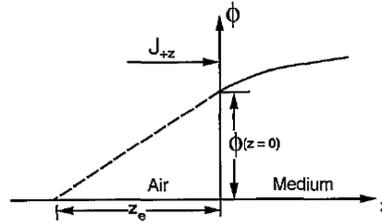


FIG. 3.3: Illustration des conditions aux limites extrapolées.

Pour satisfaire la condition *ebc*, on utilise à nouveau la méthode des images en plaçant une source virtuelle négative symétrique de la source positive par rapport à la surface extrapolée (figure 3.4). La densité de photons est donc la somme des contributions de ces deux sources :

$$\phi(r, z, t) = \frac{c}{(4\pi Dct)^{3/2}} \exp(-\mu_a ct) \left[\exp\left(-\frac{(z - z_0)^2 + r^2}{4Dct}\right) - \exp\left(-\frac{(z + 2z_B + z_0)^2 + r^2}{4Dct}\right) \right] \quad (\text{Eq. 3-18})$$

Dans la suite de ce travail, nous utiliserons de préférence le modèle *ebc*, plus général que le modèle *zbc*. Le coefficient z_B sera déterminé par un programme de calcul utilisant les formules de la référence [86].

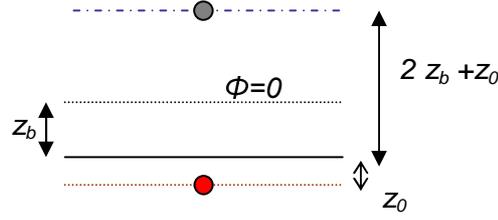


FIG. 3.4: *Extrapolation de la densité de photons à la surface du milieu.*

3.2 Expression analytique du signal mesurable en milieu semi-infini

3.2.1 Expression analytique

Nous proposons ici une expression analytique du signal mesurable pour une profondeur quelconque des fibres à l'intérieur du milieu. Nous avons choisi les conditions *ebc* pour exprimer ce signal. Nous considérons que les deux fibres se situent dans un même plan (x, y) , séparées d'une distance r , et placées à une profondeur z_F . z_0 désigne la profondeur de la source isotrope. La figure 3.5 illustre la géométrie considérée.

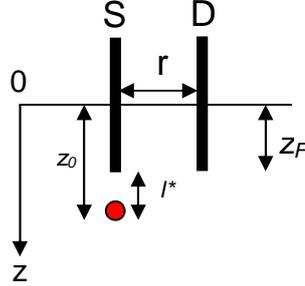


FIG. 3.5: *Configuration des fibres sous la surface. z_F est leur profondeur, la source isotrope se situe à une profondeur $z_0 = z_F + l^*$*

A partir de l'expression de la densité de photons donnée par l'équation (Eq. 3-18), nous calculons le signal grâce à l'équation (Eq. 3-11). Nous obtenons l'expression du signal, noté $signal_{ebc}$, mesuré sur la fibre de détection à la profondeur z_F :

$$\begin{aligned}
 signal_{ebc}(r, z_F, t) \propto & \frac{c}{(4\pi Dct)^{3/2}} \exp(-\mu_a ct) \left[\exp\left(-\frac{(z_F - z_0)^2 + r^2}{4Dct}\right) \right. \\
 & \left. - \exp\left(-\frac{(z_F + 2z_B + z_0)^2 + r^2}{4Dct}\right) \right] \\
 & + 3 \times \frac{1}{2(4\pi Dc)^{3/2} t^{5/2}} \exp(-\mu_a ct) \left[-(z_F - z_0) \exp\left(-\frac{(z_F - z_0)^2 + r^2}{4Dct}\right) \right. \\
 & \left. + (z_F + 2z_B + z_0) \exp\left(-\frac{(z_F + 2z_B + z_0)^2 + r^2}{4Dct}\right) \right] \quad (\text{Eq. 3-19})
 \end{aligned}$$

Le premier terme correspond à la densité de photons et le second au terme de flux. Pour obtenir le signal en condition zbc , il suffit de prendre $z_B=0$. Ce signal, noté $signal_{zbc}$ est donné par l'équation :

$$\begin{aligned} signal_{zbc}(r, z_F, t) \propto & \frac{c}{(4\pi Dct)^{3/2}} \exp(-\mu_a ct) \left[\exp\left(-\frac{(z_F - z_0)^2 + r^2}{4Dct}\right) - \exp\left(-\frac{(z_F + z_0)^2 + r^2}{4Dct}\right) \right] \\ & + 3 \times \frac{1}{2(4\pi Dc)^{3/2} t^{5/2}} \exp(-\mu_a ct) \left[-(z_F - z_0) \exp\left(-\frac{(z_F - z_0)^2 + r^2}{4Dct}\right) \right. \\ & \left. + (z_F + z_0) \exp\left(-\frac{(z_F + z_0)^2 + r^2}{4Dct}\right) \right] \end{aligned} \quad (\text{Eq. 3-20})$$

Nous notons que le terme de flux s'annule bien si $z=0$. Classiquement dans la littérature, on trouve l'expression suivante du signal, donnée pour des mesures en surface :

$$\begin{aligned} signal(r, z = 0, t) \propto & \frac{1}{2(4\pi Dc)^{3/2} t^{5/2}} \exp(-\mu_a ct) \left[z_0 \exp\left(-\frac{(z - z_0)^2 + r^2}{4Dct}\right) \right. \\ & \left. + (2z_B + z_0) \exp\left(-\frac{(2z_B + z_0)^2 + r^2}{4Dct}\right) \right] \end{aligned} \quad (\text{Eq. 3-21})$$

On remarque que c'est un cas particulier de l'équation (Eq. 3-19), pour laquelle seul le terme de flux (second terme dans (Eq. 3-11)) est pris en compte et où $z_F = 0$ pour des mesures en surface. En surface, le signal est généralement appelé « flux ». Cette expression sera justifiée dans le second paragraphe.

3.2.2 Influence de la profondeur des fibres

Équivalence avec les solutions classiques Vérifions tout d'abord que l'équation proposée pour le signal à n'importe quelle profondeur z_F est bien reliée aux solutions classiques en surface (Eq. 3-21) et en milieu infini (Eq. 3-12).

En ce qui concerne les mesures en surface pour $z_F = 0$, si l'on trace les deux termes du signal, nous constatons que les termes de densité de photons et de flux sont du même ordre de grandeur, l'un ne peut pas être négligé par rapport à l'autre. Cependant, les deux termes sont proportionnels, c'est-à-dire qu'ils ont la même forme, ce qui explique que chacun des deux termes, ou alors leur somme, peut être utilisé séparément. Les propriétés optiques extraites seront pratiquement les mêmes. Nous pouvons retrouver cette propriété de proportionnalité dans les conditions aux limites pcb . En effet, nous avons vu dans l'équation (Eq. 3-13) que le flux et la densité de photons étaient proportionnels, à la surface.

Le second point à vérifier est que la solution en milieu infini (Eq. 3-12) est bien la limite de l'équation (Eq. 3-19) lorsque z_F tend vers l'infini. En effet, le terme de densité de photons est bien dominant par rapport au terme de flux lorsque z_F tend vers l'infini, comme on peut le voir sur la figure 3.6, pour une valeur de $z_F = 4$ cm pour un milieu diffusant typique. Nous vérifions ensuite que ce terme tend bien vers l'équation (Eq. 3-12) pour de grandes valeurs de z_F .

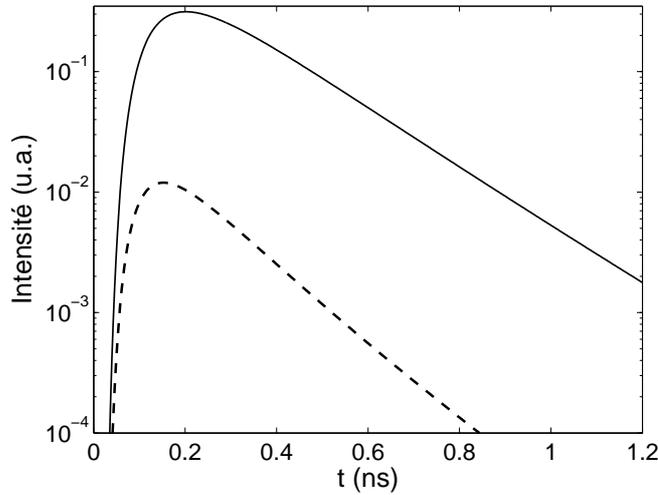


FIG. 3.6: Comparaison du terme de densité de photons (ligne pleine) et du terme de flux (pointillés) pour $z_F = 4$ cm, avec $\mu_a = 0.2$ cm $^{-1}$, $\mu'_s = 10$ cm $^{-1}$ et $r = 1.2$ cm.

Variations de la profondeur des fibres Sur la figure 3.7, nous avons représenté le signal calculé à différentes profondeurs des fibres z_F , pour un milieu diffusant typique. La première observation est que l'amplitude du signal augmente lorsque les fibres sont plongées dans le milieu. Cela s'explique par la diminution des pertes de photons à travers l'interface quand z_F augmente. Davantage de photons peuvent être collectés sur la fibre de détection. Ils peuvent explorer des chemins supplémentaires au-dessus du plan des fibres avant d'être détectés. Cela provoque un décalage continu des maxima des courbes vers les temps longs. Cependant, les courbes sont superposées à partir d'une profondeur seuil. Ce comportement asymptotique est atteint lorsque l'influence de l'interface devient négligeable et que le régime de milieu infini est atteint.

La représentation des courbes normées à la même aire en échelle semi-logarithmique (figure 3.7 (b)) souligne la linéarité en temps aux temps longs et le fait que la pente apparente semble diminuer lorsque la profondeur des fibres augmente. La pente est due, au premier ordre, au terme en $\exp(-\mu_a c t)$. Nous pouvons affiner l'explication grâce à des éléments introduits par Patterson *et al* [32] et adaptés aux conditions aux limites extrapolées près de la surface. La pente est la dérivée du logarithme népérien du signal. Si l'on ne prend pas en compte le terme de flux dans l'équation (Eq. 3-19), les pentes des signaux avec les conditions de milieu infini et en *ebc* peuvent être exprimées de la façon suivante :

$$\frac{\partial}{\partial t} \ln(\text{signal}_\infty) = -\mu_a^\infty c - \frac{3}{2t} + o\left(\frac{1}{t^2}\right) \quad (\text{Eq. 3-22})$$

$$\frac{\partial}{\partial t} \ln(\text{signal}_{ebc}) = -\mu_a^{ebc} c - \frac{5}{2t} + o\left(\frac{1}{t^2}\right) \quad (\text{Eq. 3-23})$$

Pour le modèle infini, le coefficient 3/2, plus petit que le coefficient 5/2 du modèle *ebc*, explique que la pente est plus faible lorsqu'on est loin des interfaces.

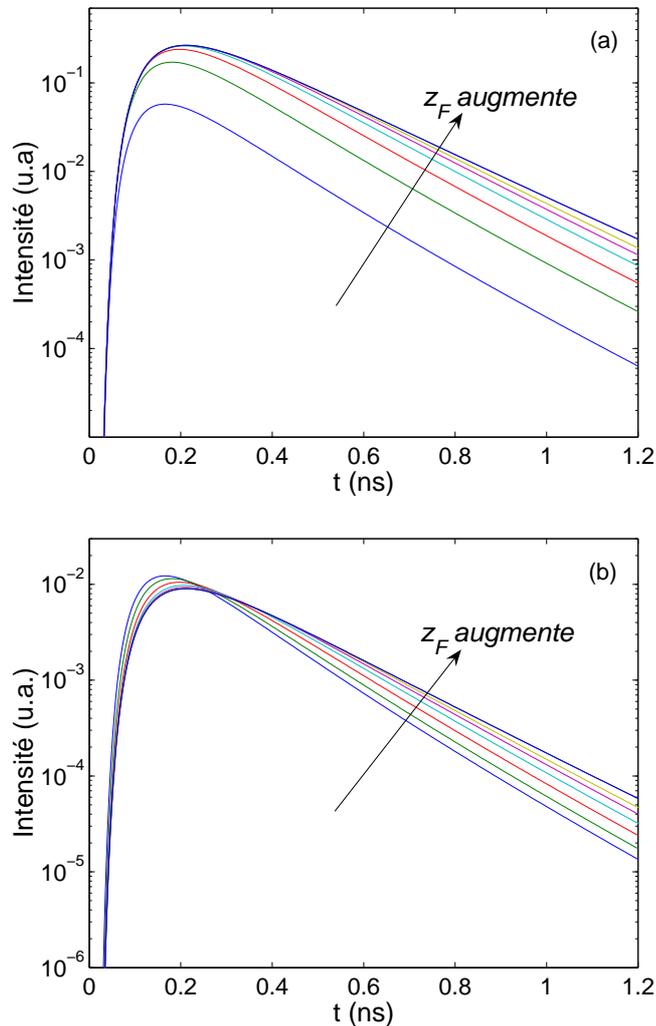


FIG. 3.7: (a) Influence de l'augmentation de la profondeur des fibres sur le signal en milieu semi-infini. Les courbes ont été tracées pour $z_F = 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2$ et 3 cm, avec $\mu_a = 0.2 \text{ cm}^{-1}$, $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$ et $r = 1.2$ cm. (b) Mêmes courbes normalisées à la même aire.

3.2.3 Comparaison entre les conditions aux limites

Deux points importants ressortent des études de la littérature. Le premier qui apparaît assez logique est l'importance d'appliquer des conditions aux limites adaptées pour traiter le problème du milieu semi-infini. Dans le tableau 3-I, nous présentons les résultats de la procédure d'ajustement en considérant des données simulées et différents modèles pour le calcul. Par exemple, pour des données simulées en *ebc* et un modèle infini pour le calcul (2^e ligne), le coefficient d'absorption μ_a est surestimé de 56 %. La perte des photons à travers la surface est en effet compensée par un coefficient d'absorption plus élevé que sa valeur vraie. Le second point est que les trois conditions aux limites présentées en milieu semi-infini diffèrent peu entre elles pour les valeurs de coefficients utilisées. Haskell *et al* [86] et Hielscher *et al* [87] ont montré que les condi-

tions *ebc* et *pcb* sont pratiquement indiscernables et que les conditions *zbc* diffèrent très légèrement. Nous montrons également dans le tableau les résultats d'un ajustement avec les conditions *zbc* sur des données simulées en *ebc* (et aussi l'inverse). Les résultats sur les coefficients d'absorption et de diffusion réduit sont analogues aux données d'entrée des simulations.

Fonction utilisée pour la simulation	Fonction utilisée pour calculer	μ_a (cm ⁻¹)	μ'_s (cm ⁻¹)
<i>ebc</i>	<i>ebc</i>	0.050	10
<i>ebc</i>	infini	0.077	7.55
<i>ebc</i>	<i>zbc</i>	0.050	10.27
<i>zbc</i>	<i>ebc</i>	0.050	9.72

TAB. 3-I: Résultats de la procédure d'ajustement des paramètres sur des données simulées en surface, soit pour le modèle *ebc* (Eq. 3-19), soit pour le modèle *zbc* (même équation avec $z_B = 0$), pour un coefficient d'absorption de 0.05 cm^{-1} , un coefficient de diffusion réduit de 10 cm^{-1} , un indice du milieu de 1.33, et un écartement des fibres de 2 cm.

3.3 Procédure de détermination des propriétés optiques

3.3.1 Objectifs

Nous avons déjà vu, à la section 2.5 qui décrit le prétraitement des données, le lien entre la TPSF mesurée et la TPSF vraie du milieu. La TPSF mesurée est la convolution de l'IRF et de la TPSF vraie à laquelle s'ajoute le bruit. Or la TPSF vraie contient les informations sur les propriétés optiques du milieu. L'objectif de la procédure d'ajustement des paramètres est de donner quatre paramètres : le coefficient d'absorption, le coefficient de diffusion réduit, un paramètre d'amplitude A qui est dépendant du système et le temps t_0 du début de la mesure. Les paramètres recherchés seront ceux pour lesquels le modèle choisi sera en accord avec la TPSF vraie du système.

Une fois le prétraitement effectué, il faut choisir le modèle qui décrit le signal expérimental. Nous nous limitons pour l'instant au modèle *ebc* pour les mesures en surface et au modèle infini pour les mesures en profondeur. La distance entre les fibres et l'indice du milieu est une donnée d'entrée.

3.3.2 Minimisation

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, la TPSF « vraie » du système est convoluée avec la réponse de l'instrument. Le modèle théorique est donc convolué avec la réponse de l'instrument pour être comparé au signal. Nous notons $modele^* = modele *$

IRF. Les paramètres sont définis comme les résultats de la minimisation de l'argument d'une fonction d'erreur χ^2 :

$$(\mu_a, \mu'_s, t_0, A) = \arg(\min(\chi^2)) \quad (\text{Eq. 3-24})$$

La fonction d'erreur est définie de la façon suivante, avec N le nombre de points de la fonction :

$$\chi^2(\mu_a, \mu'_s, t_0, A) = \sum_{i=1}^N \left(\frac{\text{signal}_i - \text{modele}_i^*}{\sqrt{\text{signal}_i}} \right)^2 \quad (\text{Eq. 3-25})$$

Nombre de paramètres L'ajustement peut se faire sur les quatre paramètres précédemment cités. La mesure de l'IRF se fait avec les mêmes conditions expérimentales que la mesure du signal. Nous avons expliqué au chapitre 2 que les fibres étaient placées face à face, écartées de 1.1 cm pour la mesure de l'IRF et que nous corrigeons ce décalage en avançant l'IRF du temps correspondant. De cette façon, le signal et l'IRF ont la même base de temps. La courbe *modele** est la convolution du modèle avec l'IRF. La convolution permet de recalculer en temps le modèle avec la mesure. Même si nous ne connaissons pas sa valeur, nous n'avons pas besoin d'effectuer l'ajustement sur la variable t_0 . Cela ramène le nombre de paramètres à trois.

De plus, il est possible de s'affranchir du paramètre d'amplitude comme suggéré dans la référence [90]. Une normalisation est faite par rapport à l'aire des courbes, de façon à faire disparaître le paramètre d'amplitude. Sur l'intervalle de temps sélectionné, on impose à *modele** d'avoir la même aire que le signal en introduisant une nouvelle fonction qui interviendra dans la valeur du χ^2 :

$$n\text{modele}^* = \text{modele}^* \times \frac{\text{aire}(\text{signal})}{\text{aire}(\text{modele}^*)} \quad (\text{Eq. 3-26})$$

L'ajustement peut ainsi se faire sur deux paramètres μ_a et μ'_s ce qui rend la procédure plus stable.

La procédure d'ajustement est résumée sur le schéma 3.8. La première étape est une étape d'initialisation des paramètres. La TPSF modèle est ensuite calculée à partir du modèle choisi et convoluée avec l'IRF expérimentale. Le χ^2 est calculé pour effectuer la comparaison avec le signal mesuré. Un critère d'accord détermine si le minimum est atteint, alors la procédure peut s'arrêter. Si le minimum n'est pas atteint, une procédure de minimisation basée sur un algorithme du simplex [91] change les paramètres pour recalculer une TPSF modèle jusqu'à atteindre le critère d'accord. Le critère d'accord est une différence de 10^{-4} entre les valeurs des paramètres ou du χ^2 entre deux itérations. L'ensemble de la procédure d'ajustement a été réalisé avec le logiciel Matlab.

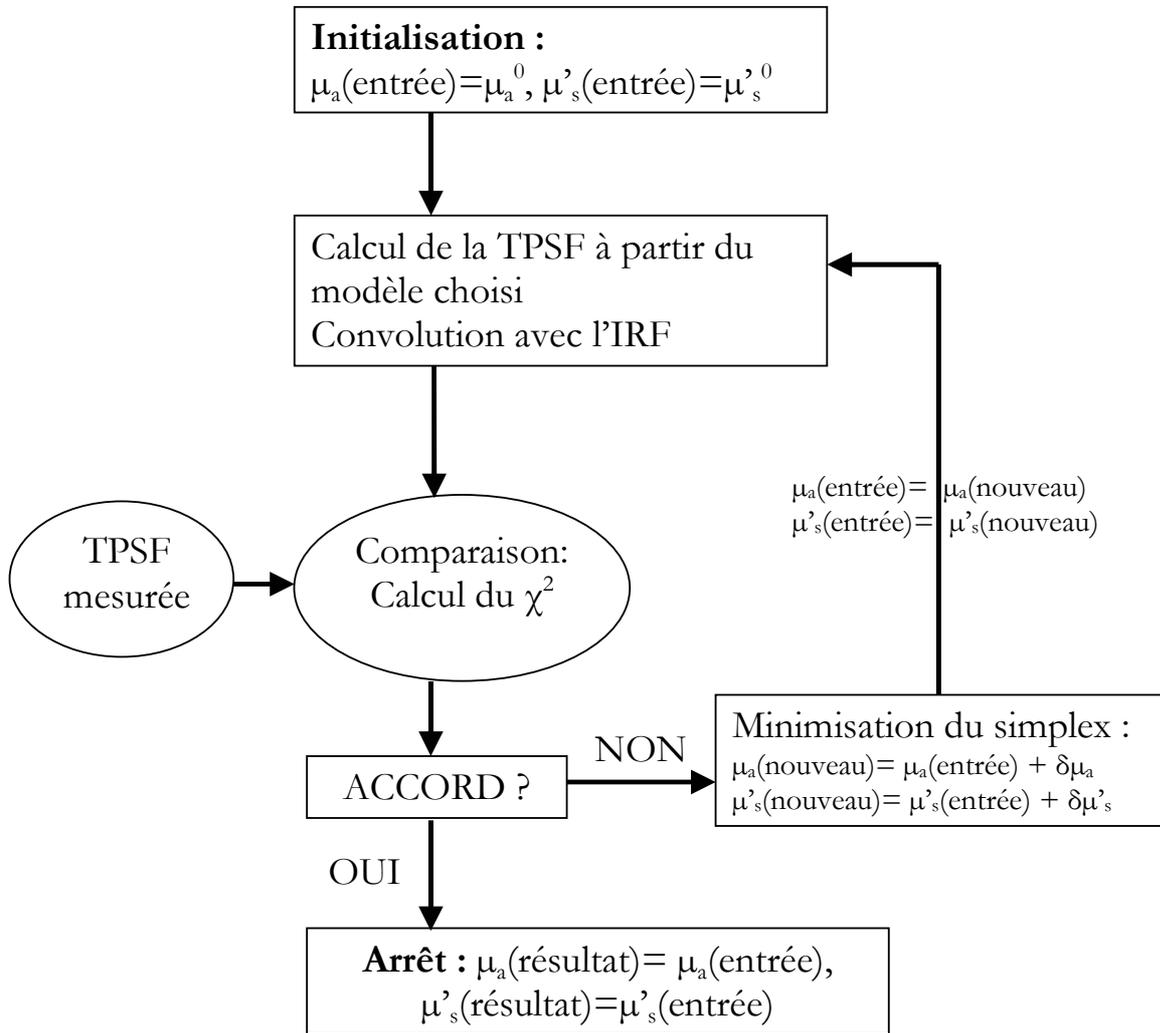


FIG. 3.8: Schéma de la procédure pour résoudre le problème inverse de détermination des propriétés optiques à partir d'une mesure de TPSF.

Choix de l'intervalle de temps L'ajustement des paramètres ne se fait pas sur l'ensemble de la TPSF pour deux raisons principales. L'intervalle choisi est situé entre les bornes t_1 et t_2 où :

- $t_1 = 0.9 t_{max}$ sur la pente montante de la courbe, avec t_{max} le temps correspondant au maximum d'amplitude. De cette façon, on évite les temps courts où l'approximation de la diffusion est moins valable,
- $t_2 = 0.01 t_{max}$ sur la pente descendante de la courbe. Cette borne est choisie pour garder un bon rapport signal sur bruit.

3.4 Réalisation de fantômes optiques

3.4.1 Description d'un fantôme optique

Un fantôme optique est un milieu artificiel qui reproduit le mieux possible les propriétés optiques des tissus. La conception et la caractérisation des fantômes optiques est très importante pour tester les dispositifs d'imagerie optique des milieux diffusants et a fait l'objet de nombreuses publications [92, 93, 94]. Les fantômes optiques vont nous servir d'objets tests pour effectuer des mesures et tester les modèles car leur intérêt est que l'on peut contrôler la géométrie et les paramètres optiques.

Cependant, les fantômes optiques sont loin d'imiter la structure complexe hétérogène des tissus que nous avons abordée au chapitre 1. Un objet test est composé schématiquement de trois éléments différents :

- une matrice qui représente le milieu et qui est pratiquement transparente aux longueurs d'ondes considérées,
- des particules diffusantes,
- des particules absorbantes.

La diffusion de la lumière est provoquée par les particules diffusantes qui constituent des inhomogénéités de taille submillimétrique d'indice de réfraction différent de celui de la matrice. On notera que les particules absorbantes participent elles aussi à la diffusion et que les particules diffusantes possèdent une faible absorption. Les deux propriétés sont très liées. Le fantôme optique reproduit ainsi les propriétés optiques moyennes des tissus, même si sa structure microscopique est différente de celle des tissus.

Il existe différents critères de choix pour les éléments constitutifs d'un fantôme optique. Nous souhaitons un fantôme facilement réalisable, bien reproductible et contrôlable. Nous avons effectué des tests sur des fantômes solides, avec plusieurs essais de résine (epoxi et polyester) pour le milieu transparent, des particules de dioxyde de titane pour les diffuseurs et de l'encre comme absorbant [95]. L'avantage de ces fantômes est leur stabilité dans le temps. Cependant, il est assez délicat de contrôler précisément leurs propriétés optiques lors de la réalisation. Nous avons préféré choisir des fantômes liquides pour deux raisons principales. D'une part, leur réalisation est simple et les propriétés optiques sont contrôlables comme nous allons le décrire dans les paragraphes suivants. D'autre part, nous souhaitons effectuer des mesures en profondeur, ce que seul le liquide permettait.

Parmi les particules diffusantes disponibles, on distingue les diffuseurs de taille calibrée et ceux de taille non calibrée.

Les diffuseurs calibrés peuvent être des sphères en latex par exemple. L'avantage des milieux calibrés est que l'on peut calculer de façon théorique leur coefficient de diffusion grâce à la connaissance des tailles des sphères et à leur indice de réfraction. Leur inconvénient est leur prix très élevé qui ne nous permettait pas d'avoir les volumes que nous désirions. Nous décrirons cependant une série de mesure sur ce type de fantôme à la section 3.7.

Au sein des diffuseurs non calibrés, nous avons testé des solutions à base d'émulsions grasses comme le lait ou l'Intralipide, mais aussi des peintures blanches (à base de particules de dioxyde de titane). Nous avons choisi d'utiliser de l'Intralipide (Frésenius Kabi) car il a déjà été très étudié [96, 97, 98] et il est couramment utilisé dans la littérature. De plus, il se dégrade moins rapidement que le lait à l'air libre et ne présente pas trop de problèmes de sédimentation, contrairement aux particules de dioxyde de titane.

3.4.2 Propriétés des éléments choisis

L'eau constitue la matrice des fantômes liquides. Ses propriétés d'absorption ont été citées au chapitre 1. A 631 nm, son coefficient d'absorption est de l'ordre de 0.003 cm^{-1} .

Particules absorbantes Nous avons choisi de l'encre de Chine noire (marque Dalbe) pour les particules absorbantes. Son spectre d'absorption mesuré avec un spectrophotomètre (Cary, Varian) est donné sur la figure 3.9. L'absorption de l'encre diminue avec la longueur d'onde.

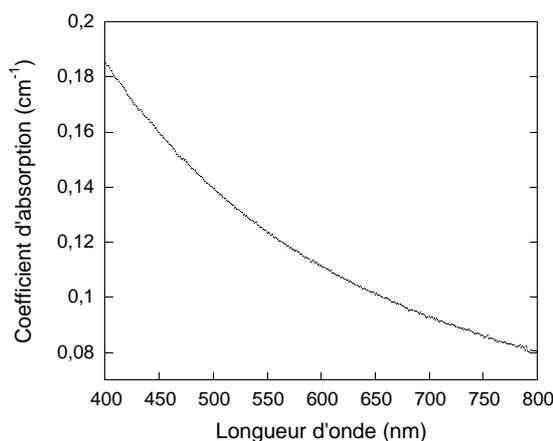


FIG. 3.9: Coefficient d'absorption de l'encre de Chine diluée à 0.0053 % en volume dans de l'eau distillée.

Particules diffusantes L'Intralipide est une émulsion lipidique d'huile de soja utilisée comme solution nutritive par voie intraveineuse en milieu hospitalier. Il se présente sous la forme d'une solution qui a le même aspect que le lait. Un volume de 100 mL d'Intralipid-20 % est composé de 20 g d'huile de soja purifiée, de 1.2 g de lécithine d'oeuf purifiée, de 2.25 g de glycérine et d'eau pour solution injectable. L'huile de soja et la lécithine font partie de la famille des lipides. L'indication de pourcentage désigne le nombre de grammes d'huile de soja dans la solution [99]. La glycérine est dissoute dans l'eau et ne contribue pas à la diffusion. Une partie de la lécithine (environ la moitié) forme des vésicules d'eau à double couche. On suppose qu'elles ne participent pas non plus à la diffusion. L'huile de soja est encapsulée dans des vésicules constituées d'une

monocouche de lécithine. Ceci explique le terme « intralipide », c'est-à-dire à l'intérieur du lipide. Ces vésicules constituent les particules diffusantes. La distribution des tailles de ces particules est très large : de 25 à 600 nm environ (taille moyenne 97 nm) [97].

L'absorption de l'Intralipide est essentiellement due à l'eau (90 %) et à l'huile de soja (10 %). A 631 nm, elle est environ égale à 0.002 cm^{-1} [98, 7]. L'indice de réfraction est approximativement celui de l'eau, $n=1.33$.

Les valeurs du coefficient de diffusion publiées dans la littérature présentent des valeurs assez différentes. Des résultats sont récapitulés dans le tableau 3-II. Cette disparité s'explique par les différentes techniques employées mais aussi par la variabilité des solutions Intralipides.

μ_s (cm^{-1})	g	μ'_s (cm^{-1})	Référence
0.476	0.796	0.097	[97]
0.386	0.71	0.119	[100]
0.550	0.83	0.0935	[101]
0.34	0.825	0.0595	[98]
0.441	0.8	0.0882	[95]

TAB. 3-II: Valeurs du coefficient de diffusion μ_s , du coefficient d'anisotropie g , et du coefficient de diffusion réduit μ'_s , mesurées pour $\lambda=633 \text{ nm}$, par différentes équipes pour une solution d'Intralipide-10 % diluée 1000 fois.

Il est aussi intéressant de connaître la variation de coefficient de diffusion réduit avec la longueur d'onde. Cela nous donnera des éléments de discussion pour les mesures de la section 3.7 et lors des mesures en fluorescence. Nous reportons sur la figure 3.10 les données de la référence [97] où le coefficient de diffusion réduit est modélisé par l'équation :

$$\mu'_s(\lambda) = 0.016 \lambda^{-2.4} (0.58 \lambda - 0.1) \quad (\text{Eq. 3-27})$$

avec μ'_s en mm^{-1} pour $0.4 < \lambda < 1.1$, avec λ en μm , pour une solution d'Intralipide-10 % diluée 1000 fois dans de l'eau distillée. Les auteurs indiquent que la gamme de validité de leur formule est pour une concentration d'Intralipide-10 % jusqu'à 4 % à 1100 nm et 17 % à 400 nm, comme pour les mesures du tableau 3-II qui ont été réalisées sur des solutions diluées. Cependant pour estimer les propriétés d'une solution 10 %, on multiplie généralement la valeur par 1000 sans tenir compte de ces gammes de validité.

3.4.3 Réalisation des fantômes

Nous avons suivi le protocole suivant pour la réalisation des fantômes :

- Choix du volume total V_T du fantôme.
- Choix du pourcentage en volume d'Intralipide en fonction du μ'_s visé.
- Calcul du volume d'Intralipide $V_{IL} = \% \times V_T$.
- Mesure du volume d'eau distillée nécessaire $V_{eau} = V_T - V_{IL}$.

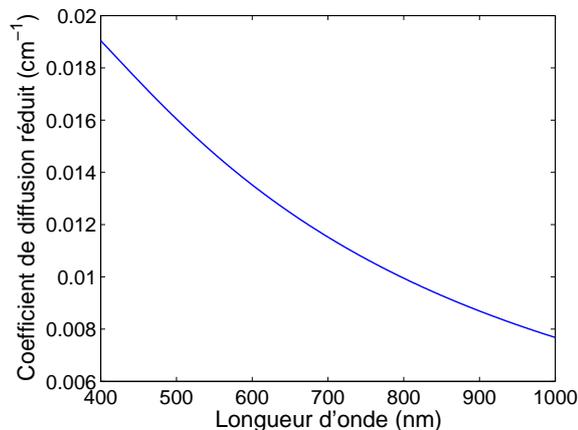


FIG. 3.10: Coefficient de diffusion réduit (en cm^{-1}) en fonction de la longueur d'onde (en nm) selon le modèle proposé par Van Staveren et al [97], pour 1 mL d'Intralipide-10 % dilué dans 999 mL d'eau distillée.

- Ajout d'un volume d'encre V_{encre} dans l'eau. Ce volume est prélevé directement dans le flacon d'encre, il est négligeable par rapport au volume total. L'absorption de la solution (eau, encre) est mesurée au spectromètre d'absorption et est notée μ_a^{ref} .
- Ajout du volume d'Intralipide. Agitation de la solution finale.

Par la mesure systématique de l'absorption, le véritable coefficient d'absorption de la solution (eau, encre) est mesuré et non extrapolé. Cependant cette valeur de référence pour l'absorption du fantôme peut être discutée. Tout d'abord, comme l'encre est elle aussi constituée de particules diffusantes, cette valeur surestime la valeur réelle du coefficient d'absorption de la solution (eau, encre) [102]. Nous ajoutons ensuite le volume d'Intralipide. Cet ajout, que nous avons fait varier de 1.6 % à 8.4 % en volume, fait diminuer le coefficient d'absorption à cause de la dilution d'une part, et du propre coefficient d'absorption de l'Intralipide d'autre part ($\simeq 0.9 \mu_{a,\text{eau}}$). Nous avons considéré ces phénomènes comme négligeables et pris μ_a^{ref} comme valeur de référence pour l'absorption du fantôme.

Concernant le coefficient de diffusion réduit, nous ne disposons pas de valeurs absolues de référence. Seuls des résultats relatifs où nous avons fait varier la concentration en Intralipide pourront être comparés dans un premier temps. Nous exprimerons la concentration d'Intralipide en concentration absolue : la notation 1 % correspond à l'Intralipide-20 % (notre solution mère) dilué à 5 % en volume.

3.5 Validation du modèle direct

3.5.1 Mesures en surface et en milieu infini

Mesures en absorption variable Nous réalisons des fantômes de propriétés optiques variables. Nous choisissons l'un des fantômes réalisés pour comparer la forme du signal mesuré avec celle de la simulation correspondante. Ses caractéristiques sont $\mu_a^{ref}=0.104 \text{ cm}^{-1}$ et une concentration absolue d'Intralipide de 1 % ce qui donne un coefficient de diffusion réduit μ'_s attendu autour de 12 cm^{-1} . Sur la figure 3.11, le signal mesuré en profondeur est superposé à la simulation en milieu infini (Eq. 3-12), avec les coefficients attendus, et convolué par l'IRF. Le bon accord permet de valider le modèle direct en milieu infini pour ce fantôme. Nous précisons ici le mode de représentation choisi qui permet de comparer les formes des courbes (sans connaître le paramètre d'amplitude de la simulation). A chaque fois que nous aurons besoin de comparer une simulation et une mesure expérimentale, nous normons les deux courbes à la même aire sur un intervalle de temps défini de la même façon que pour la procédure d'ajustement des paramètres. Puis nous divisons chacune des courbes par le maximum de la courbe expérimentale pour se ramener sur une échelle d'amplitude un.

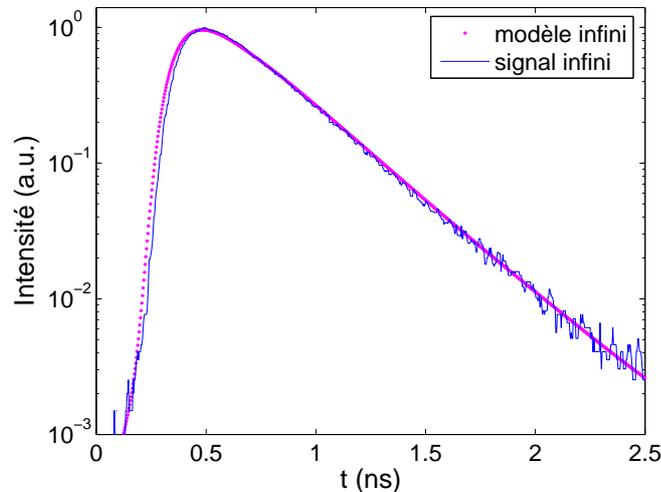


FIG. 3.11: *Superposition du signal mesuré 4 cm sous la surface pour un fantôme de $\mu_a^{ref} = 0.104 \text{ cm}^{-1}$ et de coefficient de diffusion réduit attendu de 12 cm^{-1} , et du modèle infini calculé avec ces mêmes coefficients. La distance entre les fibres est de 1.15 cm. Les courbes sont normées à la même aire puis au maximum du signal mesuré.*

Nous pouvons faire de même avec la mesure en surface, comparée avec la simulation avec le modèle *ebc* (Eq. 3-12, $z_F=0$) (figure 3.12), toujours avec les mêmes coefficients optiques. L'accord est beaucoup moins bon cette fois.

Si nous prenons maintenant un fantôme avec une absorption plus faible, nous retrouvons les mêmes tendances (figure 3.13). Nous constatons à nouveau que les mesures en surface diffèrent du modèle.

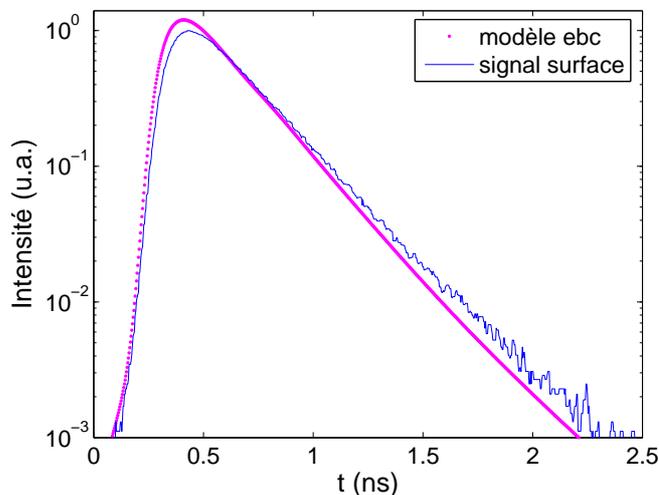


FIG. 3.12: Superposition du signal mesuré à la surface pour un fantôme de $\mu_a^{ref} = 0.104 \text{ cm}^{-1}$ et de coefficient de diffusion réduit attendu de 12 cm^{-1} , et du modèle ebc en surface calculé avec ces mêmes coefficients. La distance entre les fibres est de 1.15 cm . Les courbes sont normées à la même aire puis au maximum du signal mesuré.

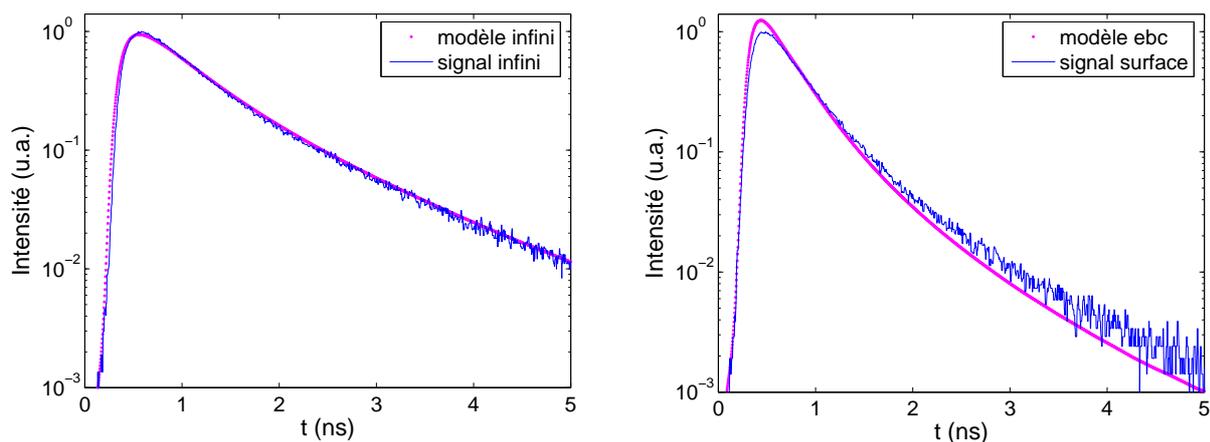


FIG. 3.13: A gauche, superposition du signal en profondeur pour un fantôme de $\mu_a^{ref} = 0.02 \text{ cm}^{-1}$ et de coefficient de diffusion réduit attendu de 12 cm^{-1} , et du modèle ebc calculé avec ces mêmes coefficients. La distance entre les fibres est de 1.15 cm . Les courbes sont normées à la même aire puis au maximum du signal mesuré. A droite, superposition du signal en surface et du modèle ebc en surface.

Mesures en diffusion variable Nous comparons les mesures et les modèles directs sur le fantôme avec la plus faible diffusion (μ'_s attendu de 4 cm^{-1}) et sur celui avec la plus forte diffusion (μ'_s attendu de 20 cm^{-1}). Les courbes sont tracées sur les figures 3.14 et 3.15. Nous retrouvons là aussi un meilleur accord entre le modèle infini et les mesures en profondeur que pour le modèle *ebc* et les mesures en surface. De plus, en milieu infini, l'accord apparaît meilleur pour la mesure sur le fantôme de coefficient de diffusion plus fort.

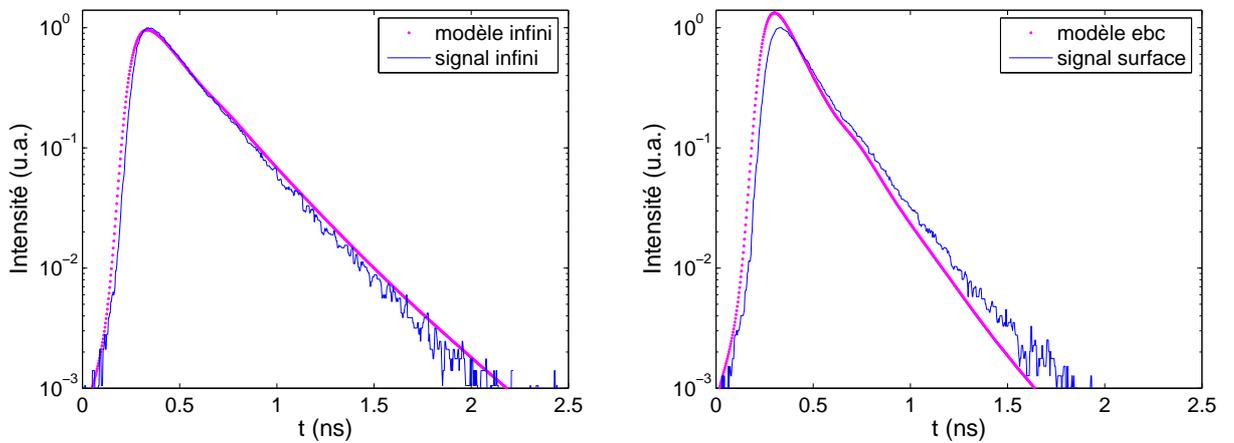


FIG. 3.14: *A gauche, superposition du signal en profondeur pour un fantôme de $\mu_a^{ref}=0.126 \text{ cm}^{-1}$ et de coefficient de diffusion réduit attendu de 4 cm^{-1} , et du modèle ebc calculé avec ces mêmes coefficients. La distance entre les fibres est de 1.15 cm . Les courbes sont normées à la même aire puis au maximum du signal mesuré. A droite, superposition du signal en surface et du modèle ebc en surface.*

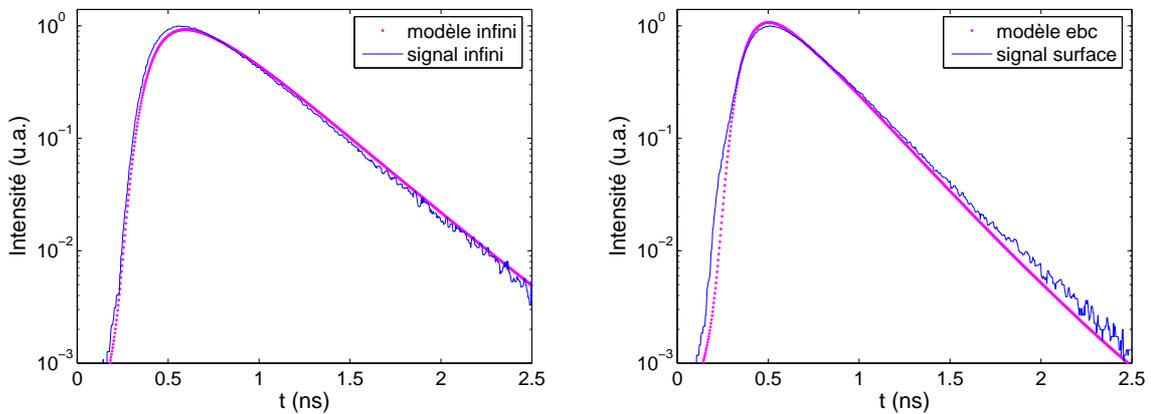


FIG. 3.15: *Superposition du signal à la surface pour un fantôme de $\mu_a^{ref}=0.126 \text{ cm}^{-1}$ et de coefficient de diffusion réduit attendu de 20 cm^{-1} , et du modèle ebc calculé avec ces mêmes coefficients. La distance entre les fibres est de 1.15 cm . Les courbes sont normées à la même aire puis au maximum du signal mesuré.*

3.5.2 Mesures à différentes profondeurs sous la surface

Nous présentons sur la figure 3.16 les courbes mesurées à différentes profondeurs sous la surface pour un fantôme de coefficient d'absorption de référence 0.126 cm^{-1} et de concentration absolue 1 % en Intralipide, ce qui donne un coefficient de diffusion réduit attendu autour de 12 cm^{-1} . Les courbes montrent bien le même comportement général que les simulations que nous avons tracées sur la figure 3.7 (page 59).

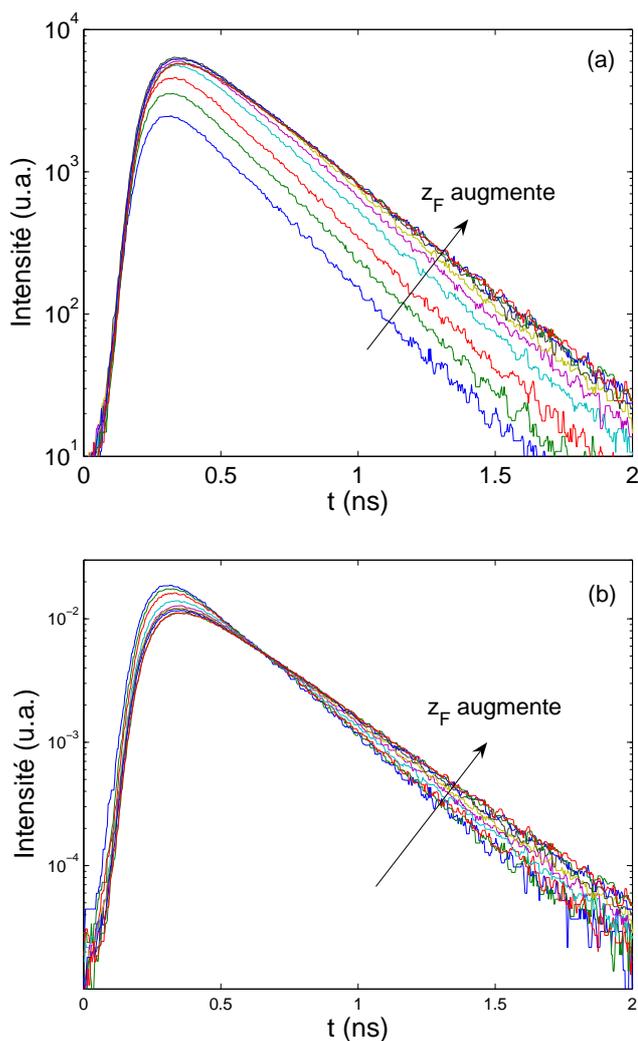


FIG. 3.16: (a) Influence de l'augmentation de la profondeur des fibres sous la surface sur le signal mesuré. Les courbes ont été tracées pour $z_F = 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2$ et 3 cm , sur un fantôme de coefficient d'absorption de référence 0.126 cm^{-1} et de coefficient de diffusion réduit attendu autour de 12 cm^{-1} . La distance entre les fibres est $r = 1.15 \text{ cm}$. (b) Mêmes courbes normées à la même aire.

Prenons par exemple le signal mesuré pour $z_F = 0.4 \text{ cm}$ pour le comparer avec les différents modèles directs dont nous disposons, en utilisant les coefficients optiques attendus. La profondeur des fibres, mesurée en unité de $1/\mu'_s$, est égale à $\mu'_s z_F$ de

l'ordre de 5 pour un coefficient de diffusion réduit attendu autour de 12 cm^{-1} . Sur la figure 3.17, nous avons superposé le signal au modèle *ebc* à $z_F=0.4 \text{ cm}$, au modèle *ebc* à $z_F=0 \text{ cm}$ et aussi au modèle infini. Le signal mesuré est situé entre les courbes du modèle infini et du modèle *ebc* avec $z_F=0$. Le modèle *ebc* qui tient compte de la profondeur est celui qui est le plus proche du signal mesuré, ce qui justifie son intérêt. Cependant, l'accord aux temps longs pourrait être meilleur, ce qui laisse penser que les coefficients issus de la procédure d'ajustement des paramètres seront légèrement différents de ceux attendus.

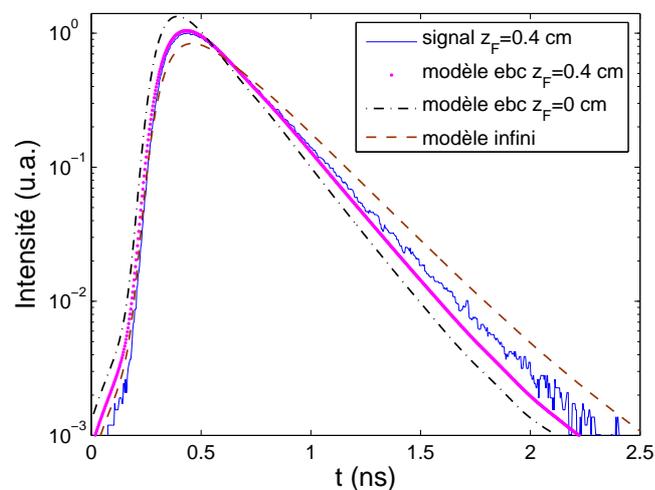


FIG. 3.17: Superposition du signal mesuré pour $z_F=0.4 \text{ cm}$ avec différents modèles : modèle *ebc* à $z_F=0.4 \text{ cm}$, modèle *ebc* à $z_F=0 \text{ cm}$ et modèle infini. Le fantôme possède un coefficient d'absorption de référence 0.126 cm^{-1} et un coefficient de diffusion réduit attendu autour de 12 cm^{-1} . La distance entre les fibres est $r=1.15 \text{ cm}$.

3.6 Résultats

3.6.1 Résultats de la procédure d'ajustement pour des mesures en surface et en milieu infini

Nous présentons tout d'abord les performances de la procédure d'ajustement des paramètres pour des mesures en surface et des mesures en milieu infini. Ces dernières correspondent à une profondeur des fibres de 4 cm sous la surface, pour une épaisseur totale de liquide de 8 cm. Nous notons $\mu_{a, \text{ajusté}}^{ebc}$ le coefficient d'absorption résultant de la procédure d'ajustement avec le modèle *ebc* (Eq. 3-19) pour les mesures en surface avec $z_F=0$. Pour les mesures en milieu infini, le modèle infini est utilisé (Eq. 3-12), et le résultat est noté $\mu_{a, \text{ajusté}}^{\infty}$. Des notations analogues sont utilisées pour le coefficient de diffusion réduit.

3.6.1.1 Mesures en absorption variable

Cinq fantômes avec différents coefficients d'absorption et la même concentration d'Intralipide (1 % en concentration absolue) ont été préparés. Les résultats de la procédure d'ajustement sont présentés sur la figure 3.18, en superposant les mesures en surface et en milieu infini. Nous avons aussi ajouté les valeurs mesurées du coefficient d'absorption de référence. Les valeurs de $\mu_{a, \text{ajusté}}^{\infty}$ et de μ_a^{ref} sont en bon accord. Le tracé de $\mu_{a, \text{ajusté}}^{\infty}$ en fonction de la concentration d'encre montre la linéarité du système. Cependant, les résultats du coefficient d'absorption pour les mesures en surface laissent apparaître un décalage qui se traduit par une sous-estimation de $\mu_{a, \text{ajusté}}^{ebc}$ par rapport à μ_a^{ref} . L'erreur relative par rapport à μ_a^{ref} est comprise entre 6 et 18 %, elle augmente légèrement avec l'absorption.

Les coefficients de diffusion réduits $\mu'_{s, \text{ajusté}}^{ebc}$ et $\mu'_{s, \text{ajusté}}^{\infty}$ sont aussi représentés pour les différents fantômes sur un axe des ordonnées secondaires. Chacun d'eux donne des valeurs constantes pour les différents coefficients d'absorption, mais $\mu'_{s, \text{ajusté}}^{ebc}$ a des valeurs plus élevées que $\mu'_{s, \text{ajusté}}^{\infty}$. Les deux coefficients varient à la surface comme s'il y avait plus de photons que prédit par le modèle : cela entraîne une diminution de μ_a et une augmentation de μ'_s . Cette différence entre les résultats de surface et en profondeur est une conséquence des observations des modèles directs à la section précédente. Les mêmes coefficients ne permettraient pas d'avoir un accord à la fois en surface et en milieu infini. Ces résultats soulignent la difficulté d'interpréter les mesures en surface.

3.6.1.2 Mesures en diffusion variable

Cinq fantômes avec différents coefficients de diffusion réduits et la même absorption ($\mu_a^{ref} = 0.104 \text{ cm}^{-1}$) ont été préparés. De façon analogue au paragraphe précédent, les résultats sont présentés sur la figure 3.19. Les coefficients $\mu'_{s, \text{ajusté}}^{ebc}$ et $\mu'_{s, \text{ajusté}}^{\infty}$ sont bien linéaires en fonction de la concentration en Intralipide. Nous retrouvons le décalage déjà présent à la figure 3.18 entre les résultats de mesure en surface et en profondeur.

Les coefficients d'absorption sont constants, avec à nouveau le décalage précédent. Cependant, les valeurs du coefficient d'absorption, en milieu infini et pour les plus pe-

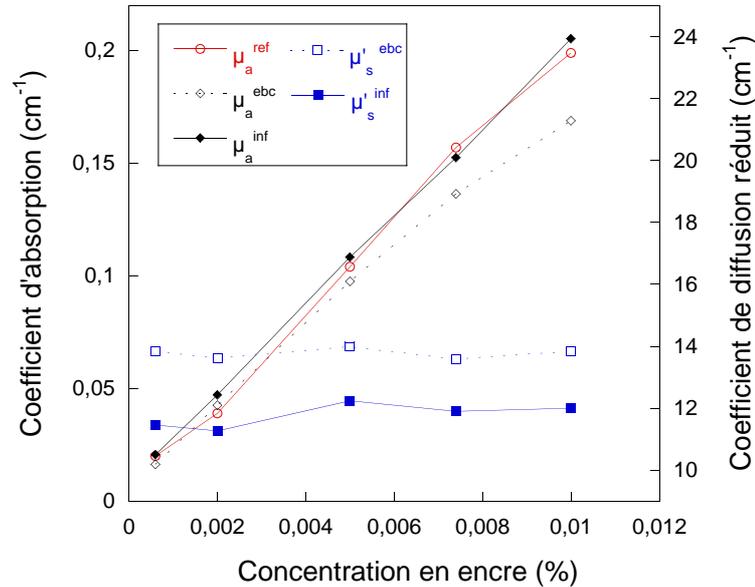


FIG. 3.18: Coefficients d'absorption (diamants) et de diffusion réduits ajustés (carrés), en fonction de la concentration d'encre, pour des mesures en surface (lignes pointillées et symboles ouverts) et pour des mesures en milieu infini (lignes pleines et symboles pleins). Le coefficient d'absorption de référence (absorption de l'encre avant ajout de l'Intralipide) est aussi représenté (cercles ouverts rouges).

tites concentrations en Intralipide est légèrement plus élevé que pour les plus grandes concentrations en Intralipide. Pour la plus petite concentration de diffuseurs, μ'_s est de l'ordre de 4 cm^{-1} pour un coefficient d'absorption de l'ordre de 0.1 cm^{-1} . Il se peut que l'on se situe dans les limites d'application de l'équation de diffusion où la condition $\mu_a \ll \mu'_s$ n'est plus vérifiée. Cet effet n'est néanmoins pas visible pour les mesures en surface.

Différents points concernant les modèles et l'ajustement des paramètres peuvent être discutés. Le premier concerne la définition du coefficient de diffusion D , que nous avons évoquée au chapitre 1. Nous avons comparé la définition $D = 1/\mu'_s$ avec celle que nous avons utilisée $D = 1/[3(\mu_a + \mu'_s)]$. Pour nos résultats, l'utilisation de $D = 1/\mu'_s$ ne change pas la valeur du coefficient d'absorption et change celle du coefficient de diffusion réduit de moins de 1.3 %. Nous pouvons donc dire que ces deux définitions sont équivalentes pour les gammes de coefficients optiques que nous avons considérées.

Un second point est la définition du coefficient z_B . Si l'on change sa valeur de 0 (conditions zbc) à $2z_B$, on n'observe pas de changements significatifs sur les résultats. Plus précisément pour les mesures en surface, l'utilisation des conditions zbc , c'est-à-dire l'équation classique du flux (Eq. 3-21), ne change pas le coefficient d'absorption de façon significative et change le coefficient de diffusion réduit de moins de 2 %.

Enfin, nous pouvons discuter le choix de l'intervalle de temps choisi pour réaliser l'ajustement des paramètres. Si l'on prend 80 % du maximum au lieu de 90 %, les

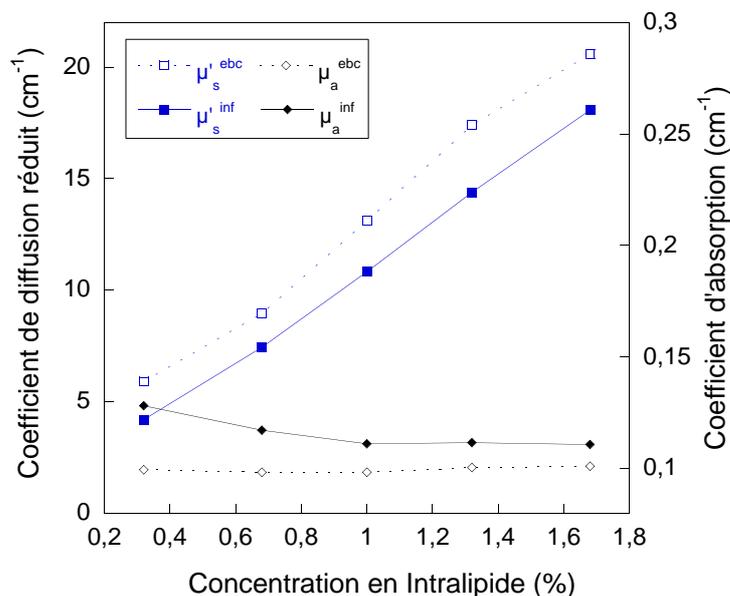


FIG. 3.19: Coefficients de diffusion réduits (carrés) et d'absorption (diamants) ajustés, en fonction de la concentration d'Intralipide, pour des mesures en surface (lignes pointillées et symboles ouverts) et pour des mesures en milieu infini (lignes pleines et symboles pleins).

changements ne sont pas significatifs. Une étude complète sur l'influence du choix de la borne de départ de l'intervalle de temps peut être trouvée dans la référence [103]. Les auteurs ajustent un modèle *ebc* sur des données simulées en Monte Carlo et font apparaître les limites de l'approximation aux temps courts.

3.6.2 Résultats de la procédure d'ajustement pour des mesures à différentes profondeurs sous la surface

Nous présentons ici des résultats pour des mesures à différentes profondeurs sur deux fantômes différents. Les fantômes ont le même coefficient de diffusion réduit (autour de 11-12 cm⁻¹ pour de l'Intralipide 1 %) et des coefficients d'absorption différents. Le coefficient d'absorption de référence pour le premier fantôme est 0.126 cm⁻¹, celui du deuxième fantôme est 0.190 cm⁻¹. Pour chaque profondeur, nous avons ajusté les paramètres avec deux modèles :

- le modèle *ebc* (Eq. 3-19) où la profondeur des fibres est une donnée connue.

Les coefficients ajustés sont notés $\mu_{a,ajusté}^{ebc}$ et $\mu_{s,ajusté}^{ebc}$. Contrairement à la section précédente, le modèle est désormais fonction de la profondeur des fibres.

- le modèle infini (Eq. 3-12), où les coefficients ajustés sont notés $\mu_{a,ajusté}^{\infty}$ et $\mu_{s,ajusté}^{\infty}$.

Les résultats pour les deux fantômes sont donnés sur les figures 3.20 et 3.21. Pour chacun d'eux, les coefficients d'absorption et les coefficients de diffusion réduits sont représentés en fonction de la profondeur z_F des fibres.

La première observation est que les deux modèles convergent bien lorsque la profondeur des fibres augmente. De plus, les courbes présentent un comportement analogue pour les deux fantômes.

Nous pouvons tout d'abord retrouver les comportements extrêmes vus pour les mesures en surface et en milieu infini à la section précédente. En effet, nous constatons à nouveau que $\mu_{a,\text{ajusté}}^{ebc}$ à la surface en $z=0$ cm est plus petit que $\mu_{a,\text{ajusté}}^{\infty}$ à $z=4$ cm. De même, $\mu'_{s,\text{ajusté}}^{ebc}$ à la surface est plus élevé que $\mu'_{s,\text{ajusté}}^{\infty}$ en profondeur.

Par ailleurs, à la surface, le modèle infini surestime le coefficient d'absorption et sous-estime le coefficient de diffusion réduit, ce qui souligne que ce modèle n'est pas adapté aux mesures de surface. Nous l'avions déjà évoqué de façon théorique quand nous avons comparé les différentes conditions aux limites à la section 3.2.3. Dans le but de compenser les pertes dues à la surface, le modèle infini augmente $\mu_{a,\text{ajusté}}^{\infty}$ par rapport à sa valeur en profondeur et diminue en revanche la valeur de $\mu'_{s,\text{ajusté}}^{\infty}$. Cette tendance s'atténue lorsque la profondeur augmente. Pour les deux fantômes, les écarts entre $\mu_{a,\text{ajusté}}^{\infty}$ et $\mu'_{s,\text{ajusté}}^{ebc}$ sont de 34 et 28 % respectivement. Pour le coefficient de diffusion réduit, les écarts sont de 26 et 29 % respectivement. Ces chiffres sont bien du même ordre de grandeur que ceux obtenus à partir des données simulées de la partie théorique.

Les positions relatives de $\mu_{a,\text{ajusté}}^{ebc}$ et $\mu_{a,\text{ajusté}}^{\infty}$ peuvent être également expliquées avec les équations (Eq. 3-22) et (Eq. 3-23) (page 58). En les soustrayant deux à deux, on obtient $c\mu_a^{ebc} = c\mu_a^{\infty} - 1/t + o(t^2)$. Cette expression confirme que $\mu_{a,\text{ajusté}}^{ebc}$ est plus petit que $\mu_{a,\text{ajusté}}^{\infty}$ près de la surface.

Si nous examinons les variations des coefficients ajustés grâce au modèle *ebc*, $\mu_{a,\text{ajusté}}^{ebc}$ augmente lentement et $\mu'_{s,\text{ajusté}}^{ebc}$ décroît lorsque la profondeur augmente, jusqu'à atteindre un plateau qui correspond aux valeurs communes avec le modèle infini. Pour le modèle infini, à partir de la surface, $\mu_{a,\text{ajusté}}^{\infty}$ diminue et $\mu'_{s,\text{ajusté}}^{\infty}$ augmente avant de se stabiliser. Comme le prédisaient les formules, les deux modèles tendent vers la même limite. Nous noterons que, pour chaque coefficient, cette limite est atteinte à la même profondeur pour les deux modèles. Elle est néanmoins différente entre les deux coefficients.

Ces mesures permettent finalement de déterminer à partir de quelle profondeur le modèle infini peut s'appliquer. Pour le premier fantôme moins absorbant, les résultats montrent que le modèle infini peut s'appliquer à partir de 2 cm au-dessous de la surface pour le coefficient d'absorption et à partir de 0.5 cm seulement pour le coefficient de diffusion réduit. Nous prenons comme référence les valeurs obtenues en profondeur. Les conclusions sont semblables pour le second fantôme présentant un coefficient d'absorption plus élevé, la limite pour le coefficient d'absorption semble être atteinte pour une profondeur légèrement inférieure entre 1 et 2 cm.

Cette profondeur dépend des coefficients optiques du milieu et nous ne pouvons conclure que sur les deux fantômes présentés. Sur ces cas, cette profondeur n'est pas la

même pour le coefficient d'absorption que pour le coefficient de diffusion de réduit : elle est plus vite atteinte pour ce dernier que pour le coefficient d'absorption. Nous pouvons faire l'hypothèse que cette profondeur diminue lorsque le coefficient d'absorption augmente. Une étude sur une plus large gamme de propriétés optiques permettrait de compléter cette étude et de répondre à ces questions.

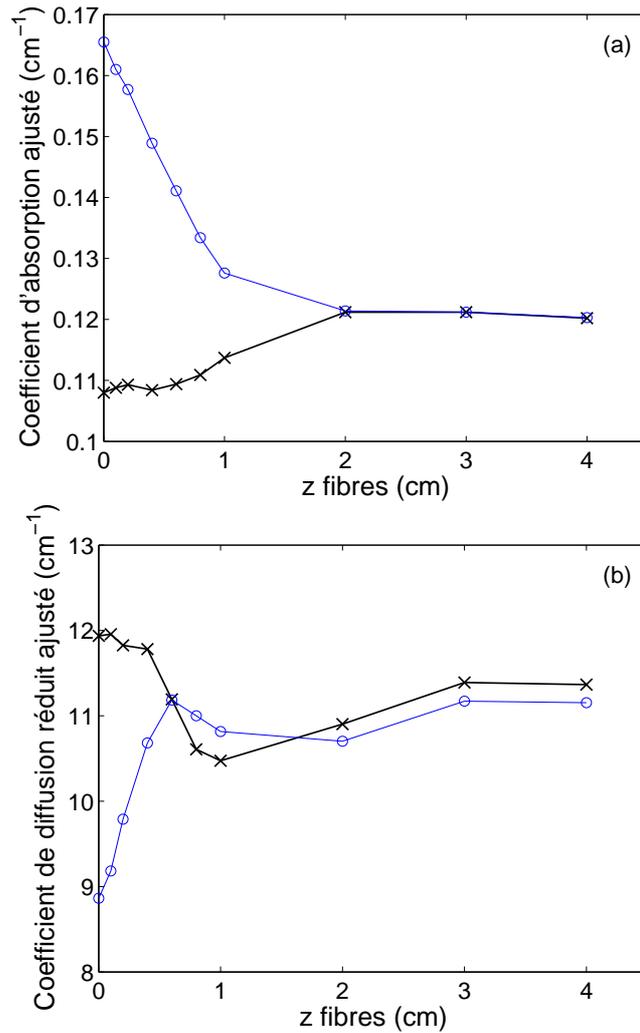


FIG. 3.20: Fantôme de coefficient d'absorption de référence 0.126 cm^{-1} (a) Coefficients d'absorption obtenus avec le modèle infini (cercles) et avec le modèle ebc (croix). (b) Coefficients de diffusion réduits obtenus avec le modèle infini (cercles) et avec le modèle ebc (croix).

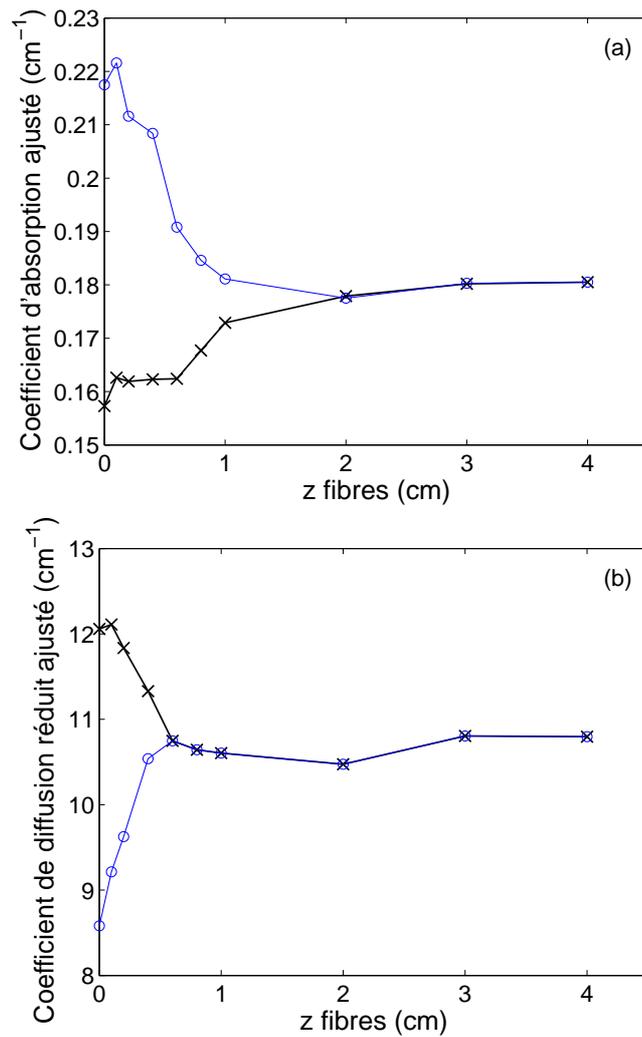


FIG. 3.21: Fantôme de coefficient d'absorption de référence 0.190 cm^{-1} (a) Coefficients d'absorption obtenus avec le modèle infini (cercles) et avec le modèle ebc (croix). (b) Coefficients de diffusion réduits obtenus avec le modèle infini (cercles) et avec le modèle ebc (croix).

3.6.3 Discussion

Nous avons mis en évidence l'importance de l'introduction de conditions aux limites en vérifiant que le modèle infini était mal adapté aux mesures de surface. Cependant nous soulignons également les limitations du modèle *ebc*. L'adéquation n'est pas parfaite entre ce modèle et les phénomènes à l'interface. Les erreurs à la surface peuvent être expliquées par les limitations de l'équation de diffusion aux temps courts [87], révélées par des comparaisons avec des simulations Monte Carlo. Les différentes conditions aux limites demeurent équivalentes sur ce point. Une source d'erreur peut aussi venir des conditions d'expérimentation sur des fantômes liquides. L'effet de la tension superficielle du liquide sur les fibres peut guider la lumière. Cet effet doit néanmoins disparaître lorsque les fibres plongent en profondeur. Le fait que nous ayons observé une continuité en profondeur ne confirme pas cet argument. Par ailleurs, en se demandant comment transformer un milieu semi-infini en milieu infini, nous avons réalisé des mesures avec une plaque réfléchissante placée dans le plan des fibres. Elles sont présentées dans l'annexe B.

Le modèle pour les mesures en profondeur trouve des applications biomédicales pour les organes qui peuvent être sondés par endoscopie. C'est le cas par exemple pour les cancers de la prostate. Ils sont traités par photothérapie interstitielle [104, 105] ou par brachithérapie. La photothérapie repose sur l'activation optique d'une molécule photosensible. En présence d'oxygène, celle-ci produit des composés toxiques de manière à détruire la tumeur. La connaissance des propriétés optiques est donc importante pour doser la quantité de lumière. Une équipe les a mesurées en parallèle avec une intervention de brachithérapie [106]. Lors de cette intervention, de petites quantités d'éléments radioactifs sont introduites directement dans l'organe à l'aide d'aiguilles. Les mesures des propriétés optiques ont été réalisées avec des fibres optiques liées à ces aiguilles.

3.7 Comparaison avec une autre technique : réflectance intégrale

La méthode appelée « réflectance intégrale » est une méthode de détermination des propriétés optiques des milieux diffusants en surface qui a été développée par L. Voisin-Gobin pendant sa thèse [107], dans l'équipe du Professeur H. Saint-Jalmes au Laboratoire de RMN, Instrumentation et Méthodologie en Biophysique de Lyon. Cette équipe utilise toujours ce type de dispositif. Chacune de nos équipes travaillait sur des fantômes différents avec des techniques différentes. Nous avons donc pu comparer nos résultats respectifs et tester de nouveaux fantômes. Nous avons réalisé des mesures en commun sur nos bancs expérimentaux. Les calculs pour les mesures de réflectance intégrale ont été effectués par l'équipe du Laboratoire de RMN.

3.7.1 Description de la méthode

La réflectance intégrale est une technique optique spatialement résolue. Elle présente l'avantage d'être peu coûteuse et simple à mettre en oeuvre. Le banc expérimental est schématisé sur la figure 3.22. La longueur d'onde du laser est égale à 670 nm. La méthode ainsi que le déroulement précis d'une expérience sont décrits dans les références [107, 108]. Nous allons en donner ici les grands principes.

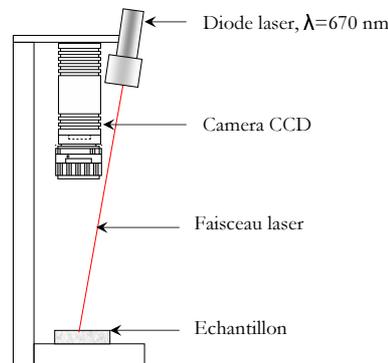


FIG. 3.22: *Dispositif expérimental pour les mesures de réflectance intégrale.*

Le milieu est illuminé par un faisceau laser continu. La distribution spatiale de la lumière rétro diffusée est acquise par un caméra CCD. Cette image est normalisée par l'intensité incidente pour donner la réflectance $R(r, \theta)$ en coordonnées polaires. Ensuite, une nouvelle quantité appelée réflectance intégrale, notée $R_{int}(r)$ est calculée. Elle représente l'intégrale de l'image de réflectance sur le rayon r :

$$R_{int}(r) = \int_0^r \int_0^{2\pi} R(r', \theta) dr' d\theta \quad (\text{Eq. 3-28})$$

L'intérêt de cette grandeur est d'améliorer le rapport signal sur bruit car le signal est moyenné sur sa variable angulaire. Cette courbe est ajustable sur une fonction en

exponentielle avec deux paramètres a et b :

$$R_{int}(r) = a \left(1 - \exp\left(\frac{-r}{b}\right) \right) \quad (\text{Eq. 3-29})$$

Grâce à des simulations Monte Carlo, une relation entre les couples (a, b) et (μ_a, μ'_s) a été trouvée :

$$\begin{cases} a &= a_1 \exp\left(-\frac{a_2}{\sqrt{1+\frac{\mu'_s}{\mu_a}}}\right) \\ b &= \frac{b_1+b_2 \ln(\mu_a/\mu'_s)}{\mu'_s} \end{cases} \quad (\text{Eq. 3-30})$$

avec :

$$\begin{cases} a_1 &= 0.795 + 0.49 n - 0.276 n^2 \\ a_2 &= 3.01 n \\ b_1 &= -0.5 + 2 n - n^2 \\ b_2 &= -0.23 + 0.7 n \end{cases}$$

où n est l'indice de réfraction du milieu. Une procédure d'ajustement des paramètres a et b permet de remonter au couple (μ_a, μ'_s) .

Fantômes utilisés Nous avons comparé les résultats des mesures par cette technique et par la technique résolue en temps pour des mesures à 4 cm sous la surface. Nous nous affranchissons ainsi des problèmes de bords. Les mesures ont été effectuées sur deux types de fantômes de caractéristiques analogues que nous allons préciser.

Le premier milieu diffusant est une solution calibrée de microsphères de latex (Merck) fournie par le Laboratoire de RMN. Le diamètre des microsphères est de $740 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$ et de coefficient d'anisotropie calculé $g=0.88 \pm 0.01$. Le coefficient de diffusion réduit de la solution mère a été calculé à partir de la théorie de Mie et vaut $\mu'_s = 20 \text{ cm}^{-1}$. Par des dilutions successives, nous avons fait varier le coefficient de diffusion réduit, à absorption nulle. Le coefficient de diffusion réduit est notre référence pour ces fantômes. Nous avons quatre fantômes de μ'_s de 5, 10, 15 et 20 cm^{-1} . Ensuite, nous avons repris le fantôme de coefficient de diffusion réduit 10 cm^{-1} auquel nous avons ajouté successivement différents volumes d'encre pour faire varier le coefficient d'absorption. Pour cette série, nous ne disposons que du pourcentage d'encre en solution, nous n'avons pas eu accès à une mesure du coefficient de référence.

Nous avons repris les fantômes Intralipide vus précédemment pour avoir un coefficient de diffusion variable à absorption nulle puis une absorption variable avec un coefficient de diffusion de l'ordre de 10 cm^{-1} . La valeur de μ_a^{ref} à 631 nm est notre référence pour ces fantômes. Comme les deux types de mesures ne sont pas effectuées à la même longueur d'onde, on s'attend à un coefficient d'absorption déterminé par la méthode temporelle ($\lambda=631 \text{ nm}$) supérieur à celui déterminé par la méthode réflectance intégrale (670 nm). L'écart mesuré au spectrophotomètre va de 10 % pour $\mu_a^{ref}=0.02 \text{ cm}^{-1}$ à 5 % pour $\mu_a^{ref}=0.2 \text{ cm}^{-1}$.

3.7.2 Résultats

Les résultats des mesures sont donnés sur la figure 3.23 pour les coefficients de diffusion réduits et sur la figure 3.24 pour les coefficients d'absorption. L'allure générale des courbes est la même pour les deux types de fantômes. Pour le coefficient d'absorption, nous notons $\mu_{a, \text{ajusté}}^{RI}$ le résultat issu des mesures en réflectance intégrale et $\mu_{a, \text{ajusté}}^T$ le résultats issu des mesures temporelles. Des notations analogues sont utilisées pour le coefficient de diffusion réduit.

Dans les deux cas, sur la figure 3.23, $\mu_{s, \text{ajusté}}^T$ est plus faible que $\mu_{s, \text{ajusté}}^{RI}$. Pour les microsphères, les écarts se situent entre 13 et 26 %, en augmentant lorsque la concentration en microsphères augmente. Ils sont légèrement plus faibles pour l'Intralipide, de 5 à 19 % pour le plus grand coefficient de diffusion réduit. Si l'on compare ces résultats à la valeur de référence calculée, $\mu_{s, \text{ajusté}}^{RI}$ est bien en accord avec celle-ci à 10 % près par valeurs supérieures. En revanche, $\mu_{s, \text{ajusté}}^T$ est en accord mais par valeurs inférieures : à 10 % pour les deux premières concentrations, puis à 15 et 20 % pour les deux dernières concentrations.

Concernant le coefficient d'absorption, pour les microsphères, les deux techniques donnent des valeurs similaires autour de 0.01 cm^{-1} . Pour l'Intralipide, la situation est légèrement différente : $\mu_{a, \text{ajusté}}^T$ est bien toujours constant autour de 0.009 cm^{-1} , mais $\mu_{a, \text{ajusté}}^{RI}$ présente des valeurs plus élevées pour les faibles concentrations d'Intralipide, puis se stabilise autour de 0.02 cm^{-1} . Ces résultats ne sont pas en accord avec les différences de longueurs d'ondes pour lesquels on attendait $\mu_{a, \text{ajusté}}^T > \mu_{a, \text{ajusté}}^{RI}$. Dans ce cas, la différence entre les coefficients d'absorption donnés par les deux techniques est bien compatible avec la différence entre les coefficients de diffusion réduits. Afin de décrire une quantité de lumière constante entre les deux techniques, un coefficient de diffusion réduit plus grand permet d'obtenir plus de lumière et de compenser un coefficient d'absorption plus grand en RI. Cet effet de compensation est moins prononcé pour les microsphères.

Sur la figure 3.24, pour les deux types de fantômes, $\mu_{a, \text{ajusté}}^T$ présente des valeurs supérieures à $\mu_{a, \text{ajusté}}^{RI}$, de 30 % en moyenne (sauf pour la plus faible absorption 6 %), alors que l'on attendait des écarts plus faibles. En revanche, les coefficients de diffusion réduits sont constants. Il n'y a pas de compensation entre les deux coefficients. Pour les fantômes Intralipide, $\mu_{a, \text{ajusté}}^T$ est bien en accord avec la valeur de référence. Pour les valeurs de $\mu_{a, \text{ajusté}}^{RI}$, il apparaît que la méthode réflectance intégrale sous-estime le coefficient d'absorption, dès que le fantôme a une concentration en encre non nulle.

Il est assez délicat de conclure au vu des résultats exposés car les deux techniques présentent des méthodes et des modèles différents. La sous-estimation du coefficient d'absorption avec la méthode RI, sans compensation sur le coefficient de diffusion réduit est assez surprenante et difficile à interpréter. Les coefficients de diffusion réduits ajustés sont bien du même ordre de grandeur, en accord à 10 % près pour la valeur de référence des microsphères et à moins de 20 % près pour les fantômes Intralipide. L'utilisation de microsphères calibrées a permis d'avoir une valeur de référence car nous n'avions que des valeurs relatives dans la partie précédente. Nous retiendrons également que les deux types de fantômes présentent bien des comportements similaires.

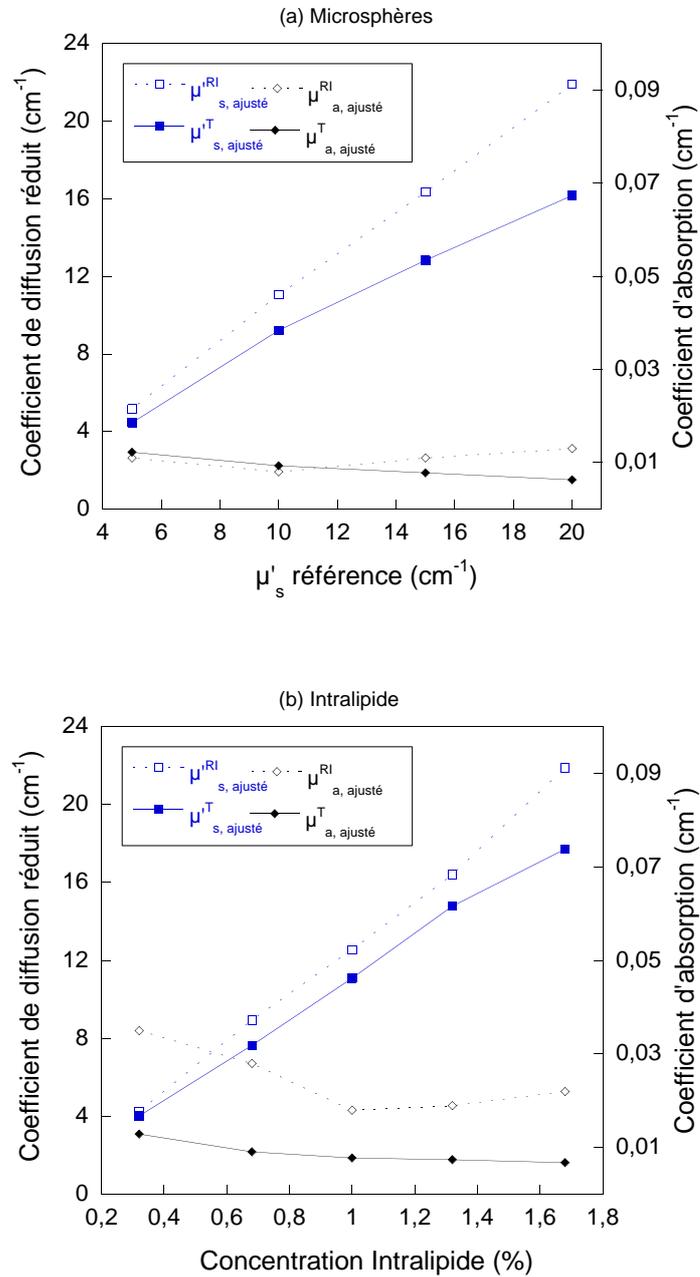


FIG. 3.23: (a) Coefficients d'absorption et de diffusion réduits obtenus par les méthodes réflectance intégrale (RI) et temporelle (T) sur des fantômes de concentrations de microsphères variables. L'axe des abscisses est la valeur de référence pour le coefficient de diffusion réduit calculé à partir de la théorie de Mie. (b) Mêmes coefficients pour des fantômes de concentrations en Intralipide variable.

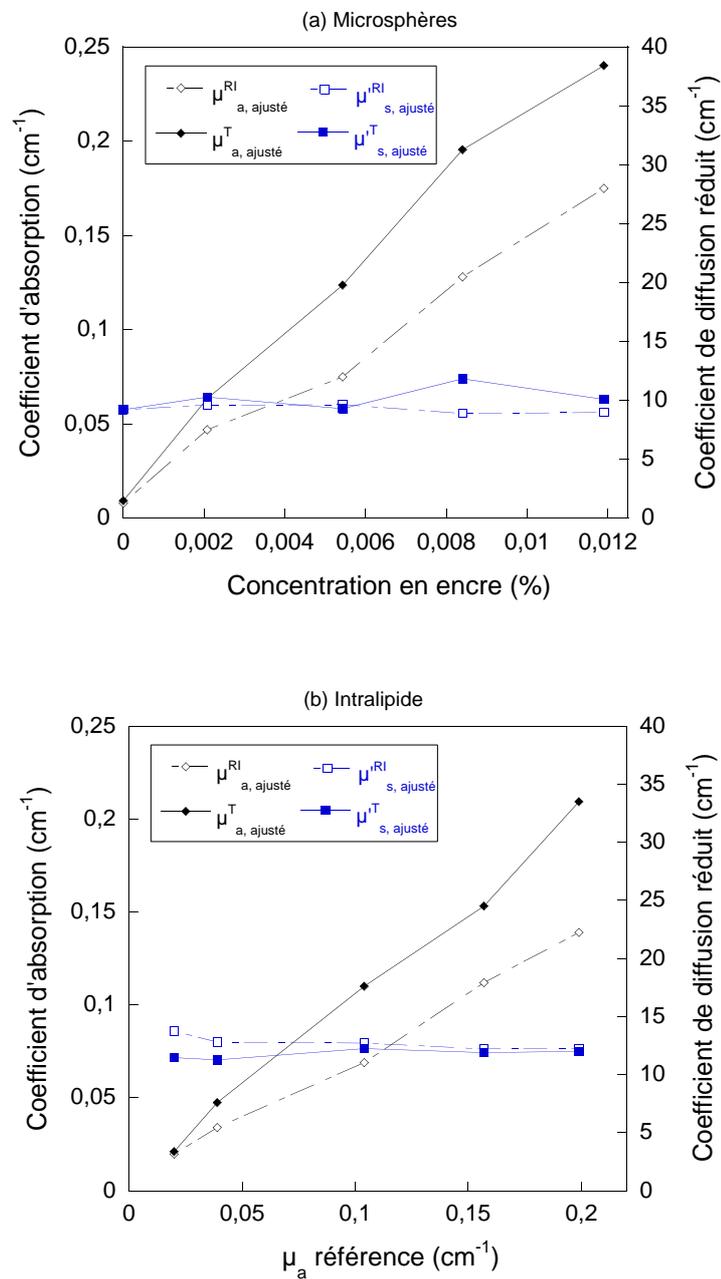


FIG. 3.24: (a) Coefficients d'absorption et de diffusion réduits obtenus par les méthodes réflectance intégrale (RI) et temporelle (T) sur des fantômes microsphères pour des concentrations en encre variables. (b) Mêmes coefficients pour des fantômes Intralipide. L'axe des abscisses est la valeur de référence pour le coefficient d'absorption.

Bilan du chapitre

Nous avons mis en oeuvre une méthode temporelle de mesure des propriétés optiques d'un milieu diffusant homogène. Des mesures, en surface et à 4 cm au-dessous, ont été effectuées sur différents fantômes optiques. Elles ont montré la bonne linéarité des coefficients obtenus vis-à-vis des variations de l'absorption et de la diffusion. Le coefficient d'absorption déterminé pour les mesures en profondeur est en bon accord à 5 % près en moyenne avec la valeur d'absorption de référence. Le coefficient de diffusion réduit entre dans la gamme des valeurs données pour l'Intralipide dans la littérature. Les mesures en surface font cependant apparaître des différences, notamment une sous-estimation du coefficient d'absorption de l'ordre de 12 % en moyenne et une surestimation du coefficient de diffusion réduit. Pour mieux comprendre ce phénomène, nous avons réalisé des mesures à différentes profondeurs sous la surface et proposé un modèle pour les interpréter. Cela a permis de faire le lien entre les mesures en surface et celles en profondeur, et de mettre en évidence à partir de quelle profondeur le modèle infini pouvait être appliqué. Nous avons discuté des sources d'erreur des mesures en surface. Pour les expérimentations des chapitres suivants, les mesures de caractérisation des milieux seront systématiquement effectuées dans des conditions de milieu infini pour s'affranchir des problèmes d'interfaces. Enfin nous avons comparé notre méthode avec une autre méthode optique appelée réflectance intégrale. Cela a confirmé nos valeurs de coefficients de diffusion réduits, en particulier sur des fantômes calibrés.

Nous avons validé une méthode, mais aussi mis en évidence les perturbations apportées par l'interface et les limitations du modèle de diffusion en surface. Forts de ces connaissances, nous allons les exploiter au chapitre suivant pour obtenir le signal temporel d'une inclusion fluorescente placée dans un milieu diffusant.

Chapitre 4

Établissement et validation du modèle direct en fluorescence en milieu infini et en milieu semi-infini

Après la description des mesures des propriétés optiques, nous passons à présent aux mesures sur un milieu diffusant contenant une inclusion fluorescente. Comme c'est le cas pour les autres techniques d'imagerie, la localisation d'une inclusion fluorescente nécessite de comprendre l'interaction de la sonde utilisée : ici, la lumière, avec le milieu. C'est le modèle direct en fluorescence qui décrit cette interaction, c'est-à-dire qu'il donne les équations qui permettent de décrire les mesures de fluorescence aux points de détection. Dans le chapitre suivant, on s'appuiera sur le modèle direct pour retrouver la distribution spatiale de fluorophores. L'utilisation de l'ensemble du profil temporel en chacun des points de mesure est délicate. Pour y remédier, des variables caractéristiques de ces profils sont communément définies pour être utilisées dans le processus d'inversion. Dans une première partie, nous exposerons la théorie issue de la littérature qui donne la densité de photons en milieu infini. Nous montrerons ensuite que des variables comme les deux premiers moments peuvent en être extraites. Dans une seconde partie, les expressions des moments seront établies en milieu semi-infini. Finalement, nous verrons si ces modèles peuvent être validés sur des mesures expérimentales.

Sommaire

4.1	Théorie	87
4.1.1	Solution générale de l'équation de diffusion en temporel en fluorescence	87
4.1.2	Solution analytique simplifiée en milieu infini	88
4.2	Calcul des deux premiers moments	90
4.2.1	Généralités sur les moments	91
4.2.2	Expressions analytiques en milieu infini	92
4.2.3	Ordres de grandeur	94
4.2.4	Choix de la géométrie de mesure	94
4.3	Établissement des expressions analytiques en milieu semi-infini	96
4.3.1	Calcul du temps moyen	96
4.3.2	Calcul de la variance	98
4.3.3	Comparaison	99
4.4	Validation expérimentale du modèle direct en milieu infini	101
4.4.1	Système et géométrie de mesure	101
4.4.2	Signaux temporels	102
4.4.3	Comparaison des TPSFs expérimentales avec leur expression théorique en milieu infini	103
4.4.4	Calcul du temps d'amplitude maximale	106
4.4.5	Mesures des moments en milieu infini pour différentes positions de l'inclusion sous les fibres	106
4.4.6	Discussion	109
4.5	Validation expérimentale du modèle direct en milieu semi-infini	110
4.5.1	Système et géométrie de mesure	110
4.5.2	Mesures des moments en surface pour différentes positions de l'inclusion sous les fibres	110

4.1 Théorie

4.1.1 Solution générale de l'équation de diffusion en temporel en fluorescence

Nous cherchons à exprimer la densité de photons de fluorescence de façon analytique. Nous avons vu au chapitre 1 (section 1.4.5) le système d'équations couplées qui régit la propagation de la lumière dans un milieu diffusant avec une distribution spatiale quelconque de fluorophores. Nous choisissons une autre approche plus descriptive pour obtenir une solution analytique, en considérant tout d'abord un fluorophore ponctuel, puis en effectuant des approximations pour passer à une distribution spatiale quelconque. La discussion suivante est adaptée de la thèse de M. O'Leary [50].

Considérons un milieu diffusant homogène et une impulsion source en \mathbf{r}_s à t_0 . Un détecteur est placé en \mathbf{r}_d . On note $\phi_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, t')$ la densité de photons qui atteint le point \mathbf{r} à t' . L'indice x souligne que la longueur d'onde est celle de la source d'excitation λ_x . Nous n'avons pas besoin de faire d'hypothèses pour l'instant sur la forme de ϕ_x . Pour fixer les idées, on peut noter que si le milieu est infini, ϕ_x aura la forme donnée par la solution (Eq. 3-2) en milieu infini.

Un fluorophore placé en \mathbf{r} va absorber cette lumière et émettre de la lumière de fluorescence à t' , avec un temps de vie τ , une efficacité quantique η et un coefficient d'absorption $\mu_{ax \rightarrow m}$ (nous rappelons que ce coefficient est lié à la concentration locale de fluorophores à la longueur d'onde d'excitation). La densité de photons en \mathbf{r} à t' est la convolution de la fonction de propagation ϕ_x et du déclin de fluorescence :

$$\delta S_f(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, t') = \int_0^{t'} \phi_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, t'' - t_0) \frac{\eta \mu_{ax \rightarrow m}}{\tau} \exp\left(-\frac{t' - t''}{\tau}\right) dt'' \quad (\text{Eq. 4-1})$$

Nous l'avons noté δS_f car ce terme devient alors un terme source à la longueur d'onde d'émission λ_m qui va se propager et être détecté en \mathbf{r}_d à t . D'où l'expression de la densité de photons finale $\delta\phi_{fluo}$, pour un fluorophore ponctuel, qui est la convolution du terme δS_f et de la fonction de propagation ϕ_m entre l'inclusion et le détecteur :

$$\begin{aligned} \delta\phi_{fluo}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, t) &= \int_0^t \delta S_f(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, t') \phi_m(\mathbf{r}, \mathbf{r}_d, t - t') dt' \\ &= \int_0^t \int_0^{t'} \phi_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, t'' - t_0) \frac{\eta \mu_{ax \rightarrow m}}{\tau} \exp\left(-\frac{t' - t''}{\tau}\right) \phi_m(\mathbf{r}, \mathbf{r}_d, t - t') dt'' dt' \quad (\text{Eq. 4-2}) \end{aligned}$$

S'il y a plusieurs fluorophores dans le milieu, on intègre sur tout le volume pour obtenir l'expression finale :

$$\phi_{fluo}(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, t) = \int_V d\mathbf{r} \delta\phi_{fl}(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, t) \quad (\text{Eq. 4-3})$$

Il faut noter que ce passage n'est pas évident et nécessite des approximations. En effet, cette intégration sur le volume n'est possible que si l'on néglige les éventuelles réabsorptions et diffusions par les autres fluorophores qui ne sont classiquement pas prises en compte dans ce modèle [50, 46].

L'expression finale peut donc s'exprimer en temporel sous forme d'une double convolution. Cette expression est assez complexe, c'est pourquoi nous allons présenter une solution simplifiée en milieu infini dans la section suivante.

Il est utile également de connaître la forme de la fonction de fluorescence dans le domaine fréquentiel car son expression sera plus simple. Le passage du domaine temporel au domaine fréquentiel est explicité dans l'annexe C. Il s'effectue en prenant la transformée de Fourier de l'expression temporelle. Nous donnons ici le principe du raisonnement et nous notons $\Phi_{fluor}(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \omega)$ la densité de photons dans le domaine fréquentiel. Nous avons vu que l'expression temporelle de la densité de photons est le produit de convolution de trois termes. Or, la transformée de Fourier d'un produit de convolution est le produit des transformées de Fourier. La densité de photons en fréquentiel sera donc le produit de trois fonctions : la fonction de propagation à λ_x notée Φ_x , le terme de fluorescence et la fonction de propagation à λ_m notée Φ_m :

$$\begin{aligned}\Phi_{fluor}(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \omega) &= \int_V d\mathbf{r} \delta\Phi_{fl}(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \omega) \\ &= \int_V d\mathbf{r} \Phi_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \omega) \frac{\eta(\mathbf{r}) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r})}{1 + i\omega\tau} \Phi_m(\mathbf{r}, \mathbf{r}_d, \omega)\end{aligned}\quad (\text{Eq. 4-4})$$

où $1/(1 + i\omega\tau)$ est la transformée de Fourier du terme de déclin de fluorescence.

Nous pouvons expliciter cette expression en milieu infini, en prenant les expressions des fonctions de propagation exprimées sous la forme de leurs fonctions de Green (que nous avons introduites au chapitre 3 page 51). Adoptons également les notations suivantes pour alléger l'écriture : $r_{sr} = |\mathbf{r} - \mathbf{r}_s|$ et $r_{rd} = |\mathbf{r} - \mathbf{r}_d|$:

$$\Phi(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \omega) = \left(\frac{c}{4\pi}\right)^2 \int_V \frac{\exp(i k_x(\omega) r_{sr})}{D_x r_{sr}} \frac{\exp(i k_m(\omega) r_{rd})}{D_m r_{rd}} \frac{\eta(\mathbf{r}) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r})}{1 + i\omega\tau} d\mathbf{r} \quad (\text{Eq. 4-5})$$

avec :

$$\begin{aligned}k_x(\omega)^2 &= -\frac{\mu_{ax}}{D_x} - \frac{i\omega}{c D_x} \\ k_m(\omega)^2 &= -\frac{\mu_{am}}{D_m} - \frac{i\omega}{c D_m}\end{aligned}\quad (\text{Eq. 4-6})$$

4.1.2 Solution analytique simplifiée en milieu infini

Il est intéressant d'avoir une expression simple en temporel. Une telle expression a été publiée par Hall *et al* [51]. Nous nous proposons ici de préciser les étapes de calculs pour parvenir à l'expression publiée. Les auteurs font l'hypothèse du milieu infini. Cela donne la forme des fonctions de propagation utilisées. Ils supposent ensuite que les coefficients optiques sont les mêmes aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission, ce qui se traduit par $k_x = k_m = k$. Cette approximation sera assez réaliste pour les fantômes utilisés compte-tenu de la proximité des deux longueurs d'onde et des faibles variations du coefficient d'absorption de l'encre et du coefficient de diffusion réduit

de l'Intralipide. Avec ces hypothèses, nous pouvons réécrire l'équation (Eq. 4-5) en fréquentiel de la façon suivante, en mettant les termes constants dans un facteur de proportionnalité α :

$$\Phi(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \omega) = \alpha \int_V d\mathbf{r} \frac{\exp[i k(\omega) (r_{sr} + r_{rd})]}{r_{sr} r_{rd}} \frac{\eta(\mathbf{r}) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r})}{1 + i\omega\tau} \quad (\text{Eq. 4-7})$$

Pour revenir dans le domaine temporel, nous effectuons la transformée de Fourier inverse de cette expression. Elle est composée du produit :

- d'un premier terme que nous appelons « terme de diffusion » : $\frac{\exp[i k(\omega) (r_{sr} + r_{rd})]}{r_{sr} r_{rd}}$,
- d'un terme correspondant au déclin de fluorescence : $\frac{\eta(\mathbf{r}) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r})}{1 + i\omega\tau}$

Or, la transformée de Fourier inverse d'un produit de fonctions est égal au produit de convolution des transformées de Fourier inverses de ces fonctions. Nous connaissons la transformée de Fourier inverse du terme de fluorescence que nous avons vu à la section précédente. Pour le terme de diffusion, le résultat n'est pas immédiat, mais nous avons vu au début du chapitre 3 le lien entre une solution en temporel et la fonction de Green. Nous nous servons donc de la relation :

$$TF^{-1} \left[\frac{e^{ik(\omega)r}}{(4\pi D r)} \right] = (4\pi D c t)^{-3/2} e^{-\mu_a c t} \exp\left(-\frac{r^2}{4cDt}\right) \quad (\text{Eq. 4-8})$$

Ainsi, on peut calculer l'expression temporelle de la densité de photons de fluorescence en milieu infini :

$$\begin{aligned} \phi_{fluo}(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, t) &\propto \int_V d\mathbf{r} \int_0^t dt_e \frac{r_{sr} + r_{rd}}{r_{sr} r_{rd}} [4\pi D c (t - t_e)]^{-3/2} \eta(\mathbf{r}) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}) \\ &\times \exp[-\mu_a c (t - t_e)] \exp\left[-\frac{(r_{sr} + r_{rd})^2}{4cD(t - t_e)}\right] \frac{\exp(-t_e/\tau)}{\tau} \end{aligned} \quad (\text{Eq. 4-9})$$

Revenons au cas du fluorophore ponctuel que nous allons plus particulièrement traiter dans ce chapitre. Dans ce cas, il n'y a plus d'intégrale spatiale et le terme $\eta(\mathbf{r}) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r})$ est constant. Nous le faisons rentrer dans un nouveau coefficient constant que nous notons α . La densité de photons s'écrit donc sous la forme :

$$\begin{aligned} \phi_{fluo}(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, t) &= \alpha \int_0^t dt_e \frac{r_{sr} + r_{rd}}{r_{sr} r_{rd}} [4\pi D c (t - t_e)]^{-3/2} \\ &\times \exp[-\mu_a c (t - t_e)] \exp\left[-\frac{(r_{sr} + r_{rd})^2}{4cD(t - t_e)}\right] \frac{\exp(-t_e/\tau)}{\tau} \end{aligned} \quad (\text{Eq. 4-10})$$

Nous prendrons cette expression théorique pour simuler le signal de fluorescence en milieu infini (nous avons vu au chapitre 3 que le signal en milieu infini est proportionnel à la densité de photons).

Nous pouvons tracer cette fonction pour un fluorophore ponctuel, situé entre une source et un détecteur séparés de 1 cm. Prenons un temps de vie de 1 ns, un coefficient d'absorption de 0.05 cm^{-1} et un coefficient de diffusion réduit de 10 cm^{-1} . Tous les

autres coefficients multiplicatifs sont fixés à 1. La courbe est représentée en échelles linéaire et semi-logarithmique sur la figure 4.1, sur laquelle nous avons également superposé le signal qui serait mesuré à la longueur d'onde d'excitation. Les deux courbes sont normées à leur maximum, les intensités ne peuvent pas être comparées, ce sont ici les formes qui nous intéressent.

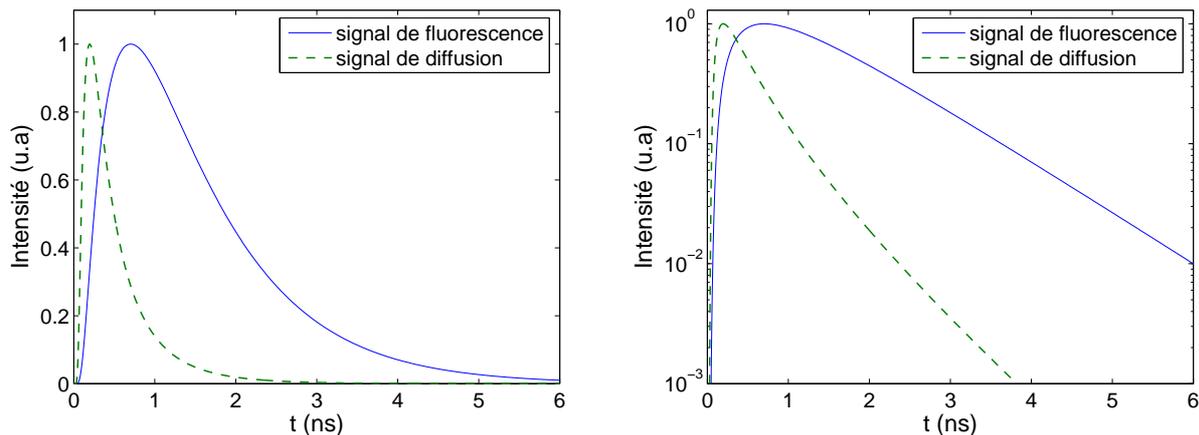


FIG. 4.1: *A gauche, signal de fluorescence, pour un fluorophore ponctuel placé entre la source et le détecteur espacés de 1 cm, calculé à partir de l'équation Eq. 4-10, dans un milieu infini. Le signal de diffusion à la longueur d'onde d'excitation est également superposé. A droite, mêmes courbes en échelle semi-logarithmique.*

En échelle semi-logarithmique, le signal de fluorescence apparaît presque linéaire aux temps longs. Cela est dû au terme en $\exp(-t/\tau)$. Il est intéressant de voir les temps mis en jeu. Le signal de fluorescence s'étend sur au moins 7 ns alors que le signal de diffusion à la longueur d'onde d'excitation ne s'étend que sur 2 à 3 ns. Nous allons voir maintenant deux paramètres que l'on peut extraire de cette courbe et qui seront utiles pour la caractériser.

4.2 Calcul des deux premiers moments

L'objectif du modèle direct est de fournir des données qui peuvent être comparées avec les mesures pour retrouver la distribution spatiale de fluorophores lors de la résolution du problème inverse. L'ensemble du profil temporel de la densité de photons pourrait être comparée à la TPSF mesurée. Cependant, à chaque instant, la densité de photons est donnée sous forme d'une intégrale temporelle dont le temps de calcul serait important à chaque étape du processus d'inversion. C'est pourquoi d'autres variables peuvent être extraites des TPSFs. Elles ont été plus particulièrement étudiées pour la tomographie optique diffuse et ont été transposées aux profils temporels de fluorescence. La liste de ces variables est vaste : elle comprend par exemple l'intensité totale, les différents moments et les transformées de Mellin-Laplace. L'utilisation de ces

variables permet d'extraire les caractéristiques principales des données temporelles et de diminuer le temps de calcul.

De façon générale, ces variables doivent répondre à certains critères [109] :

- être facilement mesurables à partir des profils temporels, robustes au bruit et aux éventuelles variations de puissance de source et au couplage source-détecteur avec le milieu,
- être calculables par le modèle direct,
- contenir un maximum d'informations.

Nous avons choisi d'étudier les deux premiers moments dans la continuité de certaines études de la littérature [1]. Les deux premiers moments sont normés à l'intensité totale, ils remplissent donc bien le critère d'indépendance de couplage vis-à-vis de la source ou de la détection. Dans la suite de ce chapitre, nous allons détailler comment ils peuvent être mesurés à partir de données expérimentales. Quant au second critère, leurs expressions analytiques publiées en milieu infini seront explicitées puis nous établirons ces expressions dans le cas d'un milieu semi-infini. Le troisième critère concernant le contenu informationnel ou leur pertinence vis-à-vis d'autres transformées ne sera pas directement traité dans cette thèse.

Dans cette section, nous rapportons des généralités sur les moments en donnant des définitions et des propriétés intéressantes. Ensuite, nous donnons les expressions des deux premiers moments en milieu infini.

4.2.1 Généralités sur les moments

Les moments normés d'ordre $k \geq 1$ d'une distribution $g(t)$ sont définis par :

$$m_k = \int_{-\infty}^{\infty} t^k g(t) dt / \int_{-\infty}^{\infty} g(t) dt \quad (\text{Eq. 4-11})$$

Le moment d'ordre zéro m_0 est l'intégrale du signal sur la plage temporelle. C'est aussi la composante à fréquence nulle de $G(\omega)$, la transformée de Fourier de $g(t)$:

$$m_0 = \int_{-\infty}^{\infty} g(t) dt = G(\omega = 0) \quad (\text{Eq. 4-12})$$

Le premier moment m_1 représente le temps moyen $\langle t \rangle$. Par définition,

$$\langle t \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} t g(t) dt / \int_{-\infty}^{\infty} g(t) dt \quad (\text{Eq. 4-13})$$

Une possibilité pour effectuer le calcul du temps moyen est d'utiliser $G(\omega)$, ainsi que sa dérivée :

$$G(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} g(t) e^{-i\omega t} dt \quad (\text{Eq. 4-14})$$

$$\frac{\partial G(\omega)}{\partial \omega} = \frac{-i}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} t g(t) e^{-i\omega t} dt \quad (\text{Eq. 4-15})$$

On peut alors exprimer le temps moyen en fonction du rapport de ces deux quantités :

$$\boxed{\langle t \rangle = i \frac{\partial G(\omega)}{\partial \omega} \Big|_{\omega=0} \times 1/G(\omega) \Big|_{\omega=0}} \quad (\text{Eq. 4-16})$$

La variance, qui représente le second moment centré, est définie par :

$$V = \langle (t - \langle t \rangle)^2 \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} (t - \langle t \rangle)^2 g(t) dt / \int_{-\infty}^{\infty} g(t) dt \quad (\text{Eq. 4-17})$$

On peut montrer que $V = m_2 - m_1^2$. De façon analogue à précédemment pour le temps moyen, la transformée de Fourier de $g(t)$ peut être utilisée pour écrire :

$$\frac{\partial^2 G(\omega)}{\partial \omega^2} = \frac{-1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} t^2 g(t) e^{-i\omega t} dt \quad (\text{Eq. 4-18})$$

Ainsi,

$$\boxed{m_2 = -\frac{\partial^2 G(\omega)}{\partial \omega^2} \Big|_{\omega=0} \times 1/G(\omega) \Big|_{\omega=0}} \quad (\text{Eq. 4-19})$$

et on obtient l'expression de la variance,

$$\boxed{V = -\frac{\partial^2 G(\omega)}{\partial \omega^2} \Big|_{\omega=0} \times 1/G(\omega) \Big|_{\omega=0} + \left[\frac{\partial G(\omega)}{\partial \omega} \Big|_{\omega=0} \times 1/G(\omega) \Big|_{\omega=0} \right]^2} \quad (\text{Eq. 4-20})$$

Propriétés intéressantes des moments Nous rappelons ici quelques propriétés intéressantes du temps moyen et de la variance. Ces propriétés sont démontrées en annexe D.

- Le temps moyen d'un produit de convolution est égal à la somme des temps moyens des signaux convolués.
- Le temps moyen de la somme de deux signaux n'est pas égal à la somme des temps moyens des deux signaux.
- Les temps moyens de deux signaux proportionnels sont égaux. Ceci est aussi valable pour la variance.

4.2.2 Expressions analytiques en milieu infini

Des expressions analytiques du temps moyen et de la variance ont été publiées pour la première fois par Lam *et al* dans la référence [1]. Ces expressions étaient données directement pour une distribution spatiale quelconque de fluorophores et pour un signal de fluorescence normé par le signal à la longueur d'onde d'excitation. Nous détaillerons ce cas au chapitre suivant. Ici, l'objectif est de donner notre démarche de calcul pour présenter les expressions analytiques dans le cas simple d'un fluorophore ponctuel.

Temps moyen Nous cherchons à calculer le premier moment du signal de fluorescence d'un fluorophore situé en \mathbf{r} dans un milieu infini. Pour le calcul, il est pratique d'utiliser la forme fréquentielle de la densité de photons (Eq. 4-5)) que nous rappelons ici, pour un fluorophore ponctuel :

$$\Phi(r_{sr}, r_{rd}, \omega) = \alpha \frac{e^{i k_x(\omega) r_{sr}} e^{i k_m(\omega) r_{rd}}}{r_{sr} r_{rd}} \frac{\eta(\mathbf{r})}{1 + i\omega\tau} \quad (\text{Eq. 4-21})$$

La densité de photons est le produit de trois termes :

- un terme de propagation qui est la fonction de Green en milieu infini, à la longueur d'onde λ_x , entre la source et l'inclusion,
- un second terme de propagation qui est la fonction de Green en milieu infini, à la longueur d'onde λ_m , entre l'inclusion et le détecteur,
- le dernier terme correspond au déclin de fluorescence.

Or, le temps moyen d'une fonction s'exprimant dans l'espace de Fourier sous forme d'un produit de fonctions est égal à la somme des temps moyens de ces fonctions (voir annexe D, Eq. D-13). Le temps moyen, que nous notons $\langle t \rangle_\infty$, sera la somme de trois temps moyens :

$$\langle t \rangle_\infty = \langle t \rangle_x + \langle t \rangle_m + \langle t \rangle_{\text{déclin fluo}} \quad (\text{Eq. 4-22})$$

où $\langle t \rangle_x$ est le temps moyen du terme de propagation de la source à l'inclusion, $\langle t \rangle_m$ est le temps moyen du terme de propagation de l'inclusion au détecteur, et $\langle t \rangle_{\text{déclin fluo}}$ est le temps moyen du déclin de fluorescence. Le temps moyen et la variance des fonctions de Green en milieu infini ont été publiés par Arridge *et al* [31] et Ebert *et al* [110]. La section D.2 de l'annexe D détaille le calcul du temps moyen pour ce terme dont le résultat est :

$$\langle t \rangle [G] = \frac{r}{2 c \sqrt{\mu_a D}} \quad (\text{Eq. 4-23})$$

Nous vérifions ensuite grâce à la formule (Eq. 4-16) que le temps moyen correspondant au terme de déclin de fluorescence $\frac{1}{1+i\omega\tau}$ est τ . Au final, nous obtenons le temps moyen de la densité de photons en milieu infini :

$$\langle t \rangle_\infty = \frac{r_{sr}}{2 c \sqrt{\mu_{ax} D_x}} + \frac{r_{rd}}{2 c \sqrt{\mu_{am} D_m}} + \tau \quad (\text{Eq. 4-24})$$

Cette expression peut être simplifiée en faisant l'hypothèse que les coefficients optiques sont les mêmes à la longueur d'onde d'excitation et à la longueur d'onde d'émission. Le temps moyen correspondant est de la forme :

$$\langle t \rangle_\infty = \frac{r_{sr} + r_{rd}}{2 c \sqrt{\mu_a D}} + \tau \quad (\text{Eq. 4-25})$$

Remarque : cette expression peut aussi être obtenue à partir de l'équation (Eq. 4-10) en temporel. Le calcul se fait comme précédemment à partir de l'expression fréquentielle (Eq. 4-7).

Variance Le calcul de la variance se fait de façon analogue à celui du temps moyen en utilisant la formule pour la variance (Eq. 4-20). La section D.2 de l'annexe D détaille le calcul de la variance pour le terme en e^{ikr}/r :

$$V[G] = \frac{r}{2c^2 \sqrt{\mu_a^3 D}} \quad (\text{Eq. 4-26})$$

Calculons ensuite la variance du terme de déclin de fluorescence grâce à la formule (Eq. 4-20). Celle-ci est égale à τ^2 . Finalement, la variance de la densité de photons en milieu infini est égale à la somme des trois termes :

$$V_\infty = \frac{r_{sr}}{2c^2 \sqrt{\mu_{ax}^3 D_x}} + \frac{r_{rd}}{2c^2 \sqrt{\mu_{am}^3 D_m}} + \tau^2 \quad (\text{Eq. 4-27})$$

Si on se place dans l'hypothèse d'égalité des coefficients optiques aux deux longueurs d'onde, la variance est de la forme :

$$\boxed{V_\infty = \frac{r_{sr} + r_{rd}}{2c^2 \sqrt{\mu_a^3 D}} + \tau^2} \quad (\text{Eq. 4-28})$$

4.2.3 Ordres de grandeur

En reprenant l'exemple de la figure 4.1, nous pouvons donner des ordres de grandeur des deux moments. Sur la figure 4.2, le temps moyen du signal de diffusion à la longueur d'onde d'excitation, noté $\langle t \rangle_{diffusion}$ et celui du signal de fluorescence, noté $\langle t \rangle_{fluo}$, sont représentés. Dans ce cas particulier, l'inclusion fluorescente est placée entre la source et le détecteur, nous avons $r_{sr} + r_{rd} = r$, c'est-à-dire que le chemin entre la source et l'inclusion puis de l'inclusion au détecteur, est égale au chemin entre la source et le détecteur. Ceci donne $\langle t \rangle_{fluo} = \langle t \rangle_{diffusion} + \tau$. Les valeurs numériques sont $\langle t \rangle_{diffusion} = 0.54$ ns et $\langle t \rangle_{fluo} = 1.54$ ns. Sur des distances de l'ordre du cm, et avec un temps de vie de l'ordre de 1 ns, le temps moyen dû au déclin de fluorescence est le double de celui dû à la diffusion.

Pour les variances, on a $V_{diffusion} = 0.24$ ns² et $V_{fluo} = 1.24$ ns².

4.2.4 Choix de la géométrie de mesure

De façon schématique, on peut diviser les types de mesures sur un objet plan en deux catégories (figure 4.3) :

- les mesures en réflexion
- les mesures en transmission.

L'expression théorique du paramètre que l'on extrait de la TPSF révèle sa sensibilité spatiale. Considérons l'expression du temps moyen en milieu infini, avec une source et un détecteur espacés d'une distance r_{sd} . Si nous traçons la valeur du paramètre en chaque point de l'objet, nous obtenons la carte donnée par la figure 4.4. Elle relie les points \mathbf{r} tels que la distance $r_{sd} + r_{sd}$ est constante. Même si le modèle infini est très simple et que nous ne considérons qu'un seul fluorophore, cette carte révèle que les mesures

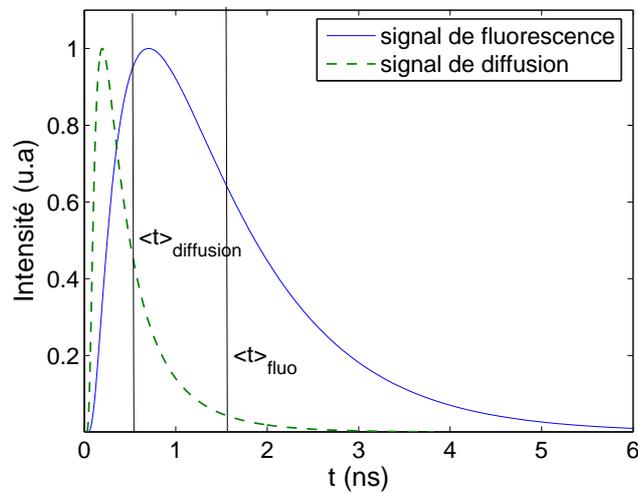


FIG. 4.2: Représentation des temps moyens du signal de fluorescence et du signal de diffusion à la longueur d'onde d'excitation, pour les conditions simulées de la figure 4.1.

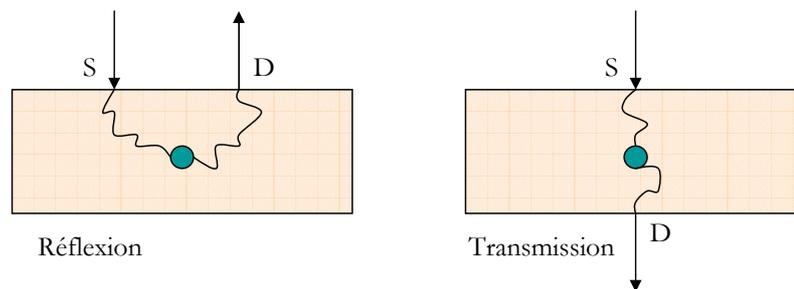


FIG. 4.3: Schéma des mesures de fluorescence en réflexion et en transmission.

en « réflexion » sont plus sensibles à la profondeur que celles en « transmission ». Ces dernières réalisées de part et d'autre d'une inclusion fluorescence ne sont pas sensibles à sa position transverse dans ce modèle simplifié. Elles le seront un peu plus dans un modèle qui tient compte de la différence des propriétés optiques aux deux longueurs d'onde. Ce ne sera pas notre cas car les propriétés optiques des fantômes utilisés sont assez proches aux deux longueurs d'onde. Ces considérations nous ont fait choisir des mesures « en réflexion » pour la suite de cette étude.

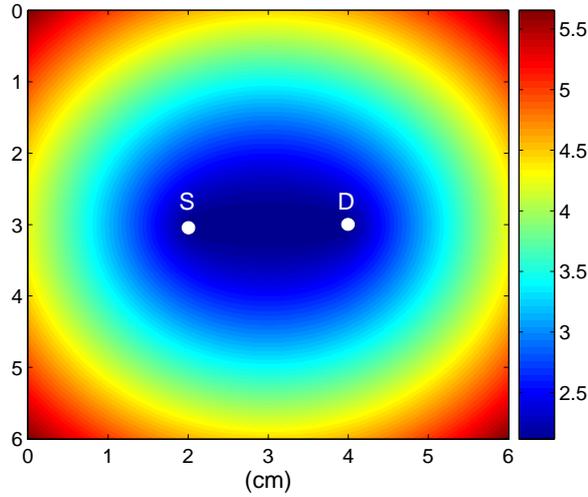


FIG. 4.4: Représentation du temps moyen (en ns) du signal de fluorescence pour une source (S) et un détecteur (D) séparés d'une distance $r_{sd}=2$ cm en milieu infini.

4.3 Établissement des expressions analytiques en milieu semi-infini

Il n'existe pas à notre connaissance de formule analytique publiée donnant le temps moyen ou la variance pour une inclusion fluorescente dans un milieu semi-infini pour des conditions aux limites *ebc*. Nous nous proposons d'adopter la même démarche qu'en milieu infini en raisonnant sur la densité de photons de fluorescence pour calculer les expressions analytiques des deux premiers moments. Pour cela, nous supposons que le signal mesuré est proportionnel en surface à la densité de photons, ce qui a été vérifié au chapitre 3.

4.3.1 Calcul du temps moyen

Nous cherchons donc maintenant à exprimer la densité de photons de fluorescence Φ_{fluo} en milieu semi-infini :

$$\Phi_{fluo}^{1/2\infty}(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \omega) = \Phi_x^{1/2\infty}(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}, \omega) \frac{1}{1 + i\omega\tau} \Phi_m^{1/2\infty}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_d, \omega) \quad (\text{Eq. 4-29})$$

où nous notons $\mathbf{r}_s = (x_s, y_s, z_s = 0)$ la position de la source, $\mathbf{r}_d = (x_d, y_d, z_d = 0)$ la position du détecteur, et $\mathbf{r} = (x, y, z)$ la position de l'inclusion fluorescente. Nous avons besoin tout d'abord de l'expression $\Phi_x^{1/2\infty}$ en milieu semi-infini pour en déduire son temps moyen. Nous avons le choix entre les conditions aux limites *zbc* ou *ebc*. Nous choisissons de nous placer en *ebc*. De plus, pour $\Phi_m^{1/2\infty}$, nous serons obligés de choisir la condition *ebc* pour ne pas avoir une densité de photons nulle à la surface. A partir son expression dans le domaine temporel avec les conditions *ebc*, vue à la section 3.1.3.3,

nous pouvons donner la forme de la densité de photons $\Phi_x^{1/2\infty}$

$$\Phi_x^{1/2\infty}(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}, \omega) = \frac{1}{4\pi cD} \left[\frac{e^{ik(\omega)(\xi^2 + (z-z_0)^2)^{1/2}}}{(\xi^2 + (z-z_0)^2)^{1/2}} - \frac{e^{ik(\omega)(\xi^2 + (z+z_0+2z_B)^2)^{1/2}}}{(\xi^2 + (z+z_0+2z_B)^2)^{1/2}} \right] \quad (\text{Eq. 4-30})$$

Notons $r_1 = (\xi^2 + (z-z_0)^2)^{1/2}$, la distance à la source positive et $r_2 = (\xi^2 + (z+z_0+2z_B)^2)^{1/2}$, la distance à la source virtuelle négative. Ces notations sont précisées sur la figure (4.5).

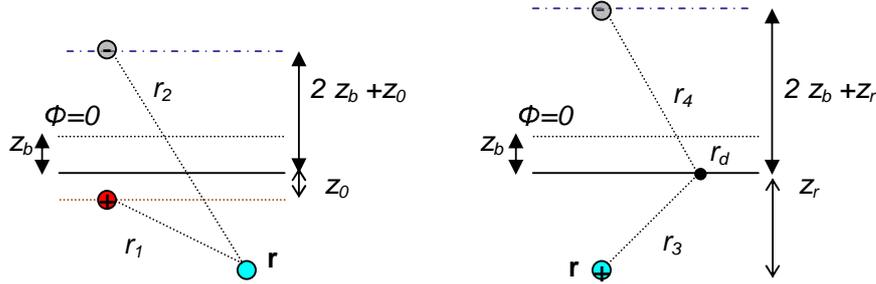


FIG. 4.5: Schéma des configurations des sources pour le calcul des différents temps moyens.

En utilisant la formule (Eq. 4-16), nous dérivons $\Phi_x^{1/2\infty}$ par rapport à ω pour obtenir l'expression suivante du temps moyen :

$$\langle t \rangle_x = \frac{1}{2c\sqrt{\mu_a D}} \times \frac{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_1} - e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_2}}{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_1} - e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_2}} \quad (\text{Eq. 4-31})$$

Procédons désormais de même pour $\Phi_m^{1/2\infty}$, toujours en conditions *ebc*. L'inclusion fluorescente joue cette fois le rôle de source et aura donc une source virtuelle négative placée en $z + 2z_B$ qui intervient dans le second terme de $\Phi_m^{1/2\infty}$:

$$\Phi_m^{1/2\infty}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_d, \omega) = \frac{1}{4\pi cD} \left[\frac{e^{ik(\omega)(\xi'^2 + (z_d - z)^2)^{1/2}}}{(\xi'^2 + (z_d - z)^2)^{1/2}} - \frac{e^{ik(\omega)(\xi'^2 + (z_d + z_r + 2z_B)^2)^{1/2}}}{(\xi'^2 + (z_d + z_r + 2z_B)^2)^{1/2}} \right] \quad (\text{Eq. 4-32})$$

avec $\xi' = ((x_d - x)^2 + (y_d - y)^2)^{1/2}$. Notons $r_3 = (\xi'^2 + (z_d - z)^2)^{1/2}$, la distance à la source fluorescente et $r_4 = (\xi'^2 + (z_d + z_r + 2z_B)^2)^{1/2}$, la distance à la source fluorescente virtuelle négative. Comme précédemment, on obtient l'expression du temps moyen :

$$\langle t \rangle_m = \frac{1}{2c\sqrt{\mu_a D}} \times \frac{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_3} - e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_4}}{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_3} - e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_4}} \quad (\text{Eq. 4-33})$$

et finalement :

$$\langle t \rangle_{1/2\infty}^\phi = \langle t \rangle_x + \langle t \rangle_m + \tau \quad (\text{Eq. 4-34})$$

Traçons sur un même graphique (figure 4.6) les différents temps moyens en milieu infini et en milieu semi-infini. Nous avons pris un temps de vie nul pour pouvoir mieux comparer les différents temps moyens sur le graphique. Le temps de vie ajouterait un décalage sur $\langle t \rangle_{1/2\infty}^\phi$ et $\langle t \rangle_\infty^\phi$. Le temps de moyen en milieu semi-infini est plus faible que celui en milieu infini car les photons peuvent explorer moins de chemins. On constate également que $\langle t \rangle_x$ et $\langle t \rangle_m$ ont pratiquement les mêmes valeurs. Cela est dû aux deux géométries représentées sur la figure 4.5 qui sont pratiquement symétriques, à z_0 près pour la position de la source isotrope sous la surface.

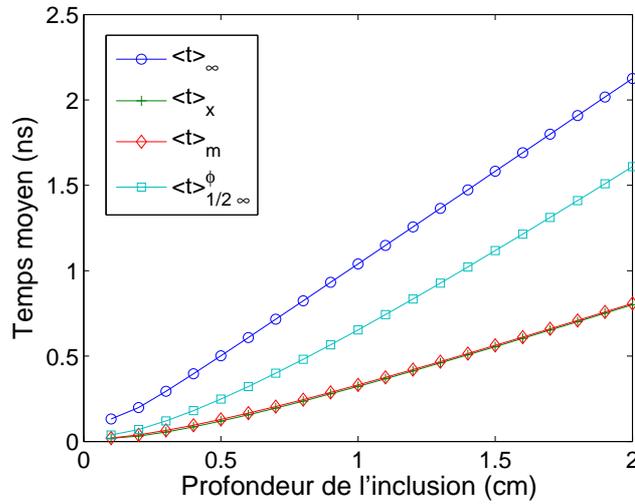


FIG. 4.6: Comparaison des formules donnant le temps moyen en fluorescence pour un milieu infini et un milieu semi-infini. La source et le détecteur sont séparés de 2 mm, les temps moyens sont tracés en fonction de la profondeur d'une inclusion située au-dessous. Nous avons pris un temps de vie de fluorescence égal à zéro.

4.3.2 Calcul de la variance

Nous reprenons les densités de photons $\Phi_x^{1/2\infty}$ et $\Phi_m^{1/2\infty}$ vues à la section précédente et nous calculons leur variance grâce à la formule (Eq. 4-20), en dérivant une seconde fois les densités de photons par rapport à ω . Nous donnons directement les résultats des calculs :

$$V_x = \frac{1}{(2c)^2 D \mu_a} \frac{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_1} \left(r_1 + \sqrt{\frac{D}{\mu_a}} \right) - e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_2} \left(r_2 + \sqrt{\frac{D}{\mu_a}} \right)}{\frac{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_1}}{r_1} - \frac{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_2}}{r_2}} \quad (\text{Eq. 4-35})$$

$$- \left[\frac{1}{2c\sqrt{\mu_a D}} \times \frac{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_1} - e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_2}}{\frac{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_1}}{r_1} - \frac{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_2}}{r_2}} \right]^2$$

$$\begin{aligned}
V_m = & \frac{1}{(2c)^2 D \mu_a} \frac{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_3} \left(r_3 + \sqrt{\frac{D}{\mu_a}} \right) - e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_4} \left(r_4 + \sqrt{\frac{D}{\mu_a}} \right)}{\frac{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_3}}{r_3} - \frac{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_4}}{r_4}} \quad (\text{Eq. 4-36}) \\
& - \left[\frac{1}{2c\sqrt{\mu_a D}} \times \frac{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_3} - e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_4}}{\frac{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_3}}{r_3} - \frac{e^{-\sqrt{\frac{\mu_a}{D}} r_4}}{r_4}} \right]^2
\end{aligned}$$

où nous avons gardé les mêmes définitions que dans la section précédente pour les distances r_1 , r_2 , r_3 et r_4 . La variance de la fonction de fluorescence est la somme des trois termes de variance :

$$V_{1/2\infty}^\phi = V_x + V_m + \tau^2 \quad (\text{Eq. 4-37})$$

4.3.3 Comparaison

La littérature donne des expressions du temps moyen et de la variance pour un signal de diffusion, pour des mesures en surface, avec des conditions aux limites zbc . Ces expressions sont calculées à partir du flux \mathbf{j} en surface [31, 110] :

$$\langle t \rangle_{1/2\infty}^j = \frac{r}{2c \left[\sqrt{\mu_a D} + \frac{D}{r} \right]} \quad (\text{Eq. 4-38})$$

$$V_{1/2\infty}^j = \frac{r}{4c^2 \sqrt{\mu_a^3 D} \left[1 + \frac{\sqrt{D}}{r\sqrt{\mu_a}} \right]^2} \quad (\text{Eq. 4-39})$$

Ces expressions ne convenaient pas pour traiter le problème car nous avons raisonné sur les densités de photons.

Nous pouvons cependant comparer ces expressions publiées dans la littérature avec les expressions de $\langle t \rangle_x$ et de V_x que nous avons dérivées. Les formules sont comparées pour différentes distances source-détecteur en surface. L'inclusion fluorescente est placée à la surface et joue le rôle de détecteur pour $\langle t \rangle_x$ et V_x . On observe sur la figure 4.7 que les deux temps moyens sont du même ordre de grandeur. La différence est plus marquée pour les courtes distances puis tend vers zéro. Le comportement est le même pour la variance (figure 4.8). Cela s'explique par les différences de conditions aux limites et par les deux méthodes de calcul, à partir du flux et à partir de la densité de photons.

Ces observations confirment la validité des expressions que nous avons dérivées.

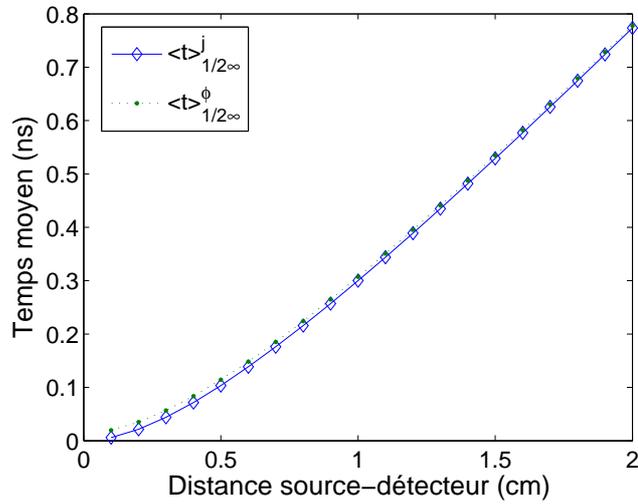


FIG. 4.7: Comparaison des formules donnant le temps moyen pour des mesures en surface, calculé à partir du flux (j) avec les conditions zbc ou de la densité de photons (Φ) avec les conditions ebc , en fonction de la distance source-détecteur.

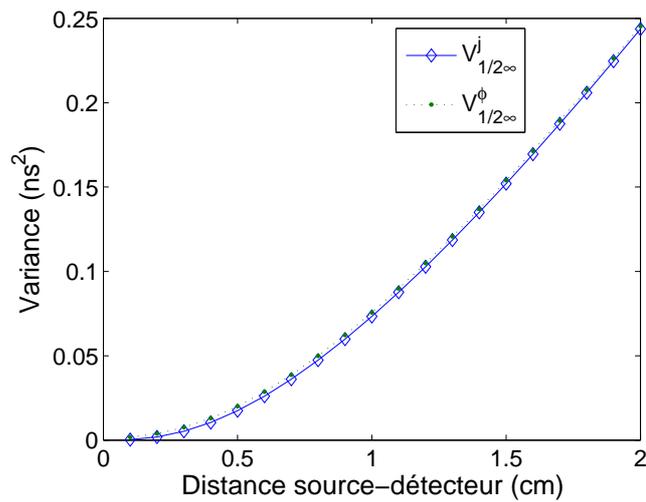


FIG. 4.8: Comparaison des formules donnant la variance pour des mesures en surface, calculé à partir du flux (j) avec les conditions zbc ou de la densité de photons (Φ) avec les conditions ebc , en fonction de la distance source-détecteur.

4.4 Validation expérimentale du modèle direct en milieu infini

4.4.1 Système et géométrie de mesure

Pour réaliser une inclusion fluorescente dans le fantôme liquide, nous avons utilisé un petit tube de verre appelé capillaire, dans lequel on dépose un volume de $1 \mu\text{L}$ de fluorophore. Nous plaçons le tube dans une centrifugeuse pour amener le volume de fluorophore à son extrémité. Les forces de tension superficielles le maintiennent en place à cause du faible diamètre du tube. Le fond d'un récipient cylindrique est percé de façon à laisser passer le tube. L'ensemble est positionné sur un support fixe. Le montage est représenté sur la figure 4.9.

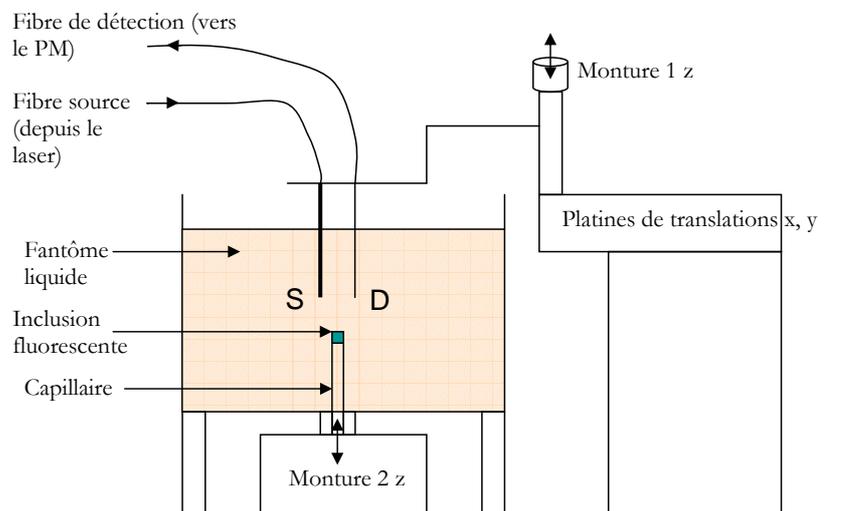


FIG. 4.9: Montage expérimental pour les mesures en milieu infini. La monture 1 permet de faire varier la distance entre les fibres et l'inclusion (voir la photo figure 2.6). La monture 2 et les platines de translation seront utilisées pour les mesures en surface et pour les mesures en balayage.

Nous avons choisi dans un premier temps une géométrie de mesure simple, où les fibres sont séparées de 0.2 cm et sont placées à 2.5 cm sous la surface. Nous avons vu au chapitre 3 lors des mesures en profondeur que cette distance permettait de considérer des conditions de milieu infini. L'inclusion fluorescente est placée au-dessous des fibres. Pour ce premier type de mesures, nous ne nous servons que de la monture 1. Un vernier permet de translater le support selon la verticale et d'augmenter ainsi la distance entre les fibres et l'inclusion. Lorsque cette distance augmente, un volume de fantôme liquide est ajouté pour maintenir une épaisseur de liquide constante au-dessus des fibres.

Cette géométrie est illustrée sur la figure 4.10. La position de référence a été fixée lorsque le capillaire était en contact avec l'inclusion. A cause de l'épaisseur du verre, le centre de l'inclusion était environ à $400 \mu\text{m}$ au-dessous des fibres.

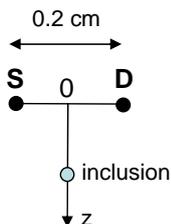


FIG. 4.10: Illustration de la géométrie de mesure lorsque les fibres sont placées au-dessus de l'inclusion.

4.4.2 Signaux temporels

Les propriétés optiques du fantôme utilisé sont données dans le tableau 4-I. Les mesures sont effectuées sur le fantôme avant de mettre l'inclusion, avec les fibres plongées en profondeur dans le fantôme pour utiliser des conditions aux limites de milieu infini et s'affranchir des erreurs dues à la surface et décrites au chapitre 3.

μ_a	μ'_s
0.053 cm^{-1}	11.82 cm^{-1}

TAB. 4-I: Propriétés optiques du fantôme utilisé.

Une série de mesures a été réalisée pour différentes profondeurs de l'inclusion au-dessous des fibres : $z = 0.24, 0.34, 0.44, 0.54, 0.64, \text{ et } 0.74 \text{ cm}$. Une mesure sur le milieu seul sans l'inclusion fluorescente et avec les mêmes positions des fibres a également été effectuée pour le prétraitement des données. Cette étape a été expliquée au chapitre 2 (section 2.5). Cette mesure que nous avons appelée « mesure résiduelle » est soustraite aux mesures de fluorescence, puis un filtre médian d'ordre 5 est appliqué au résultat, de façon à obtenir un signal corrigé.

La figure 4.11 représente les signaux de fluorescence pour la série de mesures. Les amplitudes sont représentées de façon arbitraire car la puissance du laser d'excitation n'était pas toujours la même. La puissance était optimisée pour obtenir le meilleur rapport signal sur bruit tout en respectant les limitations du photomultiplicateur. La représentation des amplitudes respecte cependant les variations que l'on obtiendrait si la puissance d'entrée était la même. Elle montre une diminution de l'amplitude du signal de fluorescence détecté, ce que l'on constate lorsque la profondeur de l'inclusion augmente. Les photons ont plus de trajets à parcourir et sont d'autant plus absorbés. De plus, on observe que le temps moyen des courbes se décale vers les temps longs car les photons peuvent explorer des chemins de plus en plus longs avant d'atteindre le détecteur.

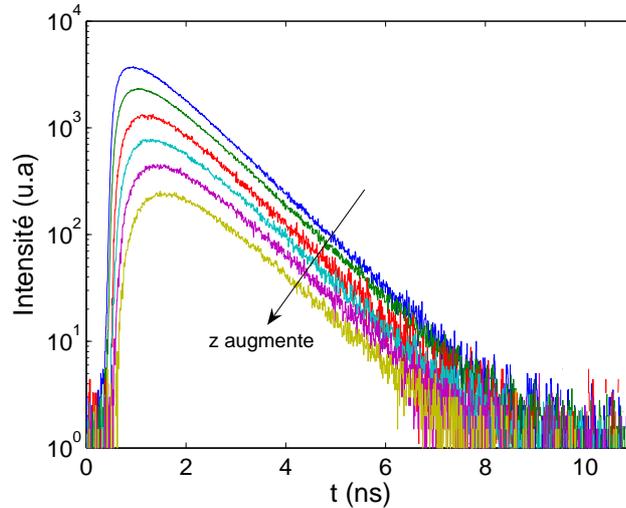


FIG. 4.11: Signaux temporels (corrigés du signal résiduel) pour différentes positions de l'inclusion au-dessous des fibres, de 0.24 cm à 0.74 cm par pas de 0.1 cm.

4.4.3 Comparaison des TPSFs expérimentales avec leur expression théorique en milieu infini

Pour interpréter les courbes, nous commençons par les comparer avec l'expression théorique du signal en milieu infini (Eq. 4-10) que nous convoluons par la réponse de l'instrument. Pour cela, nous utilisons les valeurs des coefficients optiques et du temps de vie ($\tau = 1.02$ ns) mesurés. La comparaison est faite sur la figure 4.12 pour la profondeur $z = 0.74$ cm et les positions de source et détecteur $r_s = [-0.100]$ et $r_d = [0.100]$. Nous avons également représenté la simulation pour $\tau = 0.96$ ns. Cette valeur entre dans l'incertitude de mesure sur le temps de vie et nous la retrouverons par la suite. La courbe expérimentale est lissée pour voir la différence entre les deux simulations. L'accord est très bon entre les deux simulations et la courbe expérimentale, il semble légèrement meilleur pour $\tau = 0.96$ ns. Nous allons garder cette valeur pour les autres simulations.

Si nous plaçons la source à une distance $1/\mu'_s$ de l'extrémité de la fibre comme il est classiquement admis de le faire, la simulation est légèrement décalée comme on le voit sur la figure 4.13. Il est assez subjectif de dire si l'une ou l'autre des simulations est plus adaptée aux mesures. Nous reviendrons sur ce point au chapitre suivant.

Les simulations pour les autres profondeurs sont également en très bon accord avec les simulations comme on peut le voir sur la figure (4.14). Après ces constatations, nous concluons que les mesures en milieu infini sont bien conformes au modèle. Nous allons à présent extraire des paramètres caractéristiques de ces courbes.

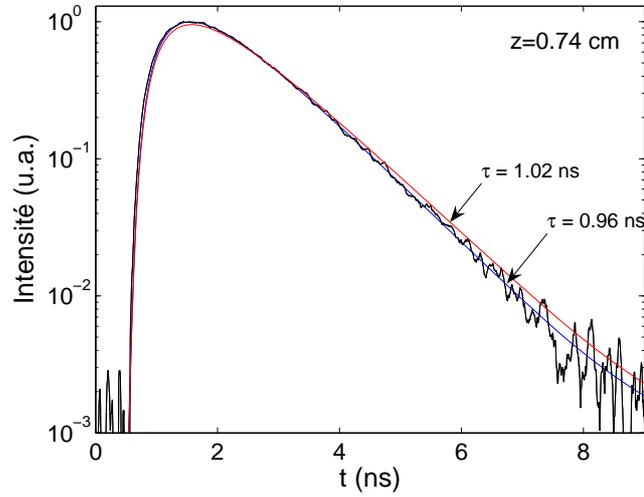


FIG. 4.12: Comparaison entre le signal de fluorescence mesuré pour $z = 0.74$ cm et deux simulations avec des temps de vie différents. Les simulations sont calculées avec l'équation (Eq. 4-10) convoluée avec l'IRF, pour des sources et détecteurs placés en $r_s = (-0.1, 0, 0)$ et $r_d = (0.1, 0, 0)$.

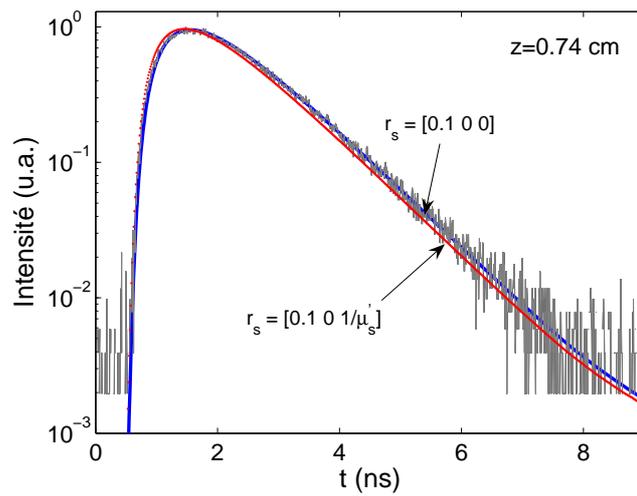


FIG. 4.13: Comparaison entre le signal de fluorescence mesuré pour $z = 0.74$ cm et deux simulations pour des positions de sources différentes placées en $r_s = (-0.1, 0, 0)$ et $r_s = (-0.1, 0, 1/\mu'_s)$.

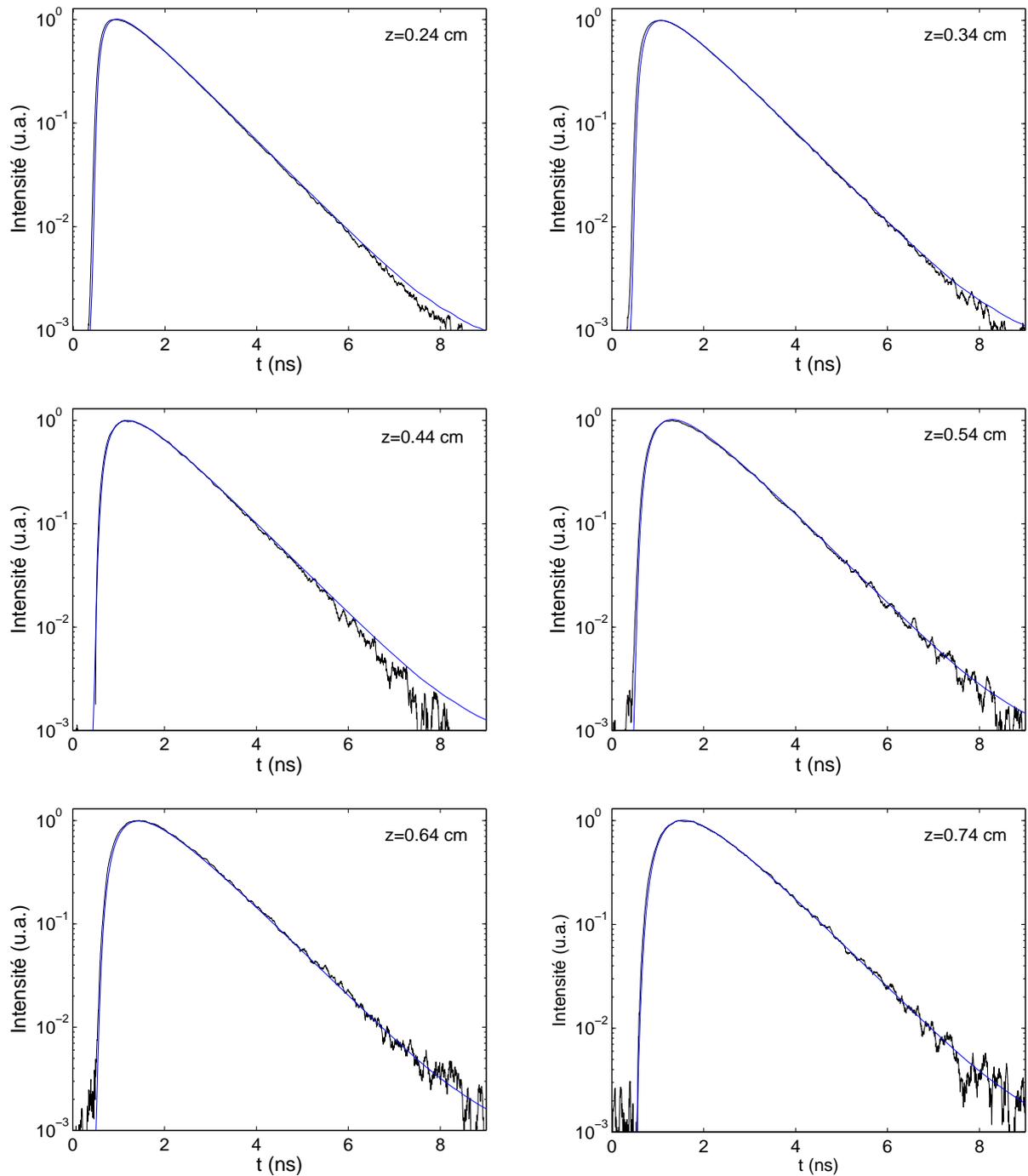


FIG. 4.14: Comparaison entre les mesures et les simulations correspondantes ($\tau=0.96$ ns), calculées avec l'équation (Eq. 4-10) convoluée avec l'IRF.

4.4.4 Calcul du temps d'amplitude maximale

Avant de passer au calcul des moments, nous souhaitons aborder un autre paramètre que l'on peut extraire des courbes de fluorescence. Il s'agit du temps correspondant au maximum d'amplitude de la courbe de fluorescence, que nous avons cité au chapitre 1 en référence à l'article [51]. Nous avons déterminé ce temps à partir de la série de signaux par une recherche directe du maximum et nous l'avons tracé en fonction de la profondeur de l'inclusion (figure 4.15). La relation est bien linéaire comme annoncé dans la référence, avec une pente de 1.08 (ns/cm), ce qui représente un écart de 15 % avec la valeur théorique [72]. Cependant, ce paramètre n'est pas très robuste car les courbes de fluorescence sont assez plates sur leur sommet, ce qui conduit à une incertitude sur la détermination du maximum. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler sur les moments dans la suite de ce travail.

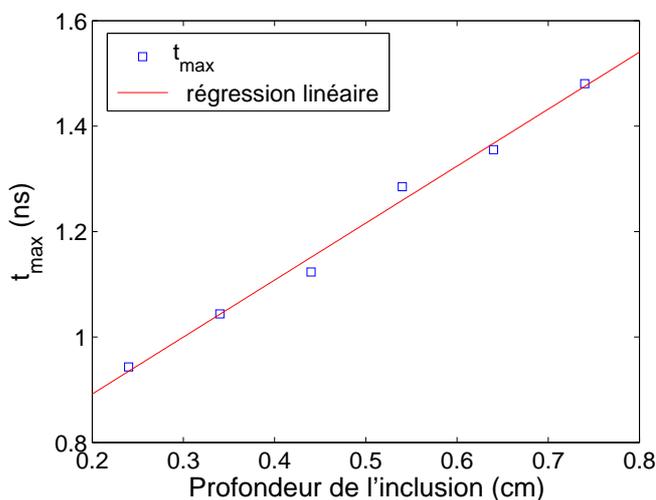


FIG. 4.15: Temps correspondant au maximum d'amplitude des signaux de fluorescence pour différentes profondeurs de l'inclusion au-dessous des fibres, de 0.24 cm à 0.74 cm par pas de 0.1 cm.

4.4.5 Mesures des moments en milieu infini pour différentes positions de l'inclusion sous les fibres

4.4.5.1 Calcul des moments à partir des mesures

Avant de détailler chacune d'entre elles, nous citons ici les étapes effectuées sur les mesures. Elles permettent d'obtenir le temps moyen que l'on peut comparer à la formule (Eq. 4-42). Ces étapes découlent en partie de la description du signal de la section 2.5.

1. prétraitement des données : le signal résiduel est soustrait aux mesures pour obtenir la variable *signal*.

2. calcul du moment sur un intervalle de temps $[t_1 ; t_2]$, que nous préciserons ci-dessous.
3. prise en compte de la réponse de l'instrument.

Intervalle de temps Le calcul des moments est sensible au choix de l'intervalle de temps sur lequel ils sont calculés [110]. Le fait de travailler sur un intervalle fini apporte un écart à l'estimation du moment, écart que nous minimisons par un choix adéquat. Le signal résiduel a déjà été soustrait de façon à s'affranchir du niveau de fond et du signal d'excitation. Pour garder cependant un rapport signal sur bruit correct, nous avons choisi des valeurs limites d'intervalle définies par 1 % du temps correspondant à l'amplitude maximum du signal. Ces bornes sont calculées sur un signal lissé pour ne pas être gêné par le bruit du signal.

Prise en compte de l'IRF Pour comparer le temps moyen ou la variance du *signal* à son expression théorique, il faut tenir compte de la réponse de l'instrument. Les moments offrent l'avantage que l'IRF peut être prise en compte facilement. Nous avons vu au chapitre 2 que le signal mesuré est la convolution de l'IRF et de la réponse « vraie » du système. Le temps moyen du signal est donc la somme du temps moyen de l'IRF et du temps moyen. Nous soustrayons donc le temps moyen de l'IRF à celui du signal.

$$\langle t \rangle_{vrai} = \langle t \rangle_{signal} - \langle t \rangle_{IRF} \quad (\text{Eq. 4-40})$$

Le même raisonnement peut être tenu avec la variance :

$$V_{vrai} = V_{signal} - V_{IRF} \quad (\text{Eq. 4-41})$$

4.4.5.2 Temps moyen

Nous avons tout d'abord testé la validité de l'expression du temps moyen donnée par la formule (Eq. 4-25). Sur la figure 4.16, le temps moyen est tracé en fonction de la profondeur z connue de l'inclusion (il est calculé selon les étapes ci-dessus, et noté $\langle t \rangle$ corrigé). Nous avons aussi tracé le temps moyen obtenu à partir des mesures brutes sans soustraction du signal résiduel (sans l'étape 1, nous le notons $\langle t \rangle$ mesures). Ces valeurs ont été représentées pour montrer, sur les valeurs numériques, que cette soustraction n'est pas négligeable lorsque la profondeur de l'inclusion augmente et que le signal résiduel n'est plus négligeable par rapport à la fluorescence. Il a beaucoup d'influence, ce qui donne une surestimation de la valeur du vrai temps moyen.

Dans cette géométrie, nous pouvons faire l'approximation : $r_{sr} + r_{rd} \approx 2z$. Ceci donne une relation linéaire en z qui est plus simple à valider de façon expérimentale. L'expression du temps moyen est donc :

$$\langle t \rangle_{\infty} = \frac{z}{c\sqrt{\mu_a D}} + \tau \quad (\text{Eq. 4-42})$$

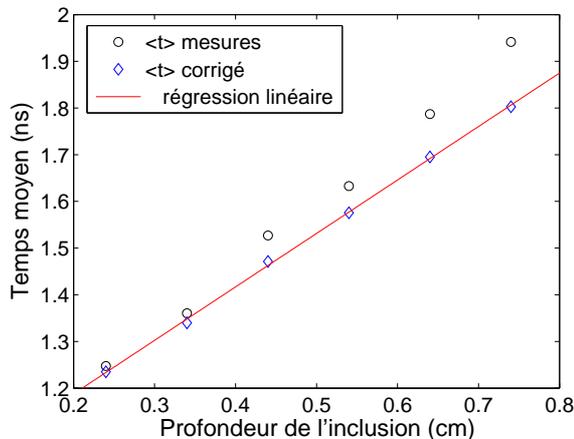


FIG. 4.16: Temps moyens en fonction de la profondeur de l'inclusion : calculé à partir des mesures brutes (cercles), calculé à partir des mesures corrigées du signal résiduel (diamants).

Comparons les résultats avec cette expression théorique. Le temps moyen est bien linéaire en fonction de z . La pente de la régression linéaire sur les temps moyens calculés à partir des mesures corrigées vaut 1.145. Ce résultat est en très bon accord avec la pente théorique égale à $1/(c\sqrt{\mu_a D}) = 1.149$ calculée avec les valeurs mesurées du tableau 4-I. L'ordonnée à l'origine vaut 0.96 ns, elle est en théorie égale au temps de vie. Nous avons donc également un bon accord avec la valeur mesurée $\tau = 1.02$ ns et nous retrouvons la valeur que nous avons utilisée pour les simulations à la section précédente. Nous avons constaté une bonne reproductibilité pour ces mesures de temps moyens.

4.4.5.3 Variance

Dans un second temps, nous avons voulu voir si la variance de ces courbes pouvait elle aussi être exploitée. Comme ci-dessus, nous avons tracé la variance en fonction de la profondeur de l'inclusion, calculée d'une part à partir des mesures brutes et d'autre part à partir des mesures corrigées du signal résiduel (figure (4.17) (a)). Pour la variance, la correction du signal résiduel apparaît encore plus importante que pour le temps moyen car on observe que les valeurs numériques sont complètement différentes. Sur la figure (4.17) (b), nous avons représenté uniquement les valeurs corrigées afin de les observer sur une échelle adaptée.

La première observation est que la variance est plus sensible au bruit que le temps moyen. La pente de la régression linéaire vaut 0.40 alors que la pente théorique $1/(c^2\sqrt{\mu_a^3 D})$ est égale à 0.55 ce qui représente une erreur d'environ 25 %. Nous avons reproduit ci-dessous les mêmes variables, sur un fantôme analogue lors d'une réalisation différente (figure 4.18). La variance est à nouveau perturbée : les quatre premiers points sont dans les mêmes gammes de valeurs que lors de la réalisation précédente mais pas les deux derniers ; ce qui donne une allure générale avec une pente de 0.8 si on effectue une régression linéaire.

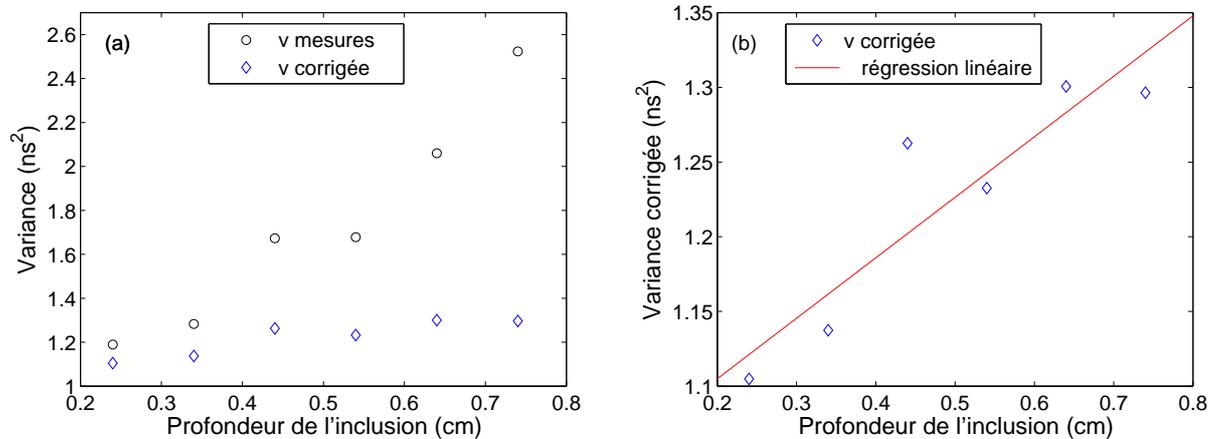


FIG. 4.17: (a) Variance des mesures brutes (cercles) et des mesures corrigées du signal résiduel (diamants) en fonction de la profondeur de l'inclusion. (b) Uniquement la variance corrigée du signal résiduel.

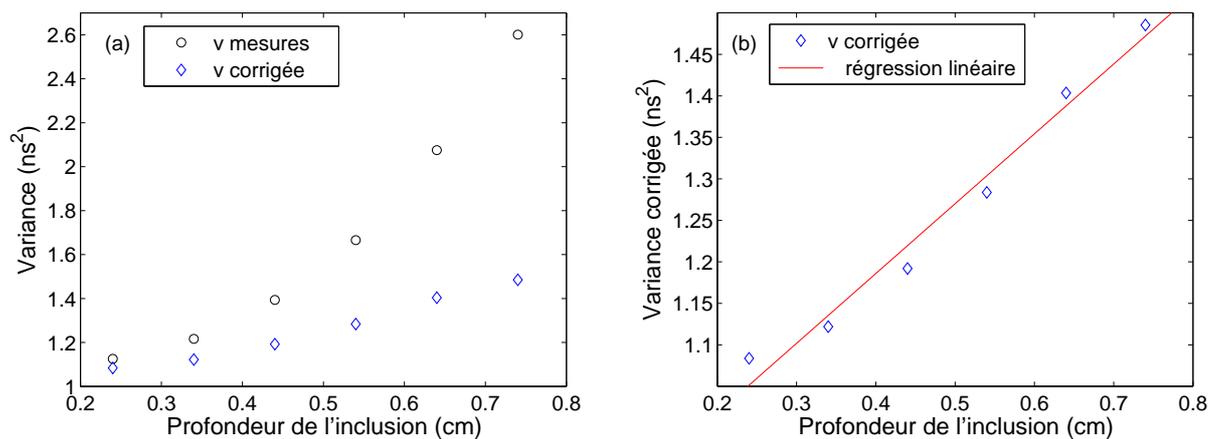


FIG. 4.18: (a) Variance des mesures brutes (cercles) et des mesures corrigées du signal résiduel (diamants) en fonction de la profondeur de l'inclusion. (b) Uniquement la variance corrigée du signal résiduel.

4.4.6 Discussion

La mesure du temps moyen apparaît comme un paramètre caractéristique des courbes de fluorescence qui est robuste et en bon accord avec le modèle théorique en milieu infini. Pour montrer l'accord avec le modèle théorique, nous avons eu besoin de connaître les propriétés optiques du milieu, le temps de vie du fluorophore et le temps moyen de l'IRF. Nous avons montré l'importance du prétraitement des données pour extraire les moments. La variance est plus bruitée que le temps moyen et semble plus difficile à exploiter. Cela est lié au caractère quadratique de la variance qui donne plus de poids au début et à la fin du signal de fluorescence. Ces deux parties sont sensibles car c'est sur elles que le signal résiduel a le plus d'influence.

4.5 Validation expérimentale du modèle direct en milieu semi-infini

4.5.1 Système et géométrie de mesure

Pour les mesures en surface, nous avons réalisé un système où les fibres ne bougent pas à la surface afin de toujours garder la même position du liquide vis-à-vis des fibres. De cette façon, l'effet de surface reste le même pour toute la série de mesures. Un support dédié aux mesures en surface permet de déplacer le capillaire selon l'axe vertical. Il s'agit de la monture 2 représentée sur la figure 4.9. Le capillaire est fixé à cette monture qui le fait coulisser à travers le récipient.

4.5.2 Mesures des moments en surface pour différentes positions de l'inclusion sous les fibres

Temps moyen Nous avons effectué des mesures en surface pour différentes positions de l'inclusion sous les fibres. Le fantôme utilisé est analogue au précédent. Sur la figure 4.19, nous avons représenté différents temps moyens. Nous constatons d'une part à nouveau l'intérêt du prétraitement pour corriger le temps moyen. D'autre part, nous avons superposé le temps moyen mesuré sur le même fantôme en profondeur. Nous observons bien que le temps moyen mesuré en surface est inférieur à ce dernier. Enfin, nous avons également tracé le temps moyen théorique calculé avec l'équation Eq. 4-34, les propriétés optiques du fantôme et un temps de vie $\tau=0.96$ ns. Le temps moyen expérimental présente un décalage d'environ 0.2 ns avec le temps moyen théorique même si les pentes sont en bon accord. Il est possible que ce décalage soit dû à l'effet de surface.

Variance Les mesures de la variance en surface ne sont pas exploitables. La figure 4.20 donne la variance en fonction de la profondeur des fibres. Une fois la correction effectuée, on ne voit aucune tendance se dégager des points expérimentaux. Cela vient peut-être de la mesure du signal résiduel qui a été mesuré après la série de mesures de fluorescence. La position des fibres à la surface a légèrement changé par rapport à leur position lors la série de mesures.

Nous constatons les difficultés d'interprétation de ces premières mesures en surface à l'aide du modèle de surface. Comme au chapitre 3 pour les mesures de diffusion, il existe un écart entre le modèle de diffusion en surface et les mesures expérimentales.

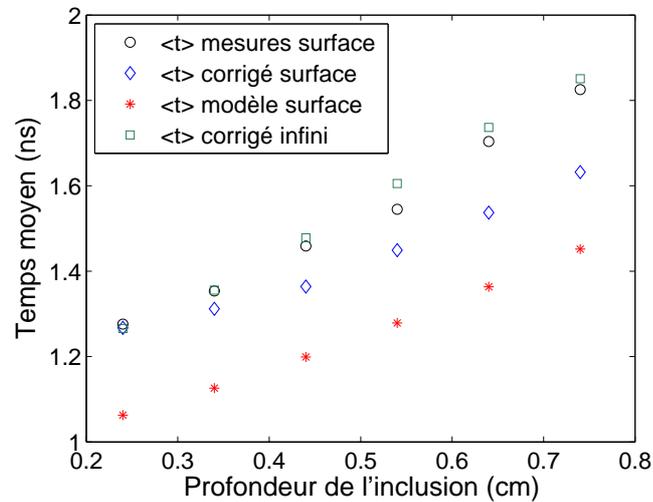


FIG. 4.19: Temps moyens (corrigés du temps moyen de l'IRF), pour des mesures en surface, en fonction de la profondeur de l'inclusion; calculé à partir des mesures brutes (cercles); calculé à partir des mesures corrigées du signal résiduel (diamants); temps moyens (corrigés du temps moyen de l'IRF), pour des mesures en profondeur (carrés)

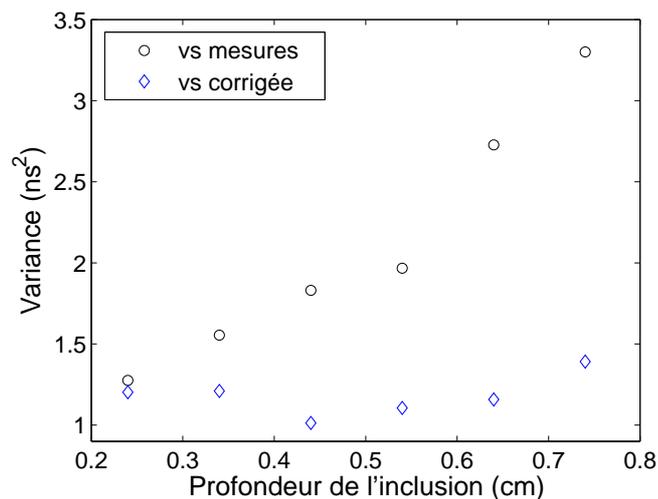


FIG. 4.20: Variance (corrigées de la variance de l'IRF), pour des mesures en surface, en fonction de la profondeur de l'inclusion : calculées à partir des mesures brutes (cercles), et calculées à partir des mesures corrigées du signal résiduel (diamants).

Bilan du chapitre

Nous avons expliqué comment obtenir les équations de fluorescence et les moments associés en milieu infini. Nous avons proposé une expression des deux premiers moments pour des mesures en surface avec des conditions *ebc*. Ensuite, nous avons proposé notre protocole pour extraire les moments des courbes expérimentales. Pour les mesures en profondeur, les expressions analytiques de la densité de photons et des deux premiers moments ont été validées. Le temps moyen apparaît comme un paramètre robuste. La variance est pour sa part plus sensible au bruit. Les mesures en milieu semi-infini nous ont apparu plus délicates et ne sont pas pour l'heure entièrement validées dans le cadre du modèle de l'approximation de la diffusion. Nous allons utiliser les expressions validées pour résoudre le problème inverse dans le prochain chapitre.

Chapitre 5

Localisation d'une inclusion fluorescente : résolution du problème inverse

Après avoir décrit et testé le modèle direct, nous pouvons à présent le coupler à des mesures de façon à localiser une inclusion fluorescente. Il s'agit de la résolution du problème inverse que nous abordons dans cette partie. Nous tenons à avertir le lecteur que, dans la continuité du travail déjà présenté, nous allons maintenant traiter des cas de géométries simples et homogènes. Cette étape est nécessaire, même si nous sommes conscients que ces cas ne sont pas représentatifs des tissus biologiques qui sont hétérogènes. Nous utiliserons tout d'abord le temps moyen pour résoudre le problème inverse à partir d'une mesure unique au-dessus de l'inclusion. Puis, nous présenterons une méthode plus générale de localisation à partir d'un jeu de mesures. Une mise en œuvre sera proposée qui permettra de s'affranchir des paramètres de temps de vie de fluorescence et de temps moyen de l'IRF vus au chapitre précédent. Enfin, deux perspectives de ce travail seront abordées : l'extension des méthodes à une distribution spatiale quelconque de fluorophores et l'utilisation d'une caméra rapide comme détecteur.

Sommaire

5.1	Utilisation du temps moyen pour une mesure absolue au-dessus d'une inclusion fluorescente	115
5.1.1	Expression du problème inverse	115
5.1.2	Résultats	115
5.2	Mesures différentielles : balayage au-dessus d'une inclusion	117
5.2.1	Géométrie de mesure	117
5.2.2	Expression du problème inverse	118
5.2.3	Simulations	119
5.2.4	Résultats pour des grilles de détecteurs centrées	121
5.2.5	Résultats pour des grilles de détecteurs décentrées	127
5.2.6	Autres résultats	128
5.3	Extension à une distribution spatiale de fluorophores . . .	132
5.3.1	Généralités	132
5.3.2	Adaptation de la méthode différentielle	136
5.4	Utilisation d'une caméra rapide	138
5.4.1	Description du dispositif	138
5.4.2	Analyse des mesures	140
5.4.3	Résolution du problème inverse	144

5.1 Utilisation du temps moyen pour une mesure absolue au-dessus d'une inclusion fluorescente

Dans cette section, nous montrons comment il est possible de retrouver la profondeur d'une inclusion fluorescente ponctuelle dans une géométrie particulière où les fibres de mesures sont situées au-dessus de l'inclusion. Plusieurs paramètres doivent être connus :

- les propriétés optiques du milieu (coefficient d'absorption et de diffusion réduit, indice de réfraction),
- le temps moyen de la réponse de l'instrument,
- le temps de vie du fluorophore.

Nous nous plaçons en milieu infini. Le décalage que nous avons constaté au chapitre précédent entre le modèle théorique et les mesures en surface ne permet pas pour l'instant de l'utiliser pour inverser le problème avec une seule mesure.

5.1.1 Expression du problème inverse

Pour un fluorophore unique en milieu infini et en supposant connus les paramètres mentionnés ci-dessus, le problème inverse s'exprime de façon très simple. Il suffit d'inverser la formule théorique que nous avons validée au chapitre précédent et qui donne le temps moyen en fonction de la profondeur. Nous la rappelons ici en tenant compte du temps moyen de la réponse de l'instrument :

$$\langle t \rangle_{signal} = \frac{r_{sr} + r_{rd}}{c \sqrt{\mu_a D}} + \tau + \langle t \rangle_{IRF} \quad (\text{Eq. 5-1})$$

où r_{sr} représente la distance source-inclusion et r_{rd} représente la distance inclusion-détecteur. Dans la géométrie considérée, la valeur de z est donnée par :

$$z = [(c \sqrt{\mu_a D})^2 (\langle t \rangle_{signal} - \tau - \langle t \rangle_{IRF})^2 - (d/2)^2]^{1/2} \quad (\text{Eq. 5-2})$$

où $d = 0.2$ cm est la distance entre les fibres, que l'on garde constante tout au long des expériences.

5.1.2 Résultats

Nous montrons les résultats sur le fantôme de la section 4.4.5 qui a servi à valider le modèle direct en milieu infini. Nous rappelons que nous avons mesuré ses coefficients optiques ($\mu_a = 0.053$ cm⁻¹ et $\mu'_s = 11.82$ cm⁻¹). Ils permettent de calculer le coefficient $c \sqrt{\mu_a D} = 1/1.14$ nécessaire pour retrouver la position z de l'inclusion. Les résultats de l'équation (Eq. 5-2) sont donnés dans le tableau 5-I, en utilisant deux temps de vie différents dans la formule d'inversion.

Nous avons tout d'abord utilisé $\tau = 0.96$ ns, valeur issue de l'analyse des mesures à différentes profondeurs et qui est aussi en bon accord avec les courbes temporelles. La profondeur déterminée est en très bon accord avec les valeurs expérimentales de z (précision de l'ordre de la centaine de μm). Nous avons ensuite utilisé la valeur $\tau =$

1.02 ns qui était la valeur mesurée. Nous vérifions bien qu'une différence de temps de vie provoque un décalage sur la valeur de z obtenue : ici, une faible sous-estimation de l'ordre d'un demi-millimètre.

z_{exp} (cm)	0.24	0.34	0.44	0.54	0.64	0.74
z_{calcul} (cm) ($\tau = 0.96$ ns)	0.22	0.32	0.44	0.53	0.64	0.73
z_{calcul} (cm) ($\tau = 1.02$ ns)	0.16	0.26	0.38	0.48	0.58	0.68

TAB. 5-I: Résultats donnés par la formule (Eq. 5-2) avec $\tau = 0.96$ ns et $\tau = 1.02$ ns pour des mesures au-dessus de l'inclusion, sur un fantôme optique de coefficients mesurés $\mu_a = 0.053$ cm^{-1} et $\mu'_s = 11.82$ cm^{-1} .

Deux points sont sujets à discussion. Le premier est la validité de l'équation de la diffusion sur les distances parcourues par les photons. Pour la première profondeur, les distances entre la source et l'inclusion, et entre l'inclusion et le détecteur sont de l'ordre de 0.2 cm. Nous sommes effectivement dans les limites de l'équation de la diffusion. C'est ce qui explique que les valeurs calculées sont plus proches des valeurs expérimentales pour les plus grandes profondeurs.

Le second point de discussion est la position de la source considérée. Ici, nous avons pris la source à l'extrémité de la fibre. Or, on considère classiquement une source isotrope située à une distance $1/\mu'_s$ de l'extrémité de la fibre. En prenant cette géométrie, on peut montrer que cela augmente la profondeur z_{calcul} de $1/(2\mu'_s) = 0.04$ cm pour notre mesure. Ce raisonnement est, de plus, délicat à tenir pour les petites profondeurs pour lesquelles on se situe justement en dehors des limites de l'équation de diffusion. Pour statuer sur ce point, il faudrait que l'ensemble du dispositif soit positionné avec une précision de l'ordre de 0.04 cm et que le fluorophore soit exactement ponctuel, ce qui n'était pas notre cas. Il occupe un volume de 1 mm³ à l'extrémité du capillaire. Or le capillaire possède une géométrie particulière car il était utilisé à l'origine pour une autre application. Il a une petite lentille à l'intérieur, ce qui peut également modifier le parcours de la lumière.

Finalement, nous retiendrons que l'incertitude sur le temps de vie ou la discussion sur la géométrie de la source conduisent à un décalage en profondeur de l'ordre de 500 μm . Par contre, les positions relatives aux différentes profondeurs sont retrouvées avec une très bonne précision de l'ordre de 200 μm .

Cette méthode de localisation possède de nombreuses contraintes. Elle nécessite tout d'abord de placer les fibres au-dessus de l'inclusion et donc de connaître la localisation en (x, y) de l'inclusion. Ensuite, le temps de vie du fluorophore doit être connu. C'est pourquoi nous avons développé une méthode originale pour s'affranchir de l'ensemble de ces connaissances *a priori*.

5.2 Mesures différentielles : balayage au-dessus d'une inclusion

Pour se passer de la connaissance de la position en (x, y) de l'inclusion, nous avons augmenté le nombre de mesures pour augmenter le nombre d'équations du système et ainsi retrouver la position (x, y, z) de l'inclusion. De plus, nous avons développé une méthode de résolution du problème inverse qui permet de s'affranchir de la connaissance *a priori* du temps de vie de fluorescence et du temps moyen de l'IRF.

5.2.1 Géométrie de mesure

La fibre d'émission et la fibre de détection sont fixées de façon solidaire sur un support, comme présenté à la section 4.4.1 sur la figure 4.9. Elles sont séparées d'une distance de 0.2 cm. Le support est lié à deux tables de translation permettant les déplacements dans les directions x et y . Le balayage est contrôlé de façon automatique par une interface Labview. Elle permet à la fois le déplacement des platines de translation et le déclenchement de l'acquisition du signal temporel par la carte TCSPC (voir section 2.2.6).

Nous avons utilisé une grille de mesure comportant 5×5 positions de détecteurs disposés selon un pas de 0.2 cm. La figure 5.1 illustre la géométrie de la grille de détecteurs ainsi que le numéro de la mesure lors du balayage. Pour chaque position de détecteur, la fibre source se situe à -0.2 cm selon l'axe des x (par exemple, pour le détecteur en position numéro 2, la source correspondante se situe en position numéro 1).

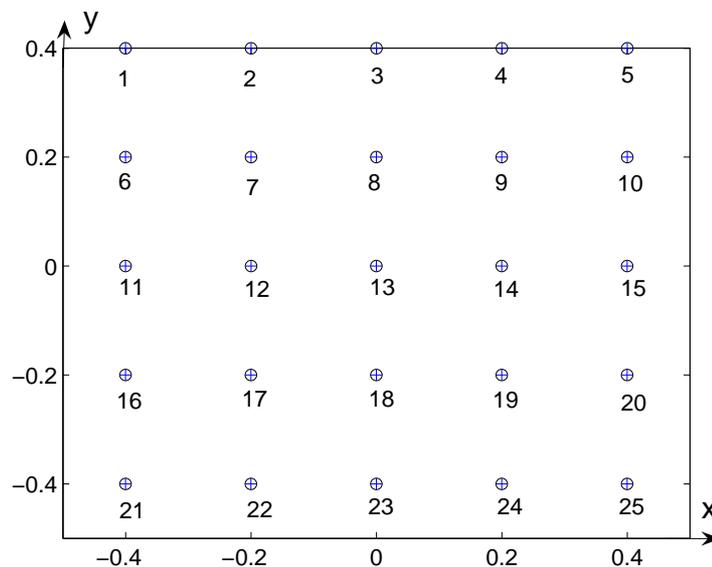


FIG. 5.1: Géométrie de la grille des détecteurs utilisée pour les mesures avec balayage.

Nous nous plaçons dans une géométrie de milieu infini, l'extrémité des fibres étant placée 2.5 cm sous la surface. Nous avons effectué des mesures avec la grille de détecteurs centrée au-dessus de l'inclusion puis avec la grille décentrée. Pour les mesures avec la grille centrée, le centre (0,0) correspondant à la position 13 est placé au-dessus de l'inclusion.

5.2.2 Expression du problème inverse

Une série de N mesures est réalisée au-dessus de l'inclusion. Les temps moyens sont calculés pour chacune des mesures, toujours avec la procédure décrite au chapitre précédent (section 4.4.5.1). Dans le but de s'affranchir de certains paramètres, nous considérons à partir de ce point une nouvelle variable. On soustrait de chaque temps moyen un temps moyen particulier. Nous avons choisi ici le plus petit des temps moyens. Ce choix peut se justifier par le fait que le plus petit temps moyen correspond à la mesure où le couple source-détecteur (noté $\mathbf{r}_{s_m} - \mathbf{r}_{d_m}$) est le plus près de l'inclusion. Cette mesure possède ainsi la plus grande amplitude et le meilleur rapport signal sur bruit. Les nouvelles variables que nous considérons sont appelées $\Delta \langle t \rangle_{signal,i}$:

$$\Delta \langle t \rangle_{signal,i} = \langle t \rangle_{signal,i} - \min(\langle t \rangle_{signal,i}) \quad i \in [1, N] \quad (\text{Eq. 5-3})$$

L'avantage de ces nouvelles variables est qu'elles sont indépendantes du temps de vie de fluorescence et du temps moyen de l'IRF. En effet, rappelons l'expression théorique de $\langle t \rangle_{signal,i}$:

$$\langle t \rangle_{signal,i} = \frac{r_{sr,i} + r_{rd,i}}{2c\sqrt{\mu_a D}} + \tau + \langle t \rangle_{IRF} \quad (\text{Eq. 5-4})$$

L'expression du minimum est de la même forme avec $s = s_m$ et $d = d_m$. Le temps de vie de fluorescence et le temps moyen de l'IRF sont éliminés par la soustraction :

$$\begin{aligned} \Delta \langle t \rangle_{signal,i} &= \langle t \rangle_{signal,i} - \min(\langle t \rangle_{signal,i}) \quad i \in [1, N] \\ &= \frac{r_{sr,i} + r_{rd,i}}{2c\sqrt{\mu_a D}} - \frac{r_{s_m r} + r_{rd_m}}{2c\sqrt{\mu_a D}} \end{aligned} \quad (\text{Eq. 5-5})$$

Les trois coordonnées sont calculées en minimisant une fonction d'erreur définie par :

$$\chi^2 = \sum_i (\Delta \langle t \rangle_{signal,i} - \Delta \langle t \rangle_{theo,i})^2 \quad (\text{Eq. 5-6})$$

où $\Delta \langle t \rangle_{theo,i} = \langle t \rangle_{theo,i} - \langle t \rangle_{theo,m}$ avec m l'indice correspondant à l'indice du plus petit des temps moyens expérimentaux. La procédure de minimisation, basée sur la méthode du simplexe, est semblable à celle vue au chapitre 3. Elle est schématisée sur le diagramme de la figure 5.2. L'ensemble de la procédure de traitement est régi par un programme Matlab.

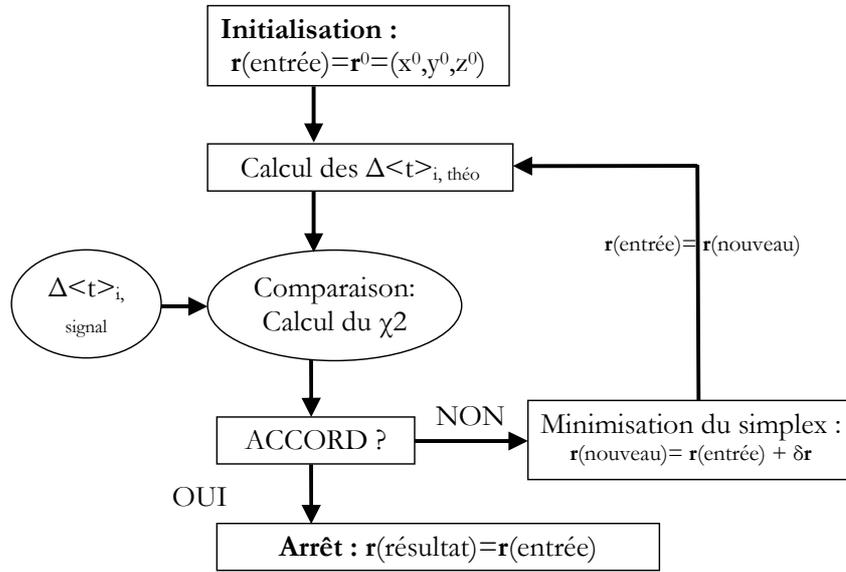


FIG. 5.2: Schéma de la procédure de minimisation pour déterminer la position \mathbf{r} de l'inclusion fluorescente à partir des données mesurées $\Delta < t >_{signal, i}$.

5.2.3 Simulations

Nous présentons ici une simulation pour pouvoir la comparer aux résultats et nous rendre compte des effets de la géométrie de mesure choisie. Des courbes temporelles pour la grille de détection et pour une inclusion placée en $(x, y) = (0, 0)$ et $z_{simu} = 0.34$ cm sont simulées à l'aide de l'équation (Eq. 4-10) qui donne le profil temporel pour une géométrie infinie.

La différence des temps moyens calculés sur ces simulations est représentée sous forme d'une image sur la figure 5.3, où chaque pixel représente un détecteur. Nous remarquons que certains points donnent le même temps moyen. Ce sont ceux pour lesquels la somme des distances $r_{sr} + r_{rd}$, entre la source et l'inclusion (r_{sr}), puis l'inclusion et le détecteur (r_{rd}), est la même. La géométrie de la grille crée une symétrie autour du point $(0.1, 0)$.

Sur la figure 5.4, la différence des temps moyens est tracée en fonction du numéro de la mesure. Cette courbe ne possède pas de symétrie à cause de la grille choisie. Nous retrouvons d'une autre façon les détecteurs qui ont le même temps moyen. Cette représentation nous sera utile pour évaluer de façon visuelle les résultats du calcul de la position que nous superposerons aux mesures.

Pour vérifier le bon fonctionnement du programme d'inversion, nous mettons les courbes simulées comme données d'entrée du programme. Celui-ci retrouve bien la position $(0, 0, 0.34)$ comme prévu. Si nous représentons les valeurs calculées des différences de temps moyens à partir de cette position, ils sont superposés avec les valeurs simulées sur la figure 5.4.

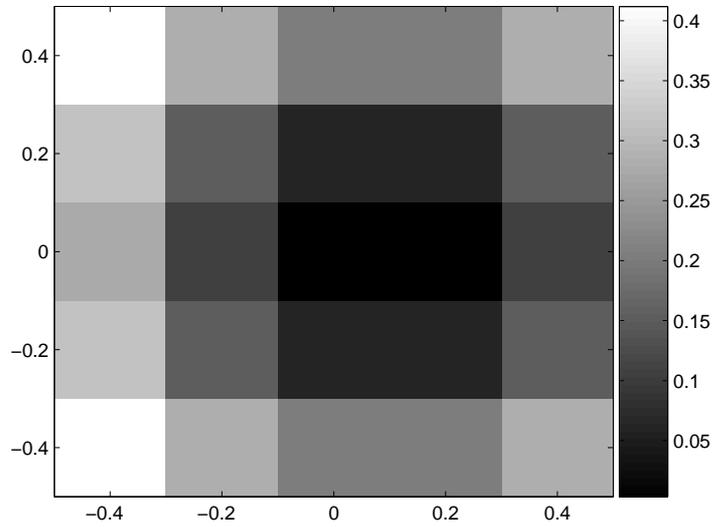


FIG. 5.3: Représentation sous forme de carte spatiale de la différence des temps moyens (en ns) $\Delta \langle t \rangle$ simulés pour les 25 mesures avec $z_{simu} = 0.34$ cm.

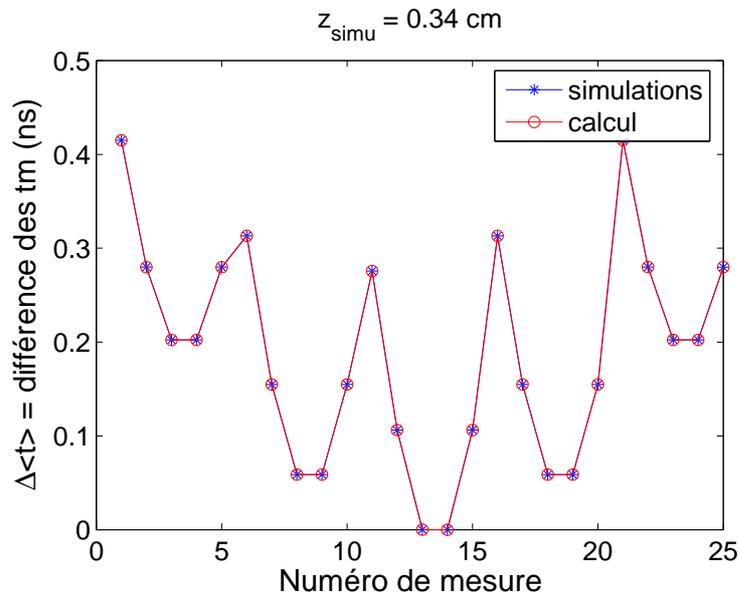


FIG. 5.4: Différence des temps moyens $\Delta \langle t \rangle$ simulés et ceux calculés par la procédure d'ajustement des paramètres, en fonction du numéro de la mesure, avec $z_{simu} = 0.34$ cm.

5.2.4 Résultats pour des grilles de détecteurs centrées

5.2.4.1 Analyse des mesures

Nous commençons par analyser par exemple la profondeur $z = 0.34$ cm. La carte des différences des temps moyens est donnée par la figure 5.5. Elle présente bien la même symétrie globale que la carte obtenue pour les simulations.

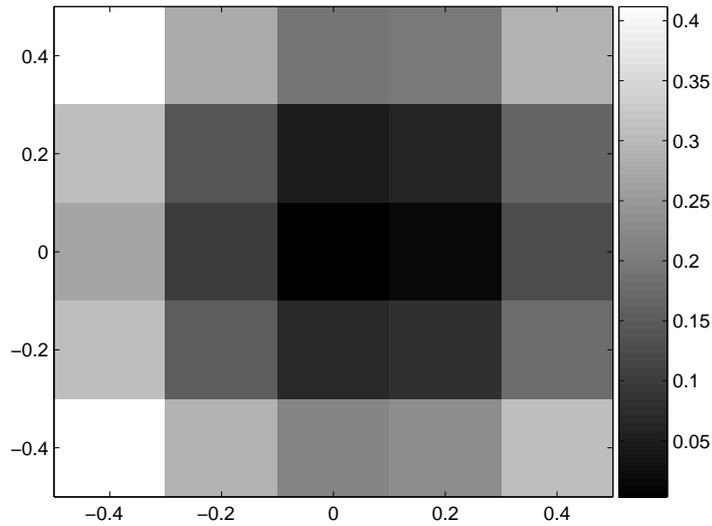


FIG. 5.5: Représentation sous forme de carte spatiale de la différence des temps moyens (en ns) $\Delta \langle t \rangle$ expérimentaux pour $z_{exp}=0.34$ cm.

Toujours pour la profondeur $z = 0.34$ cm, nous pouvons également tracer les différences de temps moyens expérimentaux sur la figure 5.6.

Un écart avec la figure de simulation peut être observé sur la figure représentant les différences de temps moyens en fonction du numéro de la mesure. En effet, certains points pour lesquels $r_{sr} + r_{rd}$ sont égaux n'ont pas des temps moyens strictement équivalents. Par exemple, pour les positions 13 et 14 (figure 5.7), le temps moyen de la position 14 est systématiquement supérieur à celui de la position 13. Cela s'accompagne également d'une amplitude supérieure pour la position 13 où le détecteur est au-dessus de l'inclusion. La même tendance se retrouve pour les autres points équivalents.

Une première hypothèse serait d'attribuer ce décalage aux approximations non prises en compte par le modèle, c'est-à-dire les différences de propriétés optiques aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission. Celles-ci sont très faibles pour le fantôme utilisé. Elles sont données dans le tableau 5-II. Pour le coefficient d'absorption, nous avons pris celui mesuré avec le spectrophotomètre d'absorption. Pour le coefficient de diffusion réduit, nous avons tenu compte des variations données au chapitre 3. Nous avons simulé les différences de temps moyen entre les positions 13 et 14 (figure 5.8), en tenant compte des différences de propriétés optiques sur les chemins parcourus par les photons. Les

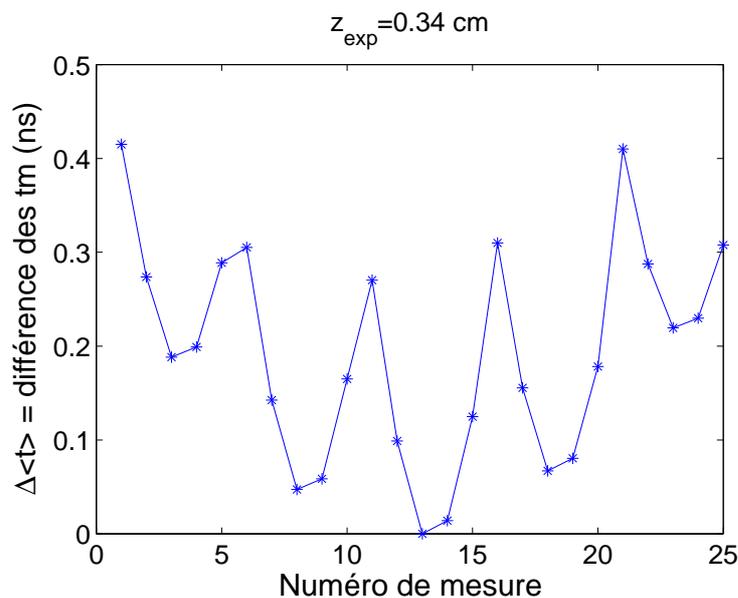


FIG. 5.6: Différence des temps moyens $\Delta \langle t \rangle$ expérimentaux, avec $z = 0.34$ cm.

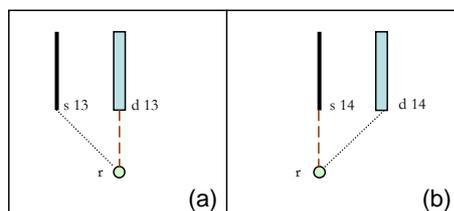


FIG. 5.7: Illustration des positions 13 (a) et 14 (b).

différences de temps moyens générées sont négligeables, entre 0.4 et 0.1 ps jusqu'à 1 cm. Le sens des variations est bien celui observé mais l'ordre de grandeur n'est pas le bon. Nous ne pouvons donc pas attribuer ce décalage aux différences de propriétés optiques aux deux longueurs d'onde.

Une autre hypothèse pourrait être la différence de puissance absorbée par le fluorophore selon qu'il est plus proche de la fibre d'émission ou de réception. Mais cet argument ne doit pas changer le temps moyen. Enfin, une dernière hypothèse est de penser à un faible décalage de l'inclusion en (x, y) . En effet, un décalage selon l'axe des x en négatif et selon l'axe des y en positif provoquerait une telle différence sur les temps moyens et les amplitudes de façon qualitative. Nous verrons dans la section suivante, si le calcul trouve un tel décalage pour expliquer les variations des différences de temps moyens.

Longueur d'onde (nm)	μ_a (cm ⁻¹)	μ'_s (cm ⁻¹)
$\lambda_x = 631$	0.05	12
$\lambda_m = 664$	0.047	11.4

TAB. 5-II: Propriétés optiques du fantôme aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

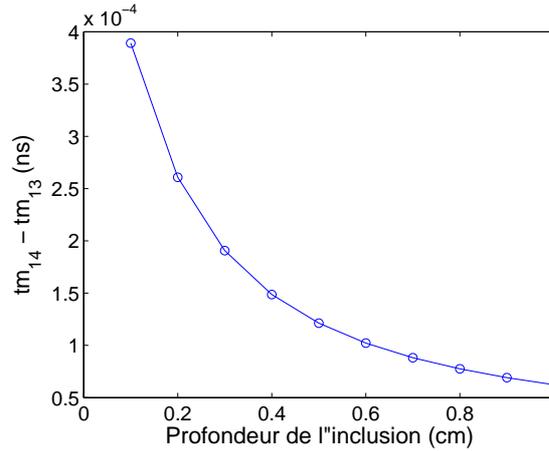


FIG. 5.8: Différence des temps moyens entre les positions 14 et 13 en tenant compte des propriétés optiques aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

5.2.4.2 Calcul de la position

Nous avons appliqué la procédure d'ajustement des paramètres à l'ensemble des 25 points de mesures. Par exemple, pour la profondeur $z = 0.34$ cm, le calcul donne $x = -0.02$ cm, $y = 0.01$ cm et $z = 0.33$ cm. Ce léger décalage trouvé par le calcul explique bien les écarts de temps moyen et d'amplitude pour les positions que nous pensions équivalentes. Nous en concluons que ces écarts traduisent effectivement un décalage de l'inclusion par rapport au centre. Cette technique est donc très sensible et capable de détecter ce type de décalage de d'ordre de la centaine de micromètres.

Cependant, outre le résultat numérique donnant la position de l'inclusion et la valeur du χ^2 , d'autres graphiques sont appréciés pour valider visuellement les résultats. Nous pouvons superposer les résultats du calcul et les différences de temps moyens expérimentaux pour évaluer l'accord entre les deux (figure 5.9).

Un autre graphique intéressant (figure 5.10) représente le temps moyen mesuré en fonction du chemin $r_{sr} + r_{rd}$ parcouru par les photons avec \mathbf{r} la valeur obtenue à partir du calcul. Cette fonction est bien une droite en accord avec la formule théorique. On peut comparer sa pente expérimentale qui vaut 0.572 avec la pente théorique $1/(2c\sqrt{\mu_a D}) = 0.572$. Cet accord confirme la cohérence des résultats.

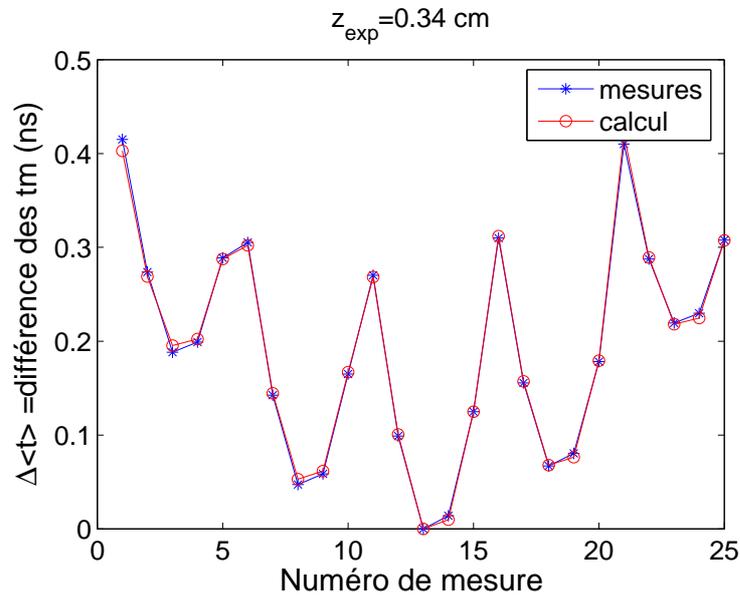


FIG. 5.9: Différence des temps moyens $\Delta \langle t \rangle$ expérimentaux et ceux calculés par la procédure d'ajustement des paramètres, en fonction du numéro de la mesure, avec $z = 0.34$ cm.

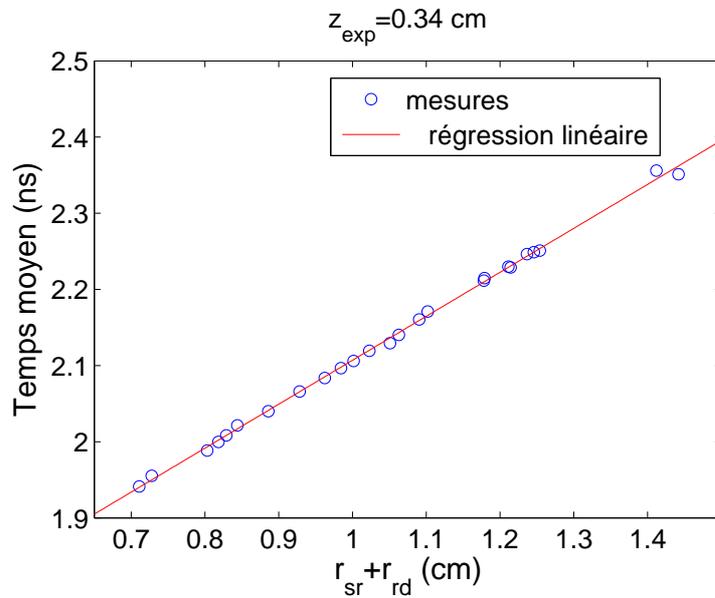


FIG. 5.10: Temps moyens expérimentaux (pour $z_{exp} = 0.34$ cm) en fonction du chemin $r_{sr} + r_{rd}$ parcouru par les photons avec r la valeur obtenue à partir du calcul.

Les résultats pour les autres profondeurs sont donnés dans le tableau 5-III. On observe toujours une bonne localisation en (x, y) ainsi qu'une détermination de la profondeur meilleure que le millimètre. Nous distinguons *a priori* la localisation en (x, y) de celle en z car celle en (x, y) est plus dépendante du rapport signal sur bruit alors que celle sur la profondeur est plus sensible au modèle utilisé. Pour cette série de mesures, la précision sur les trois coordonnées est de l'ordre de $200 \mu\text{m}$. Les graphiques précédents sont aussi tracés pour les trois autres profondeurs (figure 5.11). Ils montrent bien tous un comportement analogue entre eux. La pente des temps moyens expérimentaux en fonction du chemin parcouru par les photons est bien toujours constante autour de la valeur 0.57, ce qui confirme le bon accord avec la théorie pour ces profondeurs.

z_{exp} (cm)	x (cm)	y (cm)	z (cm)	Pente (ns/cm)
0.24	-0.01	-0.01	0.24	0.572
0.34	-0.02	0.01	0.33	0.577
0.44	-0.02	0.02	0.42	0.578
0.54	-0.02	0.04	0.53	0.577

TAB. 5-III: Positions de l'inclusion fluorescente calculées par la procédure de minimisation. Sa position vraie est $(0, 0, z_{exp})$. La dernière colonne est la pente des temps moyens expérimentaux en fonction du chemin $r_{sr} + r_{rd}$ parcouru par les photons avec r la valeur obtenue à partir du calcul.

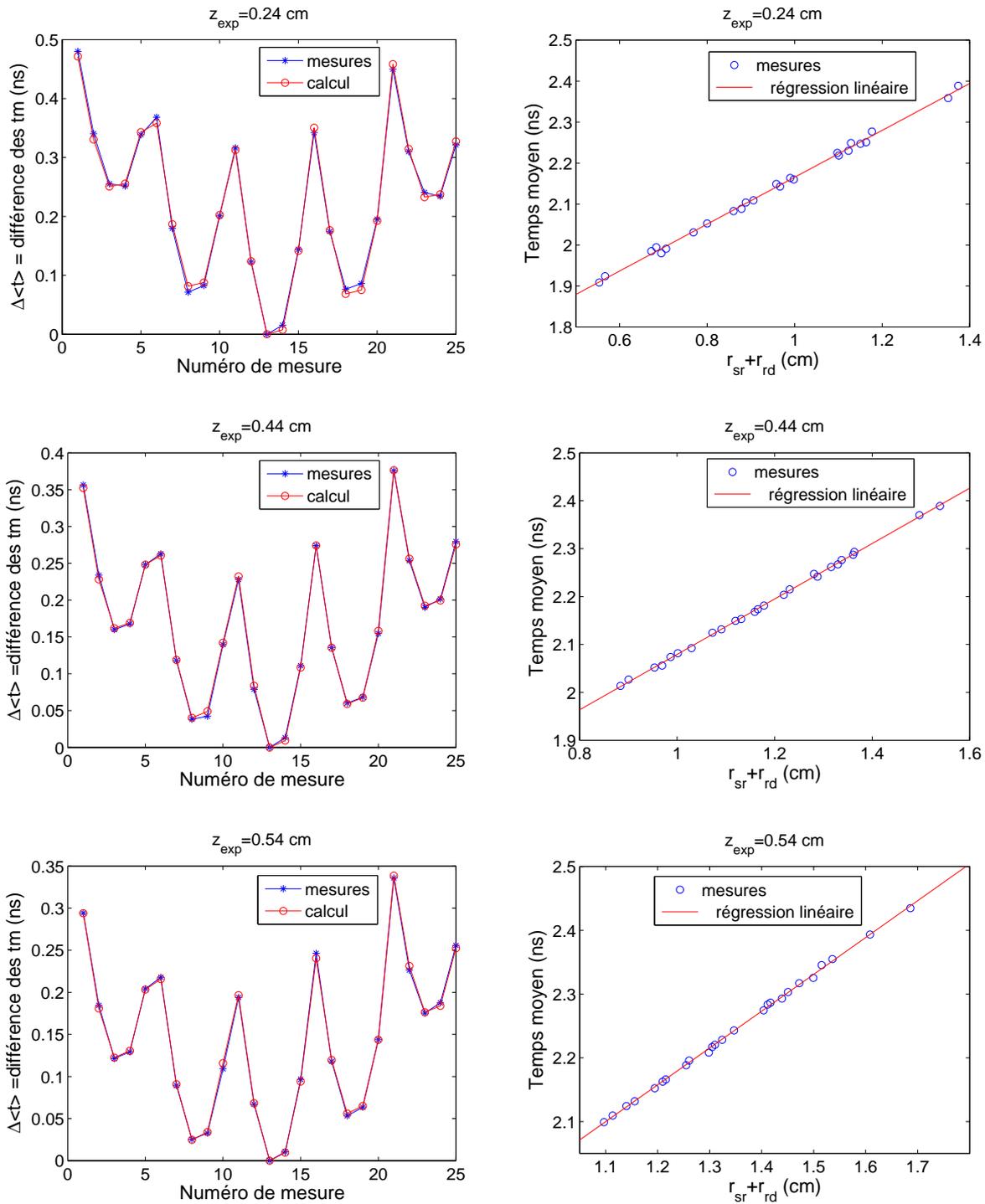


FIG. 5.11: Différence des temps moyens $\Delta \langle t \rangle$ expérimentaux et ceux calculés par la procédure d'ajustement des paramètres, en fonction du numéro de la mesure, pour les profondeurs $z = 0.24$, 0.44 et 0.54 cm.

5.2.5 Résultats pour des grilles de détecteurs décentrées

Des mesures ont été réalisées avec des grilles non centrées sur l'inclusion. L'inclusion est positionnée à $z = 0.34$ cm (position expérimentale = $(0,0,0.34)$) avec la grille initialement centrée au-dessus d'elle. Puis le centre de la grille a été translaté le long de l'axe x vers deux autres positions : $(-0.2, 0, 0)$ puis $(-0.4, 0, 0)$. La configuration avec la grille centrée est indiquée seulement pour comparaison.

L'effet du décentrage est visible sur les graphiques donnant la différence des temps moyens en fonction du numéro de la mesure. Ils n'ont pas la même symétrie que pour les mesures centrées. La figure 5.12 représente ce graphique pour la grille décalée de 0.4 cm. Ensuite, comme le montre le tableau 5-IV qui donne les positions obtenues par ajustement, en comparaison des positions vraies, tant la localisation (x, y) que la profondeur sont correctement déterminées par la procédure d'ajustement pour les trois localisations. Nous remarquons qu'ici, l'inclusion est bien centrée en $(0, 0)$, car des points de détection équivalents, par exemple 11 et 12 sur la figure, ont le même $\Delta \langle t \rangle$.

Ces résultats montrent que la méthode ne nécessite pas de connaissance *a priori* de la position (x, y) de l'inclusion et reste valable si la grille est décalée par rapport à l'inclusion. Cette situation se rapproche d'un cas réel où la position de l'inclusion est connue grossièrement en (x, y) .

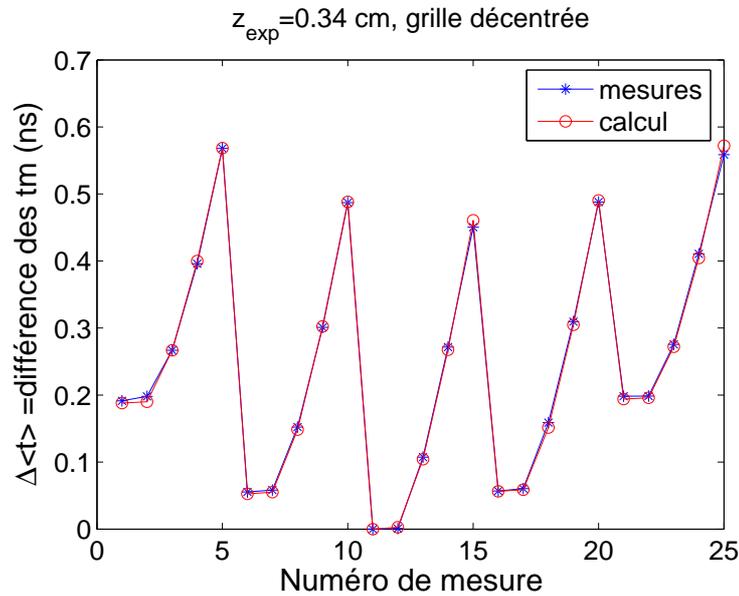


FIG. 5.12: Différence des temps moyens $\Delta \langle t \rangle$ expérimentaux et ceux calculés avec $z = 0.34$ cm, pour une grille centrée en $(-0.4, 0, 0)$.

Centre de la grille	$(0,0,0)$	$(-0.2,0,0)$	$(-0.4,0,0)$
Position calculée de l'inclusion	$(0.00,0.00,0.32)$	$(-0.00,0.00,0.32)$	$(-0.01,0.00,0.31)$

TAB. 5-IV: Positions de l'inclusion fluorescente calculées pour différentes positions de la grille translatées selon l'axe des x .

5.2.6 Autres résultats

A la suite des mesures différentielles exploitant le temps moyen en milieu infini, nous présentons dans cette section des résultats préliminaires.

5.2.6.1 Mesures différentielles avec utilisation de la variance

Nous avons testé la procédure d'inversion présentée dans la section précédente en utilisant la variance, sur la même série de mesures en milieu infini. Par analogie, les nouvelles variables considérées sont notées $\Delta V_{signal,i}$:

$$\Delta V_{signal,i} = V_{signal,i} - \min(V_{signal,i}) \quad i \in [1, N] \quad (\text{Eq. 5-7})$$

A nouveau, ces variables sont indépendantes du temps de vie de fluorescence et du temps moyen de l'IRF. Rappelons l'expression théorique de $V_{signal,i}$:

$$V_{signal,i} = \frac{r_{sr,i} + r_{rd,i}}{4c^2 \sqrt{\mu_a^3 D}} + \tau^2 + V_{IRF} \quad (\text{Eq. 5-8})$$

Nous avons vu au chapitre 4 que la variance était plus sensible au bruit que le temps moyen. Cela se traduit ici par de moins bons résultats sur la localisation de l'inclusion. Pour la profondeur $z = 0.34$ cm, la carte de la variance est donnée par la figure 5.13. Elle apparaît bien symétrique à première vue, de la même façon que les cartes de temps moyens.

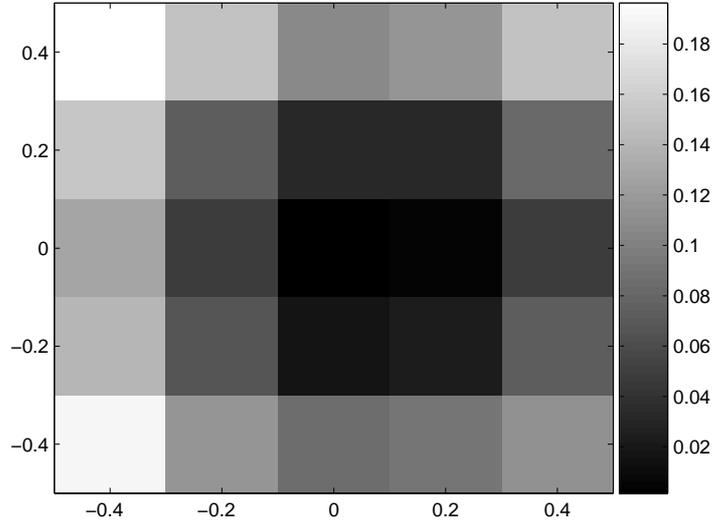


FIG. 5.13: Représentation sous forme de carte spatiale de la différence des variances (en ns^2) ΔV expérimentales pour $z_{exp}=0.34$ cm.

Cependant, les résultats du calcul de la procédure d'ajustement s'écartent de la position expérimentale de l'inclusion. On obtient pour cette profondeur : $x = 0.00$ cm,

$y = -0.03$ cm et $z = 0.26$ cm. La figure 5.14 superpose les différences des variances en fonction du numéro de la mesure et les valeurs calculées. On constate que l'accord est visuellement moins bon que pour le temps moyen. On retrouve cette observation sur la figure 5.15 représentant la variance en fonction du chemin total des photons $r_{sr} + r_{rd}$. Même si elle montre légèrement plus de dispersion par rapport à la régression linéaire que pour le temps moyen, la pente égale à 0.246 est bien en accord avec la pente théorique $\frac{1}{4c^2\sqrt{\mu_a^3 D}} = 0.240$.

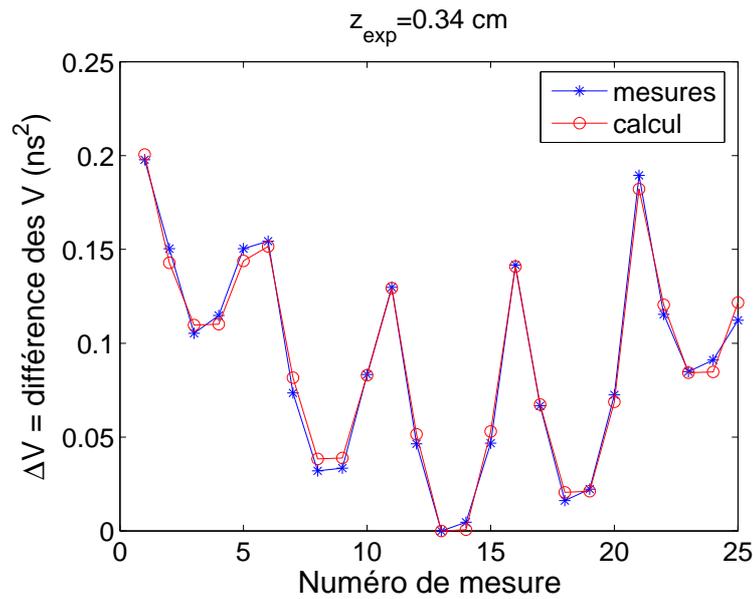


FIG. 5.14: Différence des variances ΔV expérimentales et valeurs calculées par la procédure d'ajustement des paramètres, en fonction du numéro de la mesure, avec $z = 0.34$ cm.

Les résultats pour les autres profondeurs sont donnés dans le tableau 5-V. La valeur pour la première profondeur $z=0.24$ cm est très mauvaise et les résultats ne sont pas significatifs car les valeurs des variances étaient très dispersées. Pour les autres profondeurs, on observe une sous-estimation mais l'écart relatif n'est pas conservé.

Ces résultats sont malgré tout prometteurs et mériteraient d'être approfondis en recherchant un traitement particulier pour la variance.

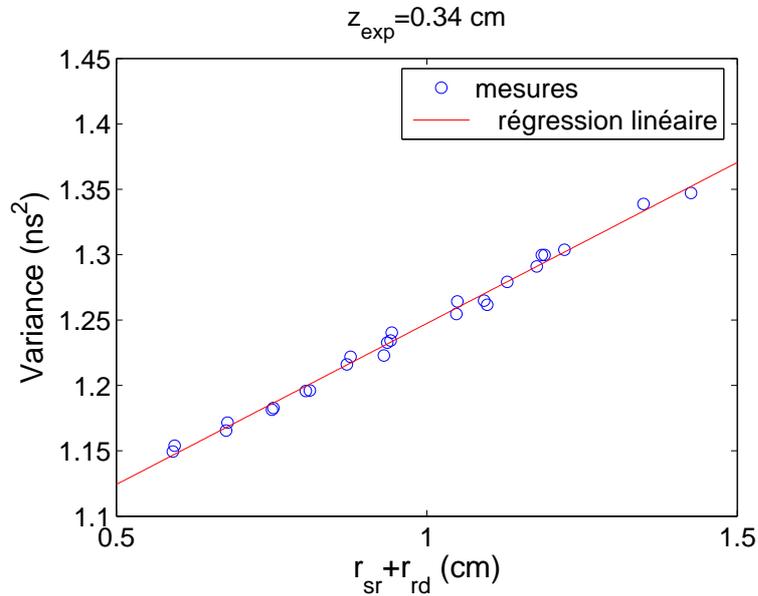


FIG. 5.15: Variance expérimentales (pour $z_{exp}=0.34 \text{ cm}$) en fonction du chemin $r_{sr} + r_{rd}$ parcouru par les photons avec r la valeur obtenue à partir du calcul.

z_{exp} (cm)	x (cm)	y (cm)	z (cm)	Pente (ns ² /cm)
0.24	0.04	-0.07	0.50	0.226
0.34	0.00	-0.03	0.26	0.246
0.44	-0.02	0.00	0.39	0.228
0.54	-0.03	0.06	0.46	0.239

TAB. 5-V: Positions de l'inclusion fluorescente calculées par la procédure de minimisation en utilisant la variance. La position vraie est $(0, 0, z_{exp})$. La dernière colonne est la pente des temps moyens expérimentaux en fonction du chemin $r_{sr} + r_{rd}$ parcouru par les photons avec r la valeur obtenue à partir du calcul.

5.2.6.2 Mesures différentielles en surface

Nous présentons ici un résultat pour des mesures de balayage en surface avec $z=0.34$ cm. La procédure d'ajustement utilise la formule théorique pour le temps moyen en surface établie au chapitre 4 (Eq. 4-34). La formule n'a pas été entièrement validée car elle présentait un décalage par rapport aux mesures. En faisant l'hypothèse que ce décalage est constant, il devrait toutefois s'annuler avec la variable de la méthode différentielle.

Pour la profondeur $z = 0.34$ cm, le calcul donne $x = 0.01$ cm, $y = -0.06$ cm et $z = 0.34$ cm. Cela semble être une bonne localisation mais avec un grand écart aux mesures comme le montre la figure 5.16. Nous ne savons pas pour l'instant expliquer ces écarts. Ce résultat préliminaire nécessiterait d'être reproduit pour mieux étudier l'effet de l'interface.

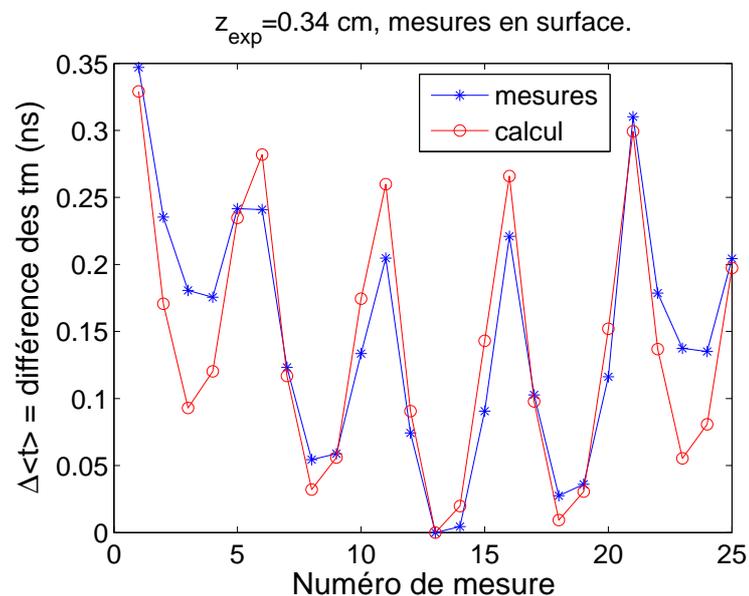


FIG. 5.16: Différence des temps moyens $\Delta \langle t \rangle$ expérimentaux et valeurs calculées par la procédure d'ajustement des paramètres, en fonction du numéro de la mesure, pour un mesure en surface, avec $z = 0.34$ cm.

5.3 Extension à une distribution spatiale de fluorophores

5.3.1 Généralités

Les parties précédentes ont fourni le modèle direct pour un fluorophore unique, de concentration unité. Nous passons désormais au cas plus général d'une distribution spatiale quelconque de fluorophores, que nous abordons ici de façon théorique. Pour cela, il est plus simple de linéariser le problème et de tenir compte de l'intégration sur le volume. La discussion suivante, qui est une adaptation de celle proposée par Lam *et al* [1, 111], présente le problème direct pour une distribution quelconque de fluorophores.

Nous allons raisonner dans le domaine fréquentiel pour effectuer les calculs des moments. Reprenons l'expression générale fréquentielle que nous avons vue au chapitre précédent et qui donne la densité de photons de fluorescence, pour un couple donné source-détecteur (voir (Eq. 4-4)) :

$$\Phi_f(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \omega) = \int_V \Phi_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \omega) \frac{\eta(\mathbf{r})\mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r})}{1 + i\omega\tau(\mathbf{r})} \Phi_m(\mathbf{r}_d, \mathbf{r}, \omega) d\mathbf{r} \quad (\text{Eq. 5-9})$$

Le paramètre que l'on cherche à reconstruire est $\eta(\mathbf{r})\mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r})$. Il donne à la fois une information spatiale et quantitative, si l'on fait l'hypothèse que le coefficient d'absorption est proportionnel à la concentration. En chaque point, le signal mesuré est proportionnel à la densité de photons de fluorescence. Nous faisons l'hypothèse de milieu infini. Nous assimilerons la densité de photons au signal en lui affectant un coefficient de proportionnalité. Ce coefficient de proportionnalité ne dépend que de facteurs instrumentaux (puissance d'excitation, gain des détecteurs, atténuation des filtres...). Nous introduisons ce facteur car il va intervenir dans les moments d'ordre zéro dont nous allons avoir besoin. On exprime la densité de photons en fonction de ce facteur instrumental, des coefficients de diffusion D et des fonctions de Green G qui sont des données connues (aux deux longueurs d'ondes λ_x et λ_m , qui reportent les indices x et m sur les grandeurs qui leur correspondent) :

$$\Phi_f(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \omega) = \alpha \int_V \frac{1}{D_x D_m} G_x(r_{sr}, \omega) \frac{\eta(\mathbf{r})\mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r})}{1 + i\omega\tau(\mathbf{r})} G_m(r_{rd}, \omega) d\mathbf{r} \quad (\text{Eq. 5-10})$$

où r_{sr} désigne la distance entre la source et le point \mathbf{r} et r_{rd} la distance entre le point \mathbf{r} et le détecteur. Nous discrétisons cette équation en passant à une somme sur les voxels, éléments de volume du milieu, où h représente la taille du pas de discrétisation :

$$\Phi_f(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \omega) = \alpha \sum_{v=\text{voxels}} \frac{1}{D_x D_m} G_x(r_{sr_v}, \omega) \frac{\eta(\mathbf{r}_v)\mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v)}{1 + i\omega\tau(\mathbf{r}_v)} G_m(r_{r_v d}, \omega) h^3 \quad (\text{Eq. 5-11})$$

Nous supposons à partir de ce point que le temps de vie τ est indépendant de la position \mathbf{r} . Pour simplifier les calculs, nous supposons que les propriétés optiques sont les mêmes aux deux longueurs d'ondes. Nous avons donc $D_x = D_m = D$.

Nous cherchons maintenant à exprimer les moments de cette fonction de fluorescence, définie comme une somme de plusieurs fonctions. Pour alléger l'écriture, nous allons omettre de préciser la dépendance en $(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d)$ pendant les calculs, tout en gardant en tête que les fonctions se rapportent à un couple source-détecteur donné. Or, pour une fonction F définie par une somme de fonctions, telle que $F(\omega) = \sum_v F_v(\omega)$, on a la propriété suivante sur les moments m_1 et m_2 (voir démonstration en annexe A) :

$$m_0(F) \times m_k(F) = \sum_v m_k(F_v) m_0(F_v) \quad (\text{Eq. 5-12})$$

Nous pouvons donc appliquer cette formule à Φ_f avec

$$F_v(\omega) = \frac{\alpha}{D^2} G_x(r_{sr_v}, \omega) \frac{\eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v)}{1 + i\omega\tau} G_m(r_{r_v d}, \omega) h^3 \quad (\text{Eq. 5-13})$$

Or, nous connaissons les expressions des moments $m_0(F_v)$, $m_1(F_v)$ et de la variance V de F_v . En effet, F_v est le produit de trois fonctions, $m_1(F_v)$ est donc la somme des temps moyens de G_x , G_m et du déclin de fluorescence. De même pour la variance qui est la somme des trois variances. Ensuite, le moment d'ordre 2, m_2 , est exprimé en fonction de la variance et du moment d'ordre 1 :

$$F_v(\omega = 0) = \frac{1}{D^2} G_x(r_{sr_v}, \omega = 0) G_m(r_{r_v d}, \omega = 0) \alpha h^3 \eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v) \quad (\text{Eq. 5-14})$$

$$m_1(F_v) = \frac{r_{sr_v} + r_{r_v d}}{2c\sqrt{\mu_a D}} + \tau \quad (\text{Eq. 5-15})$$

$$m_2(F_v) = V(F_v) + m_1(F_v)^2 \quad (\text{Eq. 5-16})$$

$$= \frac{r_{sr_v} + r_{r_v d}}{4c^2\sqrt{\mu_a^3 D}} + \tau^2 + \left[\frac{r_{sr_v} + r_{r_v d}}{2c\sqrt{\mu_a D}} + \tau \right]^2 \quad (\text{Eq. 5-17})$$

Nous pouvons alors calculer les quantités d'intérêt :

Temps moyen :

$$m_0(\Phi_f) \times m_1(\Phi_f) = \sum_v \left\{ \left(\frac{r_{sr_v} + r_{r_v d}}{2c\sqrt{\mu_a D}} + \tau \right) \frac{1}{D^2} G_x(r_{sr_v}, \omega = 0) \right. \\ \left. \times G_m(r_{r_v d}, \omega = 0) \alpha h^3 \eta(\mathbf{r}) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}) \right\} \quad (\text{Eq. 5-18})$$

Moment d'ordre 2 :

$$m_0(\Phi_f) \times m_2(\Phi_f) = \sum_v \left\{ \left(\frac{r_{sr_v} + r_{r_v d}}{4c^2\sqrt{\mu_a^3 D}} + \tau^2 + \left[\frac{r_{sr_v} + r_{r_v d}}{2c\sqrt{\mu_a D}} + \tau \right]^2 \right) \frac{1}{D^2} G_x(r_{sr_v}, \omega = 0) \right. \\ \left. \times G_m(r_{r_v d}, \omega = 0) \alpha h^3 \eta(\mathbf{r}) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}) \right\} \quad (\text{Eq. 5-19})$$

Nous disposons donc maintenant d'un jeu d'équations linéaires vis-à-vis de l'inconnue $\alpha \eta(\mathbf{r}) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r})$, qui est proportionnelle à la concentration. Les équations peuvent être réécrites de la façon suivante, en considérant le terme multiplicatif devant la concentration comme un terme de poids noté P :

$$\begin{cases} m_0(\Phi_f) \times m_1(\Phi_f) = \sum_v P_{(r_s, r_d), r_v}^{m_0 m_1} [\alpha \eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v)] \\ P_{(r_s, r_d), r_v}^{m_0 m_1} = \left(\frac{r_{sr_v} + r_{r_v d}}{2c\sqrt{\mu_a D}} + \tau \right) \frac{1}{D^2} G_x(r_{sr_v}, \omega = 0) G_m(r_{r_v d}, \omega = 0) h^3 \end{cases} \quad (\text{Eq. 5-20})$$

$$\begin{cases} m_0(\Phi_f) \times m_2(\Phi_f) = \sum_v P_{(r_s, r_d), r_v}^{m_0 m_2} [\alpha \eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v)] \\ P_{(r_s, r_d), r_v}^{m_0 m_2} = \left(\frac{r_{sr_v} + r_{r_v d}}{4c^2 \sqrt{\mu_a^3 D}} + \tau^2 + \left[\frac{r_{sr_v} + r_{r_v d}}{2c\sqrt{\mu_a D}} + \tau \right]^2 \right) \\ \times \frac{1}{D^2} G_x(r_{sr_v}, \omega = 0) G_m(r_{r_v d}, \omega = 0) \end{cases} \quad (\text{Eq. 5-21})$$

Exprimons ce système d'équations sous forme matricielle, avec N voxels et M couples source-détecteur. Le poids P est indexé par les indices (i, j) , i se rapporte au numéro du couple source-détecteur, et j se rapporte au numéro du voxel.

$$\begin{vmatrix} m_0(r_{s1}, r_{d1}) \\ \vdots \\ m_0(r_{sM}, r_{dM}) \\ \\ m_0(r_{s1}, r_{d1}) m_1(r_{s1}, r_{d1}) \\ \vdots \\ m_0(r_{sM}, r_{dM}) m_1(r_{sn}, r_{dM}) \\ \\ m_0(r_{s1}, r_{d1}) m_2(r_{s1}, r_{d1}) \\ \vdots \\ m_0(r_{sM}, r_{dM}) m_2(r_{sn}, r_{dM}) \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} P_{11}^{m_0} & \dots & \dots & P_{1N}^{m_0} \\ \vdots & \ddots & \ddots & \vdots \\ P_{M1}^{m_0} & \dots & \dots & P_{MN}^{m_0} \\ \\ P_{11}^{m_0 m_1} & \dots & \dots & P_{1N}^{m_0 m_1} \\ \vdots & \ddots & \ddots & \vdots \\ P_{M1}^{m_0 m_1} & \dots & \dots & P_{MN}^{m_0 m_1} \\ \\ P_{11}^{m_0 m_2} & \dots & \dots & P_{1n}^{m_0 m_2} \\ \vdots & \ddots & \ddots & \vdots \\ P_{n1}^{m_0 m_2} & \dots & \dots & P_{1n}^{m_0 m_2} \end{vmatrix} \cdot \begin{vmatrix} \alpha \eta(\mathbf{r}_1) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_1) \\ \vdots \\ \\ \\ \vdots \\ \alpha \eta(\mathbf{r}_N) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_N) \end{vmatrix} \quad (\text{Eq. 5-22})$$

Il faut donc inverser le système : $M_{mesures} = P [\alpha \eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v)]$ où la matrice M représente les produits de moments mesurés, pour retrouver l'inconnue proportionnelle à la concentration de fluorophore en chaque voxel. Pour résoudre le problème inverse, il existe de nombreuses techniques de reconstruction que nous ne traiterons pas ici et qui peuvent être trouvées dans la référence [70].

Approche normalisée Cette approche est celle qui est plus particulièrement développée par Lam *et al* [1]. Les auteurs norment la fonction de fluorescence par la fonction d'excitation. La même démarche que précédemment peut être suivie en changeant la fonction de poids et la quantité mesurée.

Φ_f est normée à la fonction analogue mesurée à la longueur d'onde d'excitation notée $\Phi_{\lambda_x}(r_{sd}, \omega)$. Cette fonction est mesurée pour les mêmes positions de source et de détecteur que la mesure de fluorescence. Elle est exprimée sous la forme suivante, en fonction de la fonction de Green G_x à la longueur d'onde d'excitation :

$$\Phi_{\lambda_x}(r_{sd}, \omega) = \alpha' G_x(r_{sd}, \omega) \quad (\text{Eq. 5-23})$$

avec α' un coefficient de proportionnalité qui dépend des conditions expérimentales. Remarquons que même si la puissance laser est identique pour les mesures de fluorescence, α' n'est pas égal au coefficient α défini ci-dessus car d'une part, la mesure est réalisée sans les filtres d'émission et d'autre part, le rendement quantique du détecteur n'est pas le même aux deux longueurs d'ondes. La nouvelle fonction Φ^N a pour expression discrétisée sur les voxels :

$$\Phi^N(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \omega) = \frac{\alpha}{\alpha'} \sum_v \frac{1}{D_m} \frac{1}{G_x(r_{sd}, \omega)} G_x(r_{sr_v}, \omega) \frac{\eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v)}{1 + i\omega\tau(\mathbf{r}_v)} G_m(r_{r_v d}, \omega) h^3 \quad (\text{Eq. 5-24})$$

De la même façon que précédemment, nous écrivons $\Phi^N = \sum_v F_v^N(\omega)$ pour mener les calculs que nous donnons ici pour le temps moyen. Nous effectuons à nouveau les approximations $D_x = D_m = D$ et τ indépendant de \mathbf{r} . F_v^N ne diffère de F_v que par la division par G_x . Son temps moyen est donc celui de F_v auquel il faut soustraire celui de G_x . Les moments de F_v^N ont donc pour expression :

$$F_v^N(\omega = 0) = \frac{1}{D} \frac{G_x(r_{sr_v}, \omega = 0) G_m(r_{r_v d}, \omega = 0)}{G_x(r_{sd}, \omega = 0)} \frac{\alpha}{\alpha'} h^3 \eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v) \quad (\text{Eq. 5-25})$$

$$m_1(F_v^N) = \frac{r_{sr_v} + r_{r_v d}}{2c\sqrt{\mu_a D}} + \tau - \frac{r_{sd}}{2c\sqrt{\mu_a D}} \quad (\text{Eq. 5-26})$$

Ce qui conduit au système linéaire :

$$m_0(\Phi^N) \times m_1(\Phi^N) = \sum_v P_{(r_s, r_d), r_v}^{m_0 m_1} \left[\frac{\alpha}{\alpha'} \eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v) \right] \quad (\text{Eq. 5-27})$$

$$P_{(r_s, r_d), r_v}^{m_0 m_1} = \left(\frac{r_{sr_v} + r_{r_v d} - r_{sd}}{2c\sqrt{\mu_a D}} + \tau \right) \frac{1}{D} \frac{G_x(r_{sr_v}, \omega = 0) G_m(r_{r_v d}, \omega = 0)}{G_x(r_{sd}, \omega = 0)} h^3 \quad (\text{Eq. 5-28})$$

5.3.2 Adaptation de la méthode différentielle

Nous souhaitons désormais adapter la méthode différentielle présentée dans la section 5.2 au cas plus général d'une distribution spatiale de fluorophores, de façon à s'affranchir du temps de vie de fluorescence et du temps moyen de la réponse de l'instrument. Nous choisissons de normer, dans le domaine fréquentiel, chaque signal de fluorescence à un autre signal de fluorescence particulier. Cette méthode a fait l'objet du dépôt d'un brevet [112].

Une possibilité pour ce signal de fluorescence particulier est celui pour lequel le temps moyen est le plus petit. Parmi toutes les mesures, il faut donc repérer le couple source-détecteur (noté $\mathbf{r}_{sm} - \mathbf{r}_{dm}$) pour lequel le temps moyen de la TPSF est le plus petit : cette mesure est notée $\phi^{min}(\mathbf{r}_{sm}, \mathbf{r}_{dm})$. Elle est choisie car c'est aussi elle qui possède la plus grande amplitude et donc le meilleur rapport signal sur bruit pour une puissance de la lumière d'excitation constante sur les acquisitions. Les nouvelles fonctions considérées sont maintenant définies par :

$$\boxed{\Phi^N(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \omega) = \frac{\Phi_f(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \omega)}{\Phi^{min}(\mathbf{r}_{sm}, \mathbf{r}_{dm}, \omega)}} \quad (\text{Eq. 5-29})$$

Nous pouvons préciser l'expression de $\Phi^{min}(\mathbf{r}_{sm}, \mathbf{r}_{dm})$:

$$\Phi^{min}(\mathbf{r}_{sm}, \mathbf{r}_{dm}, \omega) = \alpha \sum_{v=\text{voxels}} \frac{1}{D_x D_m} G_x(r_{smr_v}, \omega) \frac{\eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v)}{1 + i\omega\tau(\mathbf{r}_v)} G_m(r_{r_v d_m}, \omega) h^3 \quad (\text{Eq. 5-30})$$

où le facteur α reste le même que précédemment puisque les conditions expérimentales n'ont pas changé. Nous prenons à nouveau les approximations $D_x = D_x = D$ et τ indépendant de \mathbf{r}_v . Calculons le temps moyen de la fonction Φ^N :

$$m_1(\Phi^N) = m_1\left(\frac{\Phi_f}{\Phi^{min}}\right) \quad (\text{Eq. 5-31})$$

$$= m_1(\Phi_f) - m_1(\Phi^{min}) \quad (\text{Eq. 5-32})$$

L'expression du temps moyen $m_1(\Phi_f)$ a été calculée dans la Section 5.3.1, équation (Eq. D-18) :

$$m_1(\Phi_f) = \frac{1}{m_0(\Phi_f)} \sum_v \left\{ \left(\frac{r_{sr_v} + r_{r_v d}}{2c\sqrt{\mu_a D}} + \tau \right) \frac{1}{D^2} G_x(r_{sr_v}, \omega = 0) \right. \\ \left. \times G_m(r_{r_v d}, \omega = 0) \alpha h^3 \eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v) \right\} \quad (\text{Eq. 5-33})$$

Rappelons l'expression de $m_0(\Phi_f)$:

$$m_0(\Phi_f) = \sum_v \frac{1}{D^2} G_x(r_{sr_v}, \omega = 0) G_m(r_{r_v d}, \omega = 0) \alpha h^3 \eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v) \quad (\text{Eq. 5-34})$$

Grâce à l'hypothèse τ est indépendant de \mathbf{r}_v , le temps de vie sort alors de la somme et on peut simplifier l'expression de $m_1(\Phi_f)$:

$$m_1(\Phi_f) = \frac{1}{m_0(\Phi_f)} \sum_v \left\{ \left(\frac{r_{sr_v} + r_{r_v d}}{2c\sqrt{\mu_a D}} \right) \frac{1}{D^2} G_x(r_{sr_v}, \omega = 0) \right. \\ \left. \times G_m(r_{r_v d}, \omega = 0) \alpha h^3 \eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v) \right\} + \tau \quad (\text{Eq. 5-35})$$

Pour $m_1(\Phi^{min})$, l'expression est la même, en changeant Φ par Φ^{min} et \mathbf{r}_s par \mathbf{r}_{s_m} (respectivement \mathbf{r}_d par \mathbf{r}_{d_m}). Ainsi dans le calcul du temps moyen de Φ^N , le temps de vie de fluorescence disparaît dans la soustraction et on obtient :

$$m_1(\Phi^N) = \frac{1}{m_0(\Phi_f)} \sum_v \left\{ \left(\frac{r_{sr_v} + r_{r_v d}}{2c\sqrt{\mu_a D}} \right) \frac{1}{D^2} G_x(r_{sr_v}, \omega = 0) G_m(r_{r_v d}, \omega = 0) \alpha h^3 \eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v) \right\} \\ - \frac{1}{m_0(\Phi^{min})} \sum_v \left\{ \left(\frac{r_{s_m r_v} + r_{r_v d_m}}{2c\sqrt{\mu_a D}} \right) \frac{1}{D^2} G_x(r_{s_m r_v}, \omega = 0) G_m(r_{r_v d_m}, \omega = 0) \alpha h^3 \eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v) \right\} \\ (\text{Eq. 5-36})$$

Nous pouvons exprimer cette quantité de façon linéaire en fonction de $\alpha \eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v)$ la quantité à reconstruire, en introduisant une fonction de poids $P_{(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d), \mathbf{r}_v}^{m_0 m_1}$:

$$m_1(\Phi^N) = \sum_v P_{(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d), \mathbf{r}_v}^{m_0 m_1} \cdot [\alpha \eta(\mathbf{r}_v) \mu_{ax \rightarrow m}(\mathbf{r}_v)] \quad (\text{Eq. 5-37})$$

Avec

$$P_{(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d), \mathbf{r}_v}^{m_0 m_1} = \frac{1}{m_0(\Phi_f)} \left\{ \left(\frac{r_{sr_v} + r_{r_v d}}{2c\sqrt{\mu_a D}} \right) \frac{1}{D^2} G_x(r_{sr_v}, \omega = 0) G_m(r_{r_v d}, \omega = 0) h^3 \right\} \\ - \frac{1}{m_0(\Phi^{min})} \left\{ \left(\frac{r_{s_m r_v} + r_{r_v d_m}}{2c\sqrt{\mu_a D}} \right) \frac{1}{D^2} G_x(r_{s_m r_v}, \omega = 0) G_m(r_{r_v d_m}, \omega = 0) h^3 \right\} \\ (\text{Eq. 5-38})$$

En résumé, $m_1(\Phi^N)$ est mesuré, les rapports $\frac{1}{m_0(\Phi_f)}$ et $\frac{1}{m_0(\Phi^{min})}$ sont eux aussi mesurés et injectés dans la fonction de poids P qui est calculée : le système d'équations linéaires est ainsi établi, indépendamment de la valeur du temps de vie de fluorescence.

5.4 Utilisation d'une caméra rapide

Une des perspectives de ce travail de thèse est l'utilisation d'une caméra rapide comme détecteur, au lieu de la détection par fibres avec le système TCSPC. L'avantage par rapport à un système de balayage TCSPC est la possibilité rapide de visualisation en deux dimensions, ce qui donne également autant de détecteurs que de pixels de la caméra. Nous ne disposons pas d'une telle caméra. Le travail a été réalisé dans le cadre du projet européen LASERLAB. Il a été effectué dans le centre CUSBO (*Center for Ultrafast Science and Biomedical Optics*) dans l'équipe du Pr. Rinaldo Cubbedu à l'Institut Polytechnique de Milan. Le soutien et l'expérience de cette équipe pour l'utilisation de la caméra ont permis la réalisation de ce travail.

5.4.1 Description du dispositif

5.4.1.1 Fonctionnement de la caméra

Nous décrivons ici brièvement le fonctionnement de la caméra rapide. Il s'agit d'une caméra CCD intensifiée ultrarapide (*Gated Intensified High Speed Camera* ou *High Rate Imager* en anglais). Elle comprend deux éléments principaux :

- un intensificateur ultrarapide (tube à photocathode AsGa - 18 mm de diamètre) : une optique focalise les photons sur une photocathode à l'entrée du tube. Dès qu'un photon arrive sur la photocathode, il provoque la création d'un photoélectron qui va être amplifié de l'ordre de $5 \cdot 10^4$ fois par des galettes à microcanaux. Les électrons sont finalement réceptionnés à la sortie du tube par un écran luminescent. Le gain global de ces systèmes est d'environ 10^6 . La résolution spatiale de l'intensificateur est supérieure à 8 lignes par millimètre.
- une caméra CCD est placée derrière l'écran luminescent. Le couplage avec la CCD est réalisé par une optique. Il s'agit d'une caméra 12 bits utilisée en 8 bits (soit 256 niveaux de gris), 1280×1024 en binning 4×4 ce qui donne un nombre de pixels effectifs 320×256 (remarque : c'est l'intensificateur qui limite la résolution spatiale).

L'intensificateur peut être vu comme un obturateur ultrarapide qui va permettre à la caméra de faire des acquisitions sur des fenêtres temporelles très courtes (300 ps) qui vont être décalées en temps. Pour cela, un signal électronique active l'ouverture de cette fenêtre à un temps t après le signal de synchronisation. Puis un système de retard décale ce temps par pas de 50 ps de façon à couvrir tous les temps. La courbe temporelle ou TPSF est reconstruite à partir de tous ces temps.

Le montage expérimental est représenté sur la figure 5.17. Il est détaillé dans la référence [113]. Une des différences avec le système TCSPC est la largeur de la réponse de l'instrument (IRF) qui est d'environ 500 ps (à comparer aux 80 ps du système TCSPC). Nous avons établi un protocole pour la mesurer sur notre système en réflexion. Une feuille d'aluminium (côté mat) a été placée à la surface du liquide pour effectuer la mesure qui est représentée sur la figure 5.18. Nous avons également représenté une mesure typique de fluorescence.

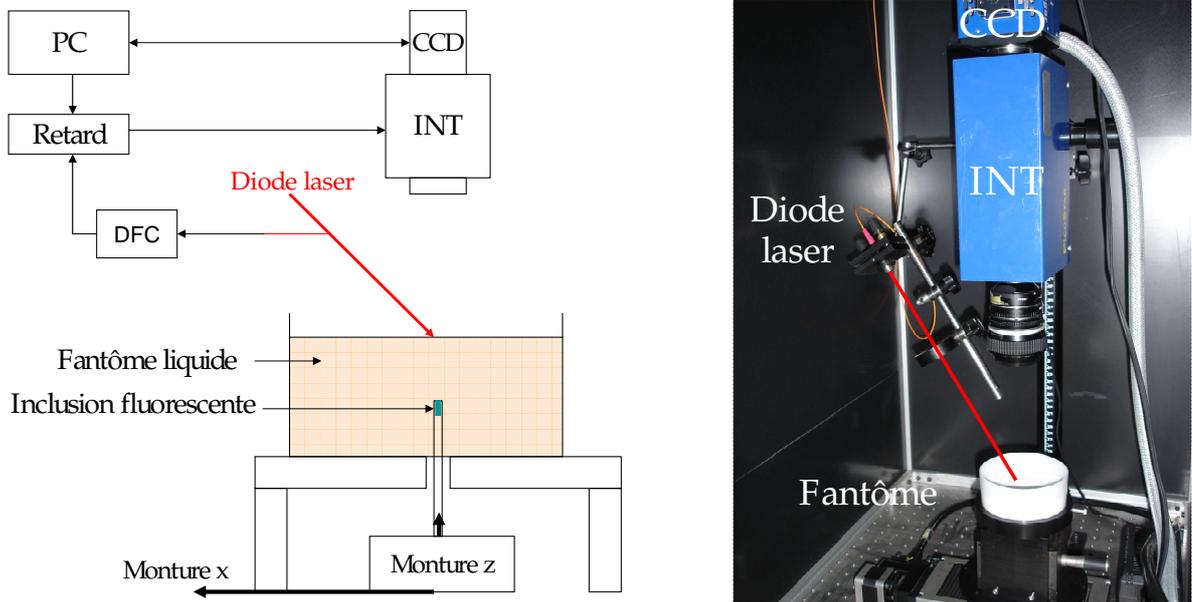


FIG. 5.17: Schéma (à gauche) et photo (à droite) du montage expérimental avec la caméra rapide, INT : intensificateur, DFC : Discriminateur à fraction constante.

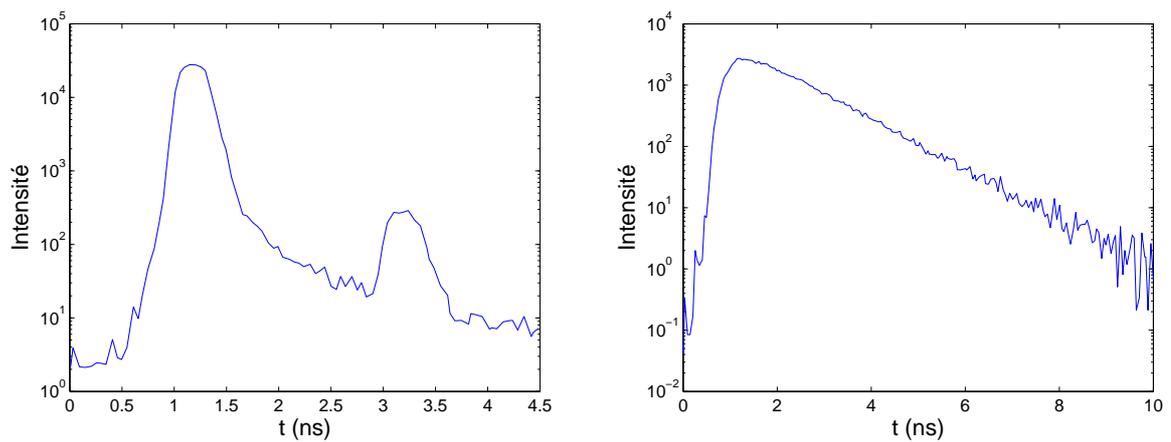


FIG. 5.18: IRF (à gauche) et signal typique de fluorescence (à droite) mesurés avec la caméra rapide (inclusion à $z = 0.44$ cm, laser au-dessus, mesure à 5 mm du centre).

5.4.1.2 Prétraitement des données

Nous décrivons ici comment les TPSFs sont extraites des données brutes, selon les recommandations de l'équipe CUSBO. Nous appelons « *image* » une acquisition faite par la caméra à un temps t donné (appelé « *délat* ») pendant une ouverture de 300 ps (appelée « *gate* ») et pour un temps d'acquisition total donné, et pour un certain gain de la caméra. Chaque image est enregistrée dans fichier de données brutes qui possède un en-tête (ou « *header* ») contenant les informations précédentes.

Le logiciel Matlab est utilisé pour lire les images. Les données brutes sont lues et sauvegardées sous la variable C qui est une matrice à trois dimensions : le temps, les deux dimensions x et y de chaque image. Ensuite, le signal d'obscurité $CBKG$ est soustrait.

Ce signal est une image de noir, laser éteint, prise au même temps d'acquisition que l'image. Il représente un signal résiduel qui s'ajoute à chaque image. Ses valeurs sont indépendantes du temps d'acquisition : seul le bruit de lecture de la caméra intervient pour les faibles temps considérés qui sont inférieurs à 15 s.

$$C = C - CBKG \quad (\text{Eq. 5-39})$$

Finalement, le gain effectif $gain_n$ de la caméra est pris en compte. Il nécessite la connaissance d'une fonction de calibration mesurée au préalable. Les données sont multipliées par ce gain :

$$C = gain_n \times C \quad (\text{Eq. 5-40})$$

Les données sont enfin mises en forme pour être visualisées sous forme d'image avec Matlab. Une TPSF en un point (x, y) correspond aux valeurs de la matrice C selon la dimension du temps.

5.4.2 Analyse des mesures

Avant d'aborder la résolution du problème inverse, une analyse des mesures va permettre de dégager les spécificités et l'intérêt des mesures avec la caméra. Nous n'avons pas pu effectuer la soustraction du signal résiduel car une réflexion parasite a perturbé cette mesure. Nous représentons des données uniquement corrigées de l'image de noir. Les mesures ont été réalisées sur un fantôme optique de coefficients $\mu_a=0.04 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu'_s=12.4 \text{ cm}^{-1}$.

5.4.2.1 Images d'intensité

Si l'on somme l'ensemble des images aux différents temps, on obtient une image en intensité qui est l'équivalent d'une image en mode continu. Sur la figure 5.19, nous avons représenté la somme des images pour les différentes profondeurs, que nous avons divisée par le temps d'acquisition d'une image. Nous avons placé la source au-dessus de l'inclusion.

La tâche de diffusion est d'autant plus large que l'inclusion est située en profondeur. Elle est bien symétrique autour de l'inclusion. On peut cependant remarquer des défauts près du centre pour certaines profondeurs comme $z = 0.44 \text{ cm}$ ou $z = 1.04$

cm par exemple. Cela souligne que la source ne se trouve pas exactement au-dessus de l'inclusion.

5.4.2.2 Images de temps moyens

Il est également intéressant de tracer les cartes de temps moyens. La figure 5.20 illustre la distribution des temps moyens mesurés pour les six profondeurs précédemment citées. Ils ne sont pas corrigés du temps moyen de l'IRF. On constate bien que plus la profondeur de l'inclusion est élevée, plus les temps moyens augmentent.

5.4.2.3 Temps moyens

Pour établir une comparaison avec les formules en milieu infini et avoir une représentation des points qui devraient avoir des temps moyens équivalents, nous représentons les temps moyens mesurés en fonction de la somme des distances source-inclusion et inclusion-détecteur que nous notons à nouveau $r_{sr} + r_{rd}$. La figure 5.21 donne cette représentation pour la profondeur $z = 0.34$ cm et une grille de détecteurs que nous avons choisie, de façon arbitraire, centrée sur l'inclusion (49×49 détecteurs, pas de 0.06 cm). Elle permet de voir l'allure globale de la courbe qui apparaît linéaire. Nous observons aussi la dispersion des temps moyens mesurés qui est d'environ 15 ps pour les plus petites distances, jusqu'à 50 ps pour les plus grandes distances.

Pour mieux observer le comportement de la courbe, nous la traçons en moyennant les temps moyens sur des anneaux concentriques pour les profondeurs $z = 0.24, 0.34, 0.44, 0.64, 0.84$ et 1.04 cm (figure 5.22). Nous représentons également une régression linéaire et l'expression théorique du temps moyen :

- La régression linéaire est tracée sur les neuf derniers points. On observe bien un comportement linéaire sur ces derniers points qui sont les plus éloignés du point source. La pente de la régression linéaire est constante autour de 0.54 sauf pour la profondeur 1.04 cm où elle est égale à 0.63. Rappelons que si nous étions en milieu infini, la relation théorique serait exactement linéaire et la pente serait égale à $1/(2c\sqrt{\mu_a D}) = 0.65$.
- Nous comparons ces courbes avec l'expression théorique du temps moyen en milieu semi-infini, que nous avons établie au chapitre 4. Nous calculons ses valeurs pour différentes positions de détecteurs et avec $r_{sr} + r_{rd}$ en abscisse. Un temps de vie théorique de 0.96 ns est choisi. Le temps moyen mesuré de l'IRF est ajouté, il est égal à 2.20 ns. Ces deux éléments ajoutent un décalage qui doit être le même pour toutes les courbes. L'accord des pentes est bon sur les différents graphiques, un peu moins pour la dernière profondeur. Le décalage avec la mesure dépend du temps de vie et du temps moyen de l'IRF. Il est donc plus arbitraire que la pente. Compte tenu de cette remarque, l'accord est également assez bon, avec une différence d'une vingtaine de picosecondes environ, sauf pour la profondeur 1.04 cm où l'écart est de soixante picosecondes environ. Les variations de ce décalage sont assez délicates à interpréter.

Il ne faut pas non plus oublier que ce sont les données brutes qui sont représentées. Elles ne sont pas corrigées du signal résiduel qui comprend le signal d'excitation et l'autofluorescence de l'Intralipide.

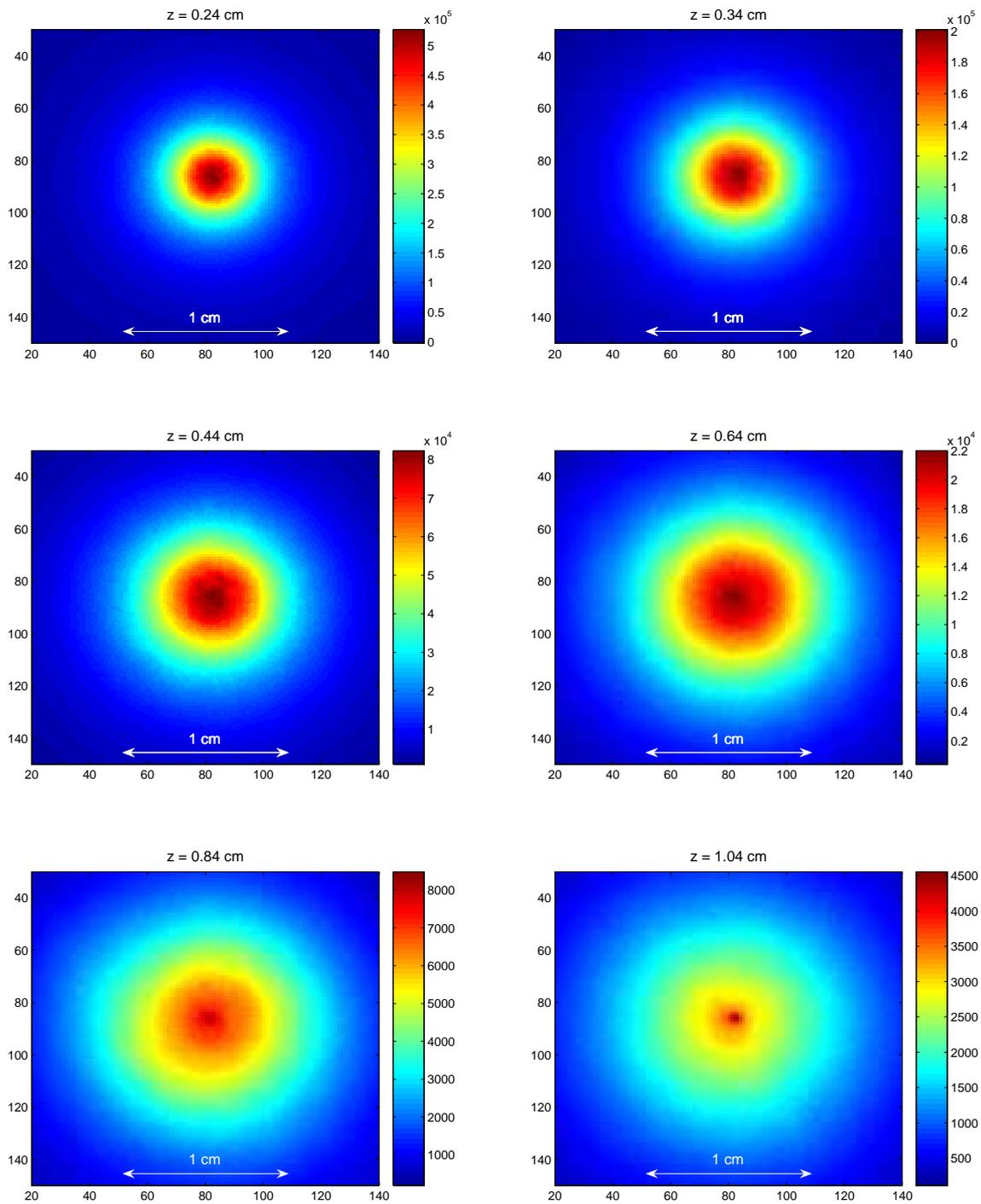


FIG. 5.19: Cartes d'intensité pour les profondeurs $z = 0.24, 0.34, 0.44, 0.64, 0.84$ et 1.04 cm, ramenées au même temps d'intégration de 1 s.

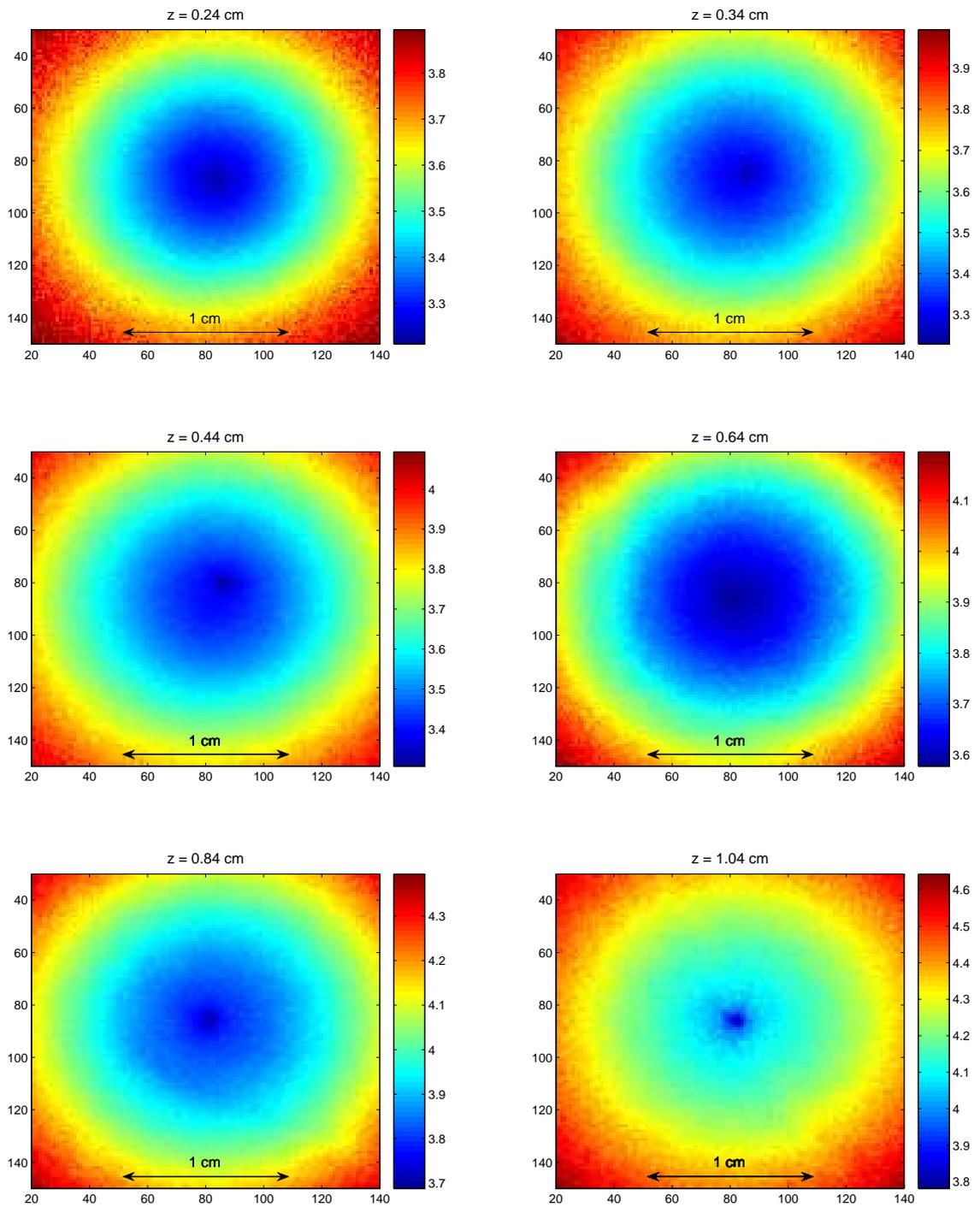


FIG. 5.20: Cartes des temps moyens (en ns) pour les profondeurs $z = 0.24, 0.34, 0.44, 0.64, 0.84$ et 1.04 cm.

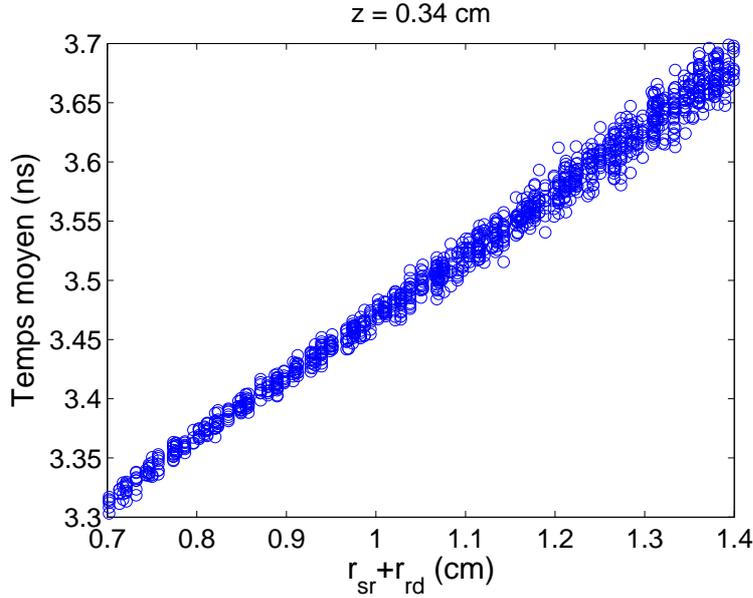


FIG. 5.21: Temps moyens en fonction du chemin $r_{sr} + r_{rd}$ pour la profondeur $z = 0.34$ cm.

5.4.3 Résolution du problème inverse

5.4.3.1 Expression du problème inverse

Nous avons voulu transposer l'approche précédente avec le système TCSPC aux acquisitions faites avec la caméra rapide. L'expression théorique du problème inverse est donc la même que celle de la section 5.2.2, la variable étant toujours la différence entre le temps moyen et le plus petit des temps moyens.

La géométrie est ici différente de la précédente car nous avons un point source unique et autant de détecteurs que de pixels sur la caméra. Nous faisons ici une remarque avant de revenir sur la géométrie. Rappelons l'expression de la variable $\Delta \langle t \rangle_{signal,i}$:

$$\begin{aligned}
 \Delta \langle t \rangle_{signal,i} &= \langle t \rangle_{signal,i} - \min(\langle t \rangle_{signal,i}) \quad i \in [1, N] \\
 &= \frac{r_{sr,i} + r_{rd,i}}{2c\sqrt{\mu_a D}} - \frac{r_{s_m r} + r_{rd_m}}{2c\sqrt{\mu_a D}} \\
 &= \frac{r_{rd,i}}{2c\sqrt{\mu_a D}} - \frac{r_{rd_m}}{2c\sqrt{\mu_a D}}
 \end{aligned} \tag{Eq. 5-41}$$

Comme la position de la source ne change pas, on a $s = s_{min}$ ce qui rend cette variable indépendante de la position de la source. Une erreur sur le positionnement de la source n'aura pas d'influence sur la localisation.

Nous devons donc choisir une matrice de détecteurs parmi les pixels de la caméra. Le programme de localisation avec le système TCSPC a été adapté pour pouvoir traiter les données de la caméra. Les grandes différences sont le raisonnement en pixels et le mode d'extraction des TSPFs des images.

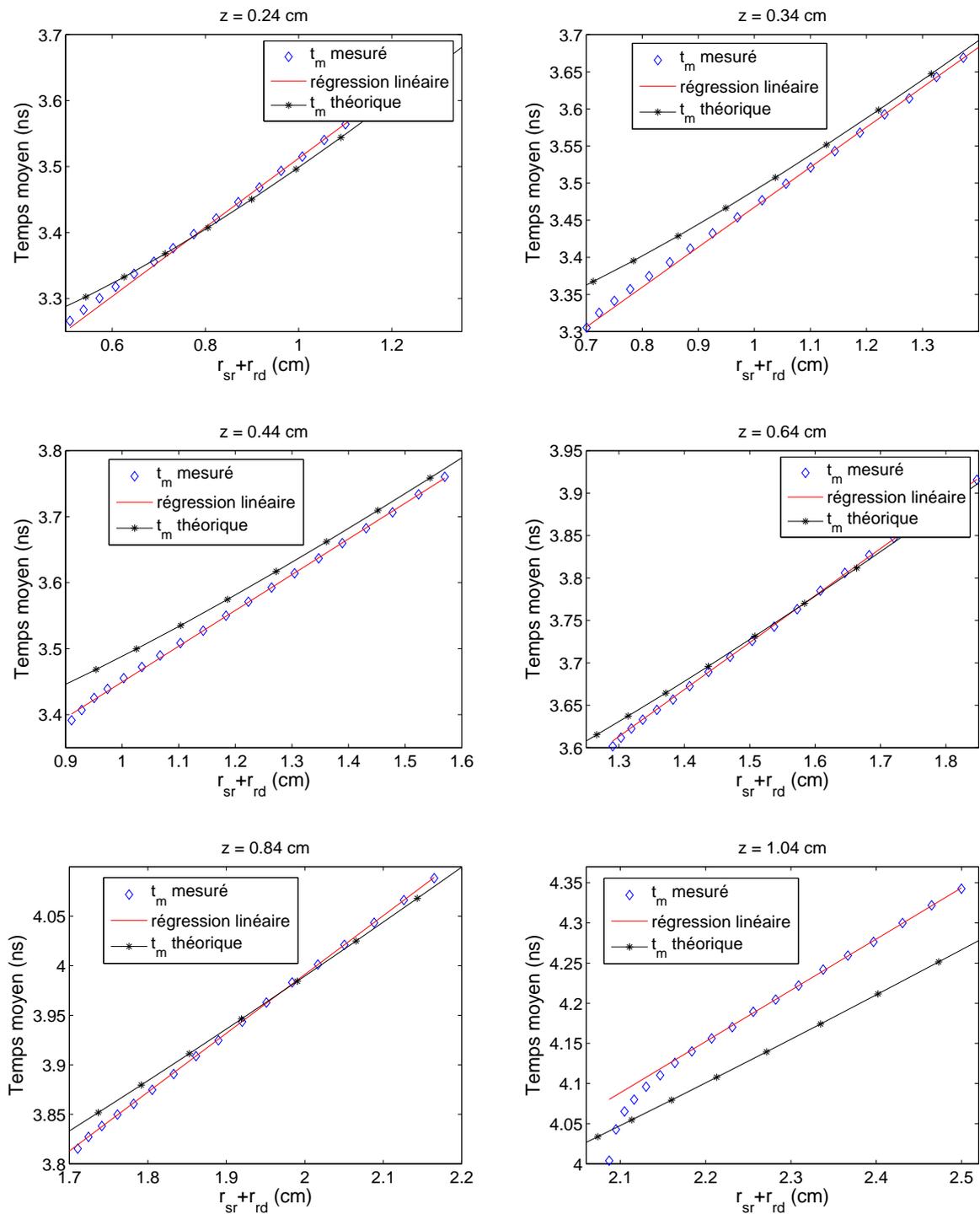


FIG. 5.22: Temps moyens en fonction du chemin $r_{sr} + r_{rd}$ pour les profondeurs $z = 0.24, 0.34, 0.44, 0.64, 0.84$ et 1.04 cm, moyennés sur des anneaux centrés autour de l'inclusion. La régression linéaire prend en compte les neuf derniers points.

Les données d'entrée sont les suivantes :

- les coefficients optiques μ_a et μ'_s ,
- la calibration, c'est-à-dire combien de pixels correspondent à un centimètre,
- la position estimée r_0 initiale de l'inclusion,
- la position de la grille de détecteurs : son centre, son nombre de détecteurs et la taille du pas.

Nous avons différentes étapes du programme pour la localisation :

- tout d'abord, la grille de détecteurs est calculée en fonction des données d'entrée. Des détecteurs peuvent être sélectionnés en fonction de leur distance au centre la grille.
- ensuite, les TPSFs sont extraites des points choisis et leur temps moyen est calculé. La variable $\Delta \langle t \rangle_{signal,i}$ en est déduite. Pour le calcul des temps moyens, nous avons gardé la procédure de calcul de la section 4.4.5.1.
- enfin, la procédure de minimisation est semblable à celle décrite par la figure 5.2 à partir des variables $\Delta \langle t \rangle_{signal,i}$ qui sont comparées à un modèle. Nous avons modifié la fonction de minimisation en introduisant un poids qui est la distance entre le détecteur et le centre de la grille. En effet, plus on s'éloigne du centre, plus on a de détecteurs. Cette fonction permet donc de ne pas donner plus d'importance aux détecteurs qui sont plus nombreux.

5.4.3.2 Résultats préliminaires

Nous présentons ici quelques résultats préliminaires. En effet, comme nous ne pouvons pas corriger les signaux du signal résiduel, le modèle semi-infini n'est pas totalement validé. Il sera donc délicat d'interpréter les inversions avec ce modèle.

Pour étudier les résultats de l'inversion, nous choisissons une grille de 49×49 détecteurs centrée sur l'inclusion, de pas 0.06 cm. Le choix de cette grille est arbitraire, nous l'avons choisie car elle couvre une zone de 3 cm de côté avec un nombre raisonnable de détecteurs pour le calcul. A l'intérieur de cette grille, une zone délimitée par un rayon minimum r_{min} et par un rayon maximal r_{max} peut être choisie. La borne r_{min} sert, par exemple, à exclure la zone du point d'injection du laser lorsque celui-ci se trouve au-dessus de l'inclusion. La borne r_{max} est utilisée pour éliminer les zones qui ne contiennent plus de signal.

A l'heure actuelle, les résultats de l'inversion avec le modèle semi-infini ne sont pas exploitables. Par exemple, pour la profondeur $z=0.44$ cm, les résultats sont présentés sur la figure 5.23. Elle donne la profondeur calculée pour différents r_{min} , en fonction de la borne r_{max} qui varie à partir de $r_{min} + 0.1$ cm. Les résultats ne se stabilisent pas lorsque la borne supérieure augmente.

On observe le même type de comportement pour les autres profondeurs. Cela traduit le fait que le modèle n'est pas adapté aux données. En revanche, la localisation en (x, y) est bien déterminée, à quelques pixels près. Des mesures complémentaires avec mesure du signal parasite sont nécessaires pour travailler sur des données corrigées.

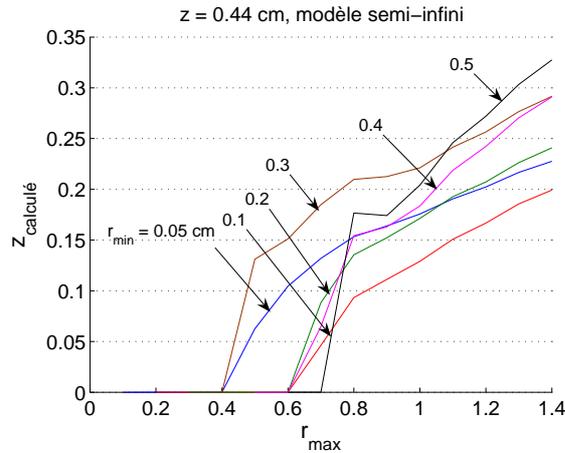


FIG. 5.23: Résultats de la procédure d'inversion en fonction de la borne r_{max} pour différentes bornes minimales.

Une autre approche plus empirique consiste à choisir comme formule du modèle :

$$\langle t \rangle_{model} = \alpha(r_{sr} + r_{rd}) \quad (\text{Eq. 5-42})$$

avec α la pente expérimentale que nous avons mesurée sur la figure 5.22. Cette approche donne des résultats cohérents. Ce fait était attendu puisque dans ce cas, le modèle est en accord avec les données mesurées. La figure 5.24 donne les profondeurs calculées pour la profondeur expérimentale $z=0.44$ cm. Les résultats se stabilisent autour de $z=0.41$ cm. On constate que pour chaque valeur de r_{min} , il faut une borne supérieure r_{max} suffisante avant d'avoir une stabilisation des résultats. Comme la variable est une différence de temps moyens, il faut que l'ensemble des détecteurs contienne suffisamment d'informations. Les résultats se stabilisent pour un r_{max} de l'ordre de 0.8 cm. Nous ne nous attendions pas à une valeur aussi élevée. Elle correspond à un chemin total des photons $r_{sr} + r_{rd}$ de l'ordre de 1.3 cm pour lequel la relation linéaire est valable.

Cette méthode d'analyse basée sur des régions de tailles variables permet de voir quelles données sont porteuses d'informations. Les autres profondeurs donnent des résultats similaires. Nous ne les approfondissons pas ici car cette méthode empirique n'est donnée qu'à titre d'exemple.

5.4.3.3 Conclusion

Nous avons mis en place un protocole expérimental utilisant une caméra rapide pour imager la surface d'un fantôme optique contenant une inclusion fluorescente. Ce protocole comprend les mesures de calibration, la mesure de la réponse de l'instrument, les mesures de noir, la mesure du signal résiduel, la connaissance de la puissance du laser pour pouvoir soustraire le signal parasite. De plus, les programmes d'analyse et de traitement des données ont été écrits pour cette configuration, en utilisant la méthode différentielle avec le temps moyen. L'exploitation des données doit être finalisée par des expériences complémentaires.

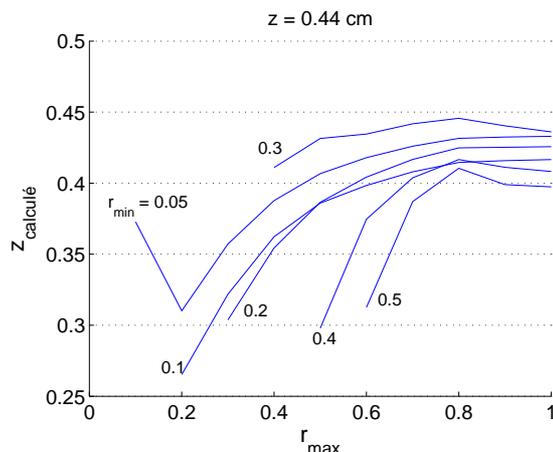


FIG. 5.24: Résultats de la procédure d'inversion en fonction de la borne r_{max} pour différentes bornes minimales.

Bilan du chapitre

Au cours de ce chapitre, nous avons présenté une méthode de localisation à partir d'une mesure au-dessus de l'inclusion. Les résultats en milieu infini utilisant le temps moyen montrent une très bonne localisation, à $200 \mu\text{m}$ près en relatif, pour des profondeurs séparées de 0.1 cm . Nous avons discuté la localisation absolue dont nous estimons la précision à environ $200 \mu\text{m}$. Pour éliminer les contraintes de cette première méthode, nous avons développé une méthode plus générale à partir d'un jeu de positions source-détecteur qui présente l'avantage de s'affranchir de la connaissance du temps de vie du fluorophore. Elle donne une précision de localisation en (x, y) et z à $200 \mu\text{m}$ près pour les mesures réalisées en milieu infini. Nous avons également exploré l'utilisation de la variance en milieu infini ainsi que les mesures en surface.

Nous avons ensuite étendu notre méthode au cas d'une distribution spatiale de fluorophore en normant la fonction de fluorescence par la fonction de temps moyen minimum. Nous en avons déduit l'expression du premier moment de cette fonction normée en fonction de la concentration du fluorophore. Enfin, nous avons analysé la possibilité de mettre en oeuvre notre méthode de localisation avec une caméra rapide. Le travail a consisté en la mise en place du protocole expérimental et de l'exploitation des images.

Conclusion et perspectives

Un dispositif de comptage de photons de type TCSPC a été mis en œuvre pour mesurer des courbes de dispersion temporelles sur des fantômes optiques avec pour objectif final la localisation d'une inclusion fluorescente. La modélisation des mesures et la confrontation à l'expérimentation a permis d'établir un prétraitement des données de façon à en extraire le seul signal d'intérêt. Nous avons montré qu'il est important d'éliminer à la fois le signal de fond, le signal d'excitation qui peut passer à travers les filtres mais aussi le signal d'autofluorescence du milieu dans le cas de certaines mesures de fluorescence à faible niveau de signal.

Lors de l'étude des propriétés optiques, nous avons introduit des modèles qui font le lien entre les mesures de surface et les mesures en milieu infini. Ils ont permis de déterminer les propriétés optiques pour des mesures à n'importe quelle profondeur sous la surface. Le modèle infini n'est pas adapté aux mesures en surface et notre étude a permis de déterminer, sur deux cas particuliers, la profondeur à partir de laquelle il peut être utilisé. Nous avons également montré que les mesures en profondeur étaient plus représentatives des propriétés optiques des fantômes utilisés comme référence. C'est ce type de mesures qui a été utilisé par la suite pour la caractérisation des fantômes optiques. Nous avons mis en évidence les limitations du modèle de diffusion pour interpréter les phénomènes de surface.

Afin de résoudre le problème de localisation d'un fluorophore dans un milieu diffusant, nous avons établi tout d'abord un modèle direct en milieu infini, d'après les expressions publiées dans la littérature. Les calculs pour obtenir les expressions analytiques du signal de fluorescence et des deux premiers moments (temps moyen et variance) ont été présentés. De façon à approcher une géométrie plus réaliste, nous avons établi une expression analytique des deux premiers moments en milieu semi-infini. Les expressions du signal en milieu infini ont été validées de façon expérimentale. Nous avons proposé une démarche pour calculer les moments sur des courbes expérimentales. Une bonne reproductibilité expérimentale et une adéquation avec le modèle ont été obtenues en milieu infini pour le temps moyen mais une plus grande sensibilité au bruit a été constatée pour la variance. La validation expérimentale pour les mesures en surface n'est pas totalement effectuée et nécessiterait des études plus spécifiques et approfondies.

Ensuite, les mesures et les validations précédentes ont été utilisées pour résoudre le problème inverse. A partir d'une mesure absolue au-dessus de l'inclusion, nous pouvons la localiser en profondeur grâce au temps moyen du signal de fluorescence. Une très bonne localisation relative en profondeur est obtenue à 200 μm près en faisant varier la position de l'inclusion sous les fibres. Par contre, la localisation absolue est sujette à différents *a priori* comme la variabilité du temps de vie de fluorescence et la connaissance du temps moyen de la réponse de l'instrument. La position de la source isotrope, utilisée dans le modèle de diffusion est également un facteur de discussion. Par ailleurs, le modèle de diffusion en surface ne permet pas la localisation de l'inclusion en profondeur.

Cette mesure absolue nécessite la connaissance de la position en (x, y) de l'inclusion. Nous avons ensuite augmenté le nombre de mesures pour lever cette contrainte. De plus en considérant une nouvelle variable qui est la différence entre le temps moyen mesuré et le plus petit des temps moyens, nous avons proposé une nouvelle méthode que nous avons nommée « méthode différentielle ». De cette manière, le temps de vie du fluorophore et le temps moyen de l'IRF ne sont plus des paramètres à connaître *a priori* pour la résolution du problème inverse. Cette méthode a été validée sur un jeu de mesures en milieu infini pour lequel nous avons localisé l'inclusion avec une bonne précision relative de l'ordre de 200 μm .

La méthode différentielle a été développée pour un fluorophore unique. Afin que les conditions expérimentales soient plus proches de cas réels, nous l'avons étendue à une distribution spatiale quelconque de fluorophores. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives pour imager des objets plus complexes avec plusieurs sites fluorescents et un fond faiblement fluorescent par exemple.

Enfin, nous avons adapté notre protocole de mesures à un autre type de détecteur qui est une caméra rapide. Un programme de calcul a été développé pour effectuer l'analyse des données et de résoudre le problème inverse. Les premiers résultats ont montré la faisabilité de ce type d'imagerie avec une caméra rapide. Nous avons constaté des écarts entre notre modèle et les mesures expérimentales, qui soulignent à nouveau les difficultés des modèles issus de l'approximation de la diffusion pour interpréter les mesures en surface. Ce modèle reste à affiner avant de mettre en oeuvre la résolution du problème inverse, avec la mesure du signal résiduel.

Ce travail servira de base pour la suite des recherches effectuées dans notre laboratoire. Les autres perspectives sont très nombreuses et comprennent l'exploration des mesures en surface avec l'évolution et l'enrichissement du modèle, des études sur les limites de détection, et aussi l'adaptation à des milieux hétérogènes et à des fluorophores de temps de vie différents. A terme, l'objectif de ces études vise à la fois les applications précliniques pour le petit animal et cliniques avec des marqueurs injectables à l'homme, dans le cadre du diagnostic du cancer du sein ou de la prostate, par exemple.

Annexe A

Photomultiplicateur R3809U-50

A.1 Principe de fonctionnement

Le photomultiplicateur est un dispositif qui permet la détection de photons en convertissant la lumière en courant électrique. Il est constitué d'une photocathode, d'électrodes de focalisation, d'un système d'amplification (soit des dynodes, soit des galettes de microcanaux) et d'une anode, le tout placé dans le vide. Dans notre cas, le système d'amplification est constitué de deux galettes de microcanaux (figure A.1).

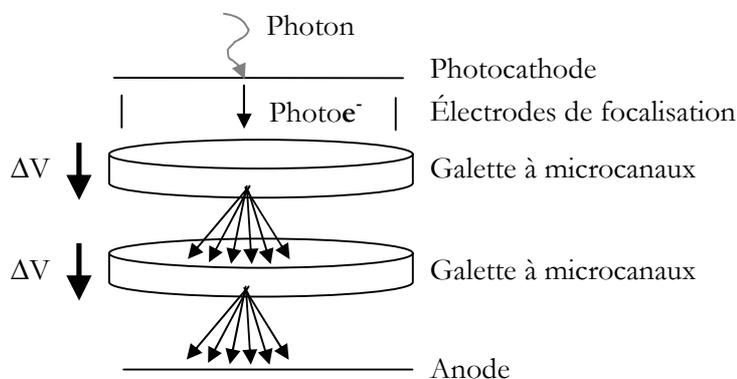


FIG. A.1: Schéma des principaux éléments du photomultiplicateur.

Un photon excite un électron libre du matériau déposé en interne sur la fenêtre du PM (appelé photocathode). Grâce au vide poussé et à un fort champ électrique, ces électrons, dénommés photoélectrons, sont aspirés et projetés sur des galettes de microcanaux (figure A.2) où des électrons libres du matériau déposés sont à leur tour excités. Ce sont des électrons secondaires, au nombre de 3 ou 4 par électron incident. Cette dernière multiplication est répétée plusieurs fois pour obtenir une amplification du signal, d'un facteur 10^4 à 10^8 . Le nuage d'électrons est collecté par une anode pour produire un courant utilisable en sortie du PM. Le PM convertit donc de la lumière (exprimée en Lumen ou en Watt) en courant (exprimé en Ampère).

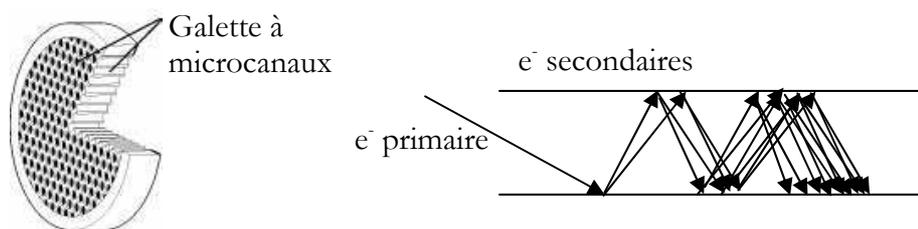


FIG. A.2: Schéma d'une galette à microcanaux et illustration de l'amplification des électrons par émission d'électrons secondaires.

A.2 Caractéristiques principales

Voici les caractéristiques principales du photomultiplicateur telles qu'elles sont données sur la feuille de test du constructeur :

Modèle	Hamamatsu R3809-U
Gain	$8 \cdot 10^5$
Coups d'obscurité	916 /s
Largeur de la réponse du PM	300 ps
Temps de montée	150 ps
Temps de descente	360 ps
TTS (FWHM)	25 ps
Courant maximum d'anode	100 nA
Nombre de coups maximum conseillé	$2 \cdot 10^4$ /s

TAB. 1-I: Tableau les caractéristiques principales du photomultiplicateur Hamamatsu R3809-U. Le TTS correspond à la dispersion du temps de transit.

Caractéristiques spectrales Elles sont représentées sur la figure A.3. La photocathode possède une bonne efficacité quantique dans le proche infrarouge (7 % à 600 nm et 2 % à 700 nm).

Réponse temporelle Le paramètre important est le TTS qui est la dispersion du temps de transit (*Transit Time Spread* ou *jitter* en anglais). Ce paramètre représente les fluctuations des temps de transit des impulsions électriques reçues par l'anode. Ce paramètre est très important pour qualifier la rapidité du PM, en plus des temps de montée et de descente.

Un autre paramètre intéressant est la réponse temporelle en tension du photomultiplicateur. La figure A.4 montre les données constructeur ainsi que le montage de mesure. Nous avons cherché à mesurer nous-même ce signal de sortie. Nous l'avons mesuré en sortie du préamplificateur à l'aide d'un oscilloscope rapide (figure A.5). Nous avons

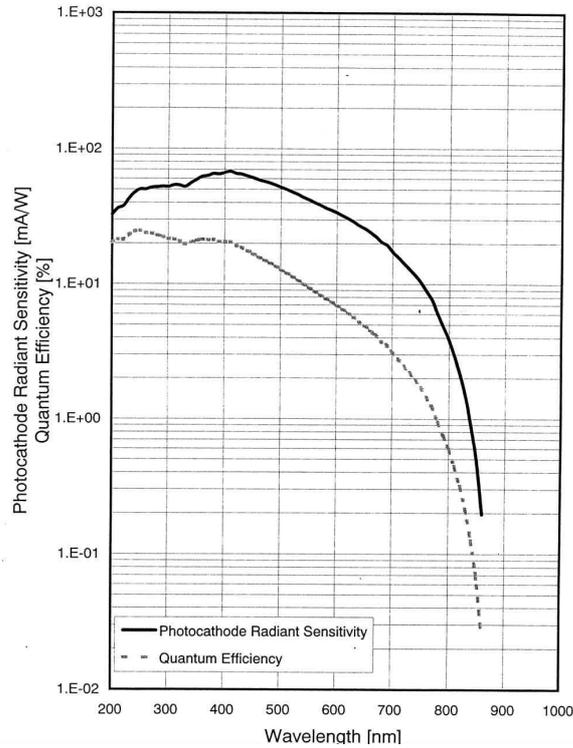


FIG. A.3: Sensibilité de la photocathode et l'efficacité quantique en fonction de la longueur d'onde (données constructeur).

pu ainsi vérifier la forme du signal mais pas les temps caractéristiques car nous étions limités par la bande passante de l'oscilloscope (1 GHz). Nous obtenons un temps de descente de 900 ps, un temps de montée de 3.7 ns (les termes montée et descente sont inversés dans les données constructeur) et une largeur d'impulsions de l'ordre de 1 ns. La largeur annoncée par le constructeur est de 300 ps.

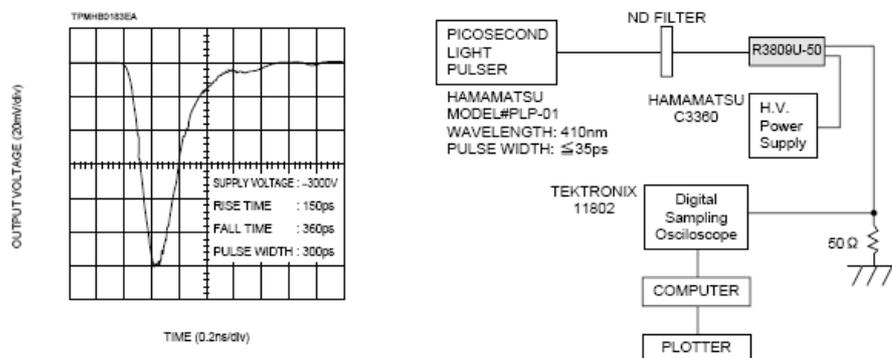


FIG. A.4: Forme de l'impulsion en sortie du photomultiplicateur (données constructeur) et schéma du dispositif de mesure.

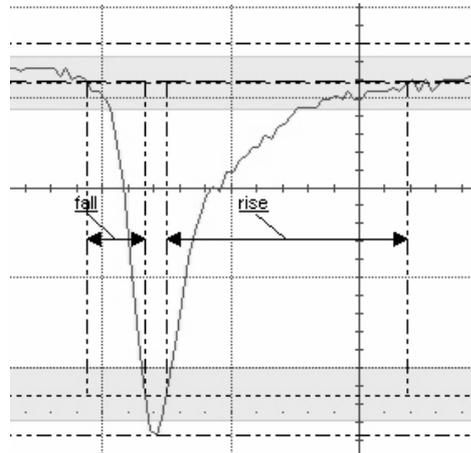


FIG. A.5: *Mesure de la forme de l'impulsion en sortie du pré amplificateur, 2ns/div, 100 mV/div.*

En plus de la connaissance de ces paramètres, il est intéressant de connaître la plus courte réponse d'instrument mesurable par le système (la réponse de l'instrument ou IRF est définie à la section 2.3.1) . Sa largeur à mi-hauteur est donnée à 45 ps par le constructeur, ce qui est largement suffisant pour nos applications.

Annexe B

Mesures avec une plaque réfléchissante placée dans le plan des fibres

L'objectif de cette partie est de voir si les deux situations suivantes donnent des profils temporels équivalents du point de vue expérimental :

- les fibres source et détection sont placées dans une géométrie de milieu infini
- les fibres sources et détection sont placées dans le plan d'une plaque réfléchissante.

Cette hypothèse peut être reformulée de la façon suivante : un milieu semi-infini dont l'interface est un miroir plan est-il équivalent à un milieu infini ? Pour répondre de façon théorique, on peut considérer que tout plan passant par le point source et le point détection est plan de symétrie en milieu infini. Or, un miroir plan à la surface d'un milieu semi-infini est un plan de symétrie optique. Les deux situations apparaissent équivalentes en théorie, pour un miroir parfait (de réflectivité totale pour le milieu, pour tous les angles).

Les expériences ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Professeur H. Saint-Jalmes au Laboratoire de RMN de Lyon avec laquelle nous avons réalisé les expériences de caractérisation en réflectance intégrale. Ils nous ont tout d'abord fourni une plaque réfléchissante en aluminium. Son taux de réflexion à 631 nm est de 55 % (mesuré pour un angle d'environ 30°, dans l'air). La plaque est percée de deux trous de diamètre 1 mm, espacés de 1.2 cm pour laisser les fibres. Nous avons effectué de mesures selon trois géométries des fibres, sur un fantôme optique :

- les fibres source et détection sont placées à 4 cm sous la surface. Cette mesure est appelée « infini ».
- les fibres sont placées à la surface
- les fibres sont placées dans le plan de la plaque réfléchissante, celle-ci étant placée 1 cm sous la surface. Cette mesure est appelée « plaque ».

Le fantôme Intralipide possède un coefficient d'absorption $\mu_a=0.05 \text{ cm}^{-1}$ et un coefficient de diffusion réduit $\mu'_s=12 \text{ cm}^{-1}$.

Les résultats des mesures sont présentés sur la figure B.1. Nous retrouvons les profils des courbes de surface et en infini vues au chapitre 3. La mesure « plaque » donne un profil intermédiaire entre les mesures surface et infini.

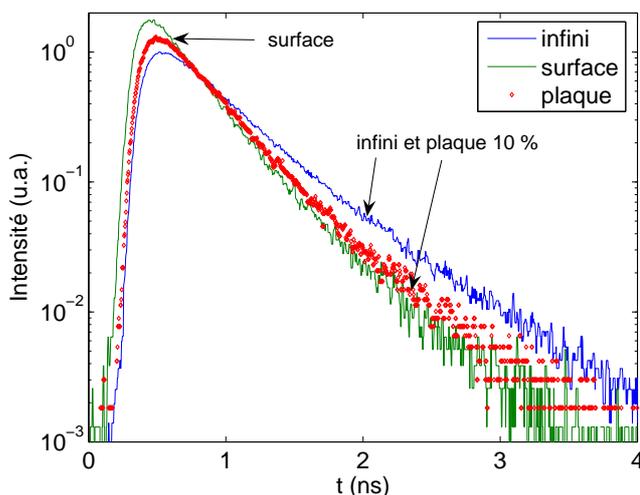


FIG. B.1: Profils temporels mesurés en infini, en surface et avec une plaque en aluminium de réflexion 55 %. Les courbes sont normées à la même aire puis au maximum de la courbe infini. Les propriétés optiques du fantôme sont $\mu_a=0.05 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu'_s=12 \text{ cm}^{-1}$.

Ces résultats suggèrent que la plaque n'est pas assez réfléchissante. Nous avons donc cherché une autre plaque, avec la contrainte de pouvoir facilement percer des trous sans la détériorer. Une plaque de silicium recouverte d'un dépôt pour des applications électroniques a permis de réaliser un tel objet, grâce à un usinage soigné. Son taux de réflexion mesuré est de 94 % à 630 nm. Les mesures ont montré que les courbes en infini et avec la plaque sont bien superposées de façon visuelle (figure B.2).

Ces mesures confirment l'équivalence au premier ordre entre la mesure avec la plaque et la mesure en milieu infini pour les propriétés optiques considérées. Les défauts peuvent être dus à la géométrie non parfaite du dispositif. Nous notons bien que la géométrie de la plaque ne peut pas être considérée comme celle d'un miroir parfait. Elle n'a pas un taux de réflexion de 100 % et les trous perturbent la surface. Nous n'avons pas cherché à quantifier l'accord entre les deux mesures car ce premier stade de conclusion répondait à notre question de départ. Dans la littérature, des mesures en fréquentiel avec une feuille d'aluminium confirment nos observations [86]. Haskell *et al* [86] a de plus effectué des simulations en faisant varier le coefficient de réflexion de l'interface. Il conclut que la réflexion doit être égale au moins à 98 % pour mimer les propriétés du milieu infini.

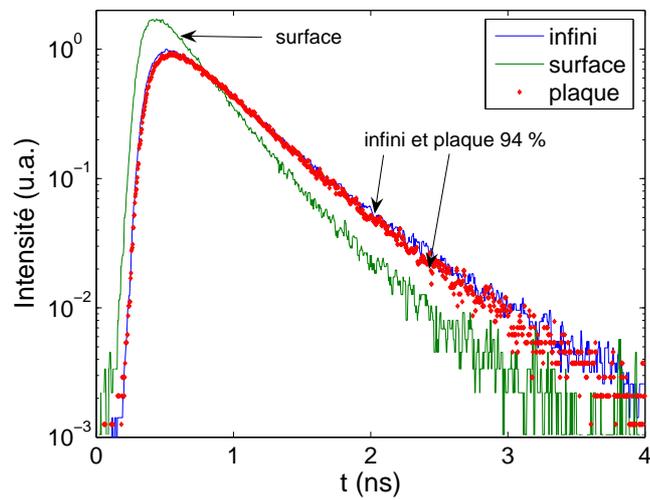


FIG. B.2: Profils temporels mesurés en infini, en surface et avec une plaque en aluminium de réflexion 94 %. Les courbes sont normées à la même aire puis au maximum de la courbe infini. Les propriétés optiques du fantôme sont $\mu_a=0.05 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu'_s=12 \text{ cm}^{-1}$.

Annexe C

Passage en représentation fréquentielle

Nous montrons dans cette annexe les détails de calculs pour passer de la représentation temporelle à la représentation fréquentielle de la densité de photons de fluorescence. Ces calculs sont adaptés de la référence [50].

Nous partons de l'équation (Eq. 4-2) vue au chapitre 4, qui donne la densité de photons de fluorescence (avec $t_0=0$ pour simplifier les notations) :

$$\delta\phi_{fluor}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, t) = \int_0^t \int_0^{t'} \phi_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, t'') \frac{\eta \mu_{ax \rightarrow m}}{\tau} \exp\left(-\frac{t' - t''}{\tau}\right) \phi_m(\mathbf{r}, \mathbf{r}_d, t - t') dt'' dt' \quad (\text{Eq. C-1})$$

Changeons tout d'abord les bornes des intégrales. L'intégrale sur t' de 0 à t peut se faire de 0 à $+\infty$ puisque $\phi_m(\mathbf{r}, \mathbf{r}_d, t - t')$ est nulle pour $t' > t$. L'intégrale sur t'' de 0 à t' peut se faire de $-\infty$ à t' puisque $\phi_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, t'')$ est nulle pour $t'' < 0$.

$$\delta\phi_{fluor}(r_{sr}, r_{rd}, t) = \int_0^{+\infty} dt' \int_{-\infty}^{t'} dt'' \phi_x(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_s|, t'') \frac{\eta \mu_{ax \rightarrow m}}{\tau} \exp\left(-\frac{t' - t''}{\tau}\right) \phi_m(\mathbf{r}, \mathbf{r}_d, t - t') \quad (\text{Eq. C-2})$$

Remplaçons les fonctions par leurs expressions en transformées de Fourier. On rappelle que :

$$\phi(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-i\omega t} \Phi(\mathbf{r}, \omega) d\omega, \quad \text{soit} \quad (\text{Eq. C-3})$$

$$\begin{aligned} \delta\phi_{fluor}(r_{sr}, r_{rd}, t) &= \frac{\eta}{2\pi\tau} \int_0^{+\infty} dt' \int_{-\infty}^{t'} dt'' \int_{-\infty}^{\infty} d\omega \int_{-\infty}^{\infty} d\omega' e^{-i\omega(t'' - t_0)} \Phi_x(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_s|, \omega) \\ &\times \exp\left(-\frac{t' - t''}{\tau}\right) e^{-i\omega'(t - t')} \Phi_f(|\mathbf{r}_d - \mathbf{r}|, \omega') \end{aligned} \quad (\text{Eq. C-4})$$

En effectuant l'intégrale sur t'' , on calcule la transformée de Fourier du terme de fluorescence :

$$\int_{-\infty}^{t'} e^{-i\omega t''} \exp\left(-\frac{t' - t''}{\tau}\right) dt'' = \frac{e^{-i\omega t'}}{i\omega + \frac{1}{\tau}} \quad \text{d'où} \quad (\text{Eq. C-5})$$

$$\begin{aligned} \delta\phi_{fluo}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, t) &= \frac{\eta \mu_{ax \rightarrow m}}{2\pi} \int_0^{+\infty} dt' \int_{-\infty}^{+\infty} d\omega \int_{-\infty}^{+\infty} d\omega' \Phi_x(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_s|, \omega) \\ &\quad \times \frac{e^{-i\omega t'}}{1 + i\omega\tau} e^{-i\omega'(t-t')} \Phi_f(|\mathbf{r}_d - \mathbf{r}|, \omega') \end{aligned} \quad (\text{Eq. C-6})$$

Puis on effectue l'intégrale sur t' ,

$$\int_0^{+\infty} e^{-i(\omega+\omega')t'} dt' = \sqrt{2\pi} \delta(\omega - \omega') \quad \text{d'où} \quad (\text{Eq. C-7})$$

$$\delta\phi_{fl}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, t) = \frac{\eta \mu_{ax \rightarrow m}}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} d\omega \int_{-\infty}^{+\infty} d\omega' \Phi_x(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_s|, \omega) \frac{\delta(\omega - \omega')}{1 + i\omega\tau} e^{-i\omega'(t-t')} \Phi_f(|\mathbf{r}_d - \mathbf{r}|, \omega') \quad (\text{Eq. C-8})$$

Enfin, on intègre sur ω' ,

$$\delta\phi_{fl}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, t) = \frac{\eta \mu_{ax \rightarrow m}}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} d\omega \Phi_x(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_s|, \omega) \frac{1}{1 + i\omega\tau} \Phi_f(|\mathbf{r}_d - \mathbf{r}|, \omega) e^{-i\omega t} \quad (\text{Eq. C-9})$$

Puis, si l'on prend la transformée de Fourier des deux termes, on obtient l'expression de la densité de photons en représentation fréquentielle sous forme des produits des différents termes :

$$\delta\Phi_{fl}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \omega) = \Phi_x(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_s|, \omega) \frac{\eta \mu_{ax \rightarrow m}}{1 + i\omega\tau} \Phi_f(|\mathbf{r}_d - \mathbf{r}|, \omega) \quad (\text{Eq. C-10})$$

Annexe D

Propriétés et calculs sur les moments

D.1 Opérations sur les moments

D.1.1 Passage fréquentiel-temporel

Une convolution dans le domaine temporel est une multiplication dans le domaine fréquentiel. Considérons la fonction $y(t)$ définie par $y(t) = (f * h)(t)$. Cette propriété se traduit par :

$$Y(\omega) = TF[y(t)] = TF[(f * h)(t)] = TF[f(t)] \times TF[h(t)] = F(\omega) \times H(\omega) \quad (\text{Eq. D-1})$$

Ceci peut être démontré de la façon suivante. Le produit de convolution $y(t)$ s'écrit :

$$y(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t-u)h(u) du \quad (\text{Eq. D-2})$$

Sa transformée de Fourier est donnée par :

$$Y(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} y(t)e^{-i\omega t} dt \quad (\text{Eq. D-3})$$

Reportons l'expression de $y(t)$ de l'équation (Eq. D-2) dans la définition précédente, on obtient :

$$Y(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(t-u)h(u) e^{-i\omega t} du dt \quad (\text{Eq. D-4})$$

Effectuons le changement de variable $t = x + u$:

$$\begin{aligned} Y(\omega) &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x)h(u) e^{-i\omega(x+u)} du dx = \int_{-\infty}^{\infty} f(x)e^{-i\omega x} dx \int_{-\infty}^{\infty} h(u)e^{-i\omega u} du dx \\ &= TF[f(t)] \times TF[h(t)] = F(\omega) \times H(\omega) \end{aligned} \quad (\text{Eq. D-5})$$

Nous allons ensuite établir les liens entre les moments des fonctions y , f et h . Introduisons une nouvelle fonction $d(t)$, qui nous sera aussi utile, définie dans le domaine

fréquentiel par $D(\omega) = F(\omega)/H(\omega)$. Il n'y a pas de relation explicite entre f , h et d dans le domaine temporel. Enfin, une autre fonction dont nous aurons besoin est $F(\omega) = \sum_i F_i(\omega)$. Le tableau ci-dessous donne un récapitulatif des fonctions étudiées, avec les correspondances dans les domaines temporel et fréquentiel.

t	ω
$y(t) = (f * h)(t)$	$Y(\omega) = F(\omega) \times H(\omega)$
$d(t)$	$D(\omega) = F(\omega)/H(\omega)$
$f(t) = \sum_i f_i(t)$	$F(\omega) = \sum_i F_i(\omega)$

TAB. 4-I: Récapitulatif des fonctions étudiées.

D.1.2 Moment d'ordre zéro

Le moment d'ordre zéro de y a pour expression :

$$m_0[y] = \int_{-\infty}^{\infty} y(t) dt = Y(\omega = 0) \quad (\text{Eq. D-6})$$

Reportons l'expression de $y(t)$ de l'équation (Eq. D-2) et posons $t = x + u$:

$$\begin{aligned} m_0[y] &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(t-u)h(u) du dt = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x)h(u) du dx \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} f(x) dx \int_{-\infty}^{\infty} h(u) du \end{aligned} \quad (\text{Eq. D-7})$$

Ce qui donne :

$$\boxed{m_0[y] = m_0[f] \times m_0[h]} \quad (\text{Eq. D-8})$$

Ce résultat peut aussi se voir immédiatement en prenant $\omega = 0$ dans l'équation (Eq. D-1) :

$$\begin{aligned} Y(\omega = 0) &= F(\omega = 0) \times H(\omega = 0) \\ m_0[y] &= m_0[f] \times m_0[h] \end{aligned} \quad (\text{Eq. D-9})$$

En effectuant un raisonnement analogue, on peut écrire pour la fonction d :

$$\begin{aligned} D(\omega = 0) &= F(\omega = 0) / H(\omega = 0) \\ \boxed{m_0[d] = m_0[f] / m_0[h]} \end{aligned} \quad (\text{Eq. D-10})$$

Pour la fonction f , on a de façon évidente :

$$\boxed{m_0[f] = \sum_i m_0[f_i]} \quad (\text{Eq. D-11})$$

D.1.3 Temps moyen

Utilisons la relation qui relie le temps moyen et la transformée de Fourier (démontrée dans la section 4.2.1) :

$$\begin{aligned}
m_1[y] &= i \left. \frac{\partial Y(\omega)}{\partial \omega} \right|_{\omega=0} \times \frac{1}{Y(\omega=0)} \\
&= i \left. \frac{\partial [F(\omega) H(\omega)]}{\partial \omega} \right|_{\omega=0} \times \frac{1}{F(\omega=0) H(\omega=0)} \\
&= i \left[F(\omega=0) \left. \frac{\partial H(\omega)}{\partial \omega} \right|_{\omega=0} + H(\omega=0) \left. \frac{\partial F(\omega)}{\partial \omega} \right|_{\omega=0} \right] \times \frac{1}{F(\omega=0) H(\omega=0)} \\
&= i \left. \frac{\partial F(\omega)}{\partial \omega} \right|_{\omega=0} \times \frac{1}{F(\omega=0)} + i \left. \frac{\partial H(\omega)}{\partial \omega} \right|_{\omega=0} \times \frac{1}{H(\omega=0)} \quad (\text{Eq. D-12})
\end{aligned}$$

On obtient donc :

$$\boxed{m_1[y] = m_1[f] + m_1[h]} \quad (\text{Eq. D-13})$$

Ce résultat se généralise à un produit de fonctions pour lequel on sommerait les temps moyens de ces fonctions. De manière analogue si l'on considère la fonction $d(t)$:

$$\begin{aligned}
m_1[d] &= i \left. \frac{\partial [F(\omega)/H(\omega)]}{\partial \omega} \right|_{\omega=0} \times \frac{1}{[F(\omega=0)/H(\omega=0)]} \\
&= i \frac{H(\omega=0)}{F(\omega=0)} \left(\left. \frac{\partial F(\omega)/H(\omega) - F(\omega)\partial H(\omega)}{[G(\omega)]^2} \right|_{\omega=0} \right) \\
&= i \left. \frac{\partial [F(\omega)]}{\partial \omega} \right|_{\omega=0} \times \frac{1}{F(\omega=0)} - i \left. \frac{\partial [H(\omega)]}{\partial \omega} \right|_{\omega=0} \times \frac{1}{H(\omega=0)} \quad (\text{Eq. D-14})
\end{aligned}$$

On obtient alors :

$$\boxed{m_1[d] = m_1[f] - m_1[h]} \quad (\text{Eq. D-15})$$

Calculons enfin le temps moyen de la fonction f toujours en dérivant son expression par rapport à ω , puis en prenant la valeur en zéro :

$$\begin{aligned}
F(\omega) &= \sum_i F_i(\omega) \\
\frac{\partial [F(\omega)]}{\partial \omega} &= \sum_i \frac{\partial [F_i(\omega)]}{\partial \omega} \quad (\text{Eq. D-16})
\end{aligned}$$

car la dérivée est bien linéaire. A gauche, multiplions et divisons par $F(\omega=0)$. A droite, multiplions et divisons chaque terme par $F_i(\omega=0)$.

$$F(\omega=0) \frac{1}{F(\omega=0)} \frac{\partial [F(\omega)]}{\partial \omega} = \sum_i F_i(\omega=0) \frac{1}{F_i(\omega=0)} \frac{\partial [F_i(\omega)]}{\partial \omega} \quad (\text{Eq. D-17})$$

Nous reconnaissons les temps moyens de f et des fonctions f_i multipliés par leurs moments d'ordre zéro. D'où l'expression finale :

$$\boxed{m_0[f] m_1[f] = \sum_i m_0[f_i] m_1[f_i]} \quad (\text{Eq. D-18})$$

D.1.4 Moment d'ordre deux

Avec le moment d'ordre deux, nous n'avons pas de relation simple de somme et de soustraction pour y et d . Nous les aurons pour la variance. Nous précisons les relations pour le second moment, mais sans donner les étapes de calcul. Pour la fonction y , la relation suivante lie les moments d'ordre deux :

$$\boxed{m_2[y] = m_2[f] + m_2[h] + 2 m_1[f] m_1[h]} \quad (\text{Eq. D-19})$$

Enfin, pour la fonction f , nous avons une expression analogue de l'équation (Eq. D-18) pour le temps moyen (car le second moment est lié à la dérivée seconde qui est elle aussi linéaire comme la dérivée première) :

$$\boxed{m_0[f] m_2[f] = \sum_i m_0[f_i] m_2[f_i]} \quad (\text{Eq. D-20})$$

D.1.5 Variance

L'intérêt de la variance est que l'on peut écrire certaines relations analogues à celles obtenues pour le temps moyen. Pour simplifier l'écriture dans les calculs, nous allons omettre la variable ω prise en zéro et mettre un symbole $'$ pour signaler une dérivée par rapport à ω :

$$\begin{aligned} V[y] &= -\left. \frac{\partial^2 [F(\omega)H(\omega)]}{\partial \omega^2} \right|_{\omega=0} \times \frac{1}{F(\omega)H(\omega)} \Big|_{\omega=0} + \left[\left. \frac{\partial [F(\omega)H(\omega)]}{\partial \omega} \right|_{\omega=0} \times \frac{1}{F(\omega)H(\omega)} \Big|_{\omega=0} \right]^2 \\ &= -\left(FH' + HF' \right)' \frac{1}{FH} + \left(i \frac{F'}{F} \right)^2 + \left(i \frac{H'}{H} \right)^2 + 2 \left(i \frac{F'}{F} \right) \left(i \frac{H'}{H} \right) \\ &= -\left(\frac{F'H' + FH'' + H'F' + HF''}{FH} \right) + \left(i \frac{F'}{F} \right)^2 + \left(i \frac{H'}{H} \right)^2 + 2 \left(i \frac{F'}{F} \right) \left(i \frac{H'}{H} \right) \\ &= -\frac{F''}{F} + \left(i \frac{F'}{F} \right)^2 - \frac{H''}{H} + \left(i \frac{H'}{H} \right)^2 \end{aligned} \quad (\text{Eq. D-21})$$

On a donc :

$$\boxed{V[y] = V[f] + V[h]} \quad (\text{Eq. D-22})$$

De même pour la fonction d , on a :

$$\boxed{V[d] = V[f] - V[h]} \quad (\text{Eq. D-23})$$

D.2 Calculs sur des fonctions d'intérêt

Nous montrons ici les étapes de calcul pour obtenir le temps moyen et la variance à partir de la fonction de Green en milieu infini :

$$G(\omega) = \frac{e^{ikr}}{r} \quad \text{avec} \quad k^2 = -\frac{\mu_a}{D} + \frac{i\omega}{cD} \quad (\text{Eq. D-24})$$

Calculons son temps moyen :

$$\frac{\partial G(\omega)}{\partial \omega} = \frac{e^{ikr}}{r} i r \frac{1}{2} \left(\frac{i}{cD} \right) \left(-\frac{\mu_a}{D} + \frac{i\omega}{cD} \right)^{-1/2} = -\frac{e^{ikr}}{2cD} \left(-\frac{\mu_a}{D} + \frac{i\omega}{cD} \right)^{-1/2} \quad (\text{Eq. D-25})$$

d'où, en utilisant la formule du temps moyen :

$$m_1[G] = i \frac{\partial G(\omega)}{\partial \omega} \Big|_{\omega=0} \times 1/G(\omega) \Big|_{\omega=0} = -i \frac{e^{ik^0 r}}{2cD} \left(-\frac{\mu_a}{D} \right)^{-1/2} \frac{r}{e^{ik^0 r}} \quad (\text{Eq. D-26})$$

$$\boxed{m_1[G] = \frac{r}{2c\sqrt{\mu_a D}}} \quad (\text{Eq. D-27})$$

Calculons ensuite son second moment et sa variance :

$$\begin{aligned} \frac{\partial^2 G(\omega)}{\partial \omega^2} &= -\frac{e^{ikr}}{2cD} i r \frac{1}{2} \left(\frac{i}{cD} \right) \left(-\frac{\mu_a}{D} + \frac{i\omega}{cD} \right)^{-1} - \frac{e^{ikr}}{2cD} \left(\frac{i}{cD} \right) \left(-\frac{\mu_a}{D} + \frac{i\omega}{cD} \right)^{-1} \\ &= -\frac{i e^{ikr}}{2c^2 D^2} \left(\frac{i}{cD} \right) \left(-\frac{\mu_a}{D} + \frac{i\omega}{cD} \right)^{-1} \left[\frac{ir}{2} + \left(-\frac{\mu_a}{D} + \frac{i\omega}{cD} \right)^{-1/2} \right] \quad (\text{Eq. D-28}) \end{aligned}$$

d'où, en utilisant la formule du second moment :

$$\begin{aligned} m_2 &= -\frac{\partial^2 G(\omega)}{\partial \omega^2} \Big|_{\omega=0} \times 1/G(\omega) \Big|_{\omega=0} \\ &= \frac{ir}{2c^2 D^2} \left(-\frac{\mu_a}{D} \right)^{-1} \left[\frac{ir}{2} + \left(-\frac{\mu_a}{D} \right)^{-1/2} \right] \\ &= \frac{r^2}{4c^2 \sqrt{\mu_a D}} + \frac{r}{2c^2 \sqrt{\mu_a^3 D}} \quad (\text{Eq. D-29}) \end{aligned}$$

ainsi avec $V = m_2 - m_1^2$,

$$\boxed{V[G] = \frac{r}{2c^2 \sqrt{\mu_a^3 D}}} \quad (\text{Eq. D-30})$$

D.3 Relation entre les moments et les séries de Fourier

Nous montrons dans cette section comment les moments sont reliés à la transformée de Fourier de la TPSF. Cette discussion est adaptée de la thèse de E. Hillman [79].

Si nous reprenons les résultats établis à la section 4.2.1, nous pouvons les généraliser pour obtenir une relation entre le moment d'ordre k et la dérivée d'ordre k de G , la transformée de Fourier de la TPSF :

$$m_k = i^k \frac{\partial^k G(\omega)}{\partial \omega^k} \Big|_{\omega=0} \times 1/G(\omega) \Big|_{\omega=0} \quad (\text{Eq. D-31})$$

Développons alors la fonction G sous forme d'une série de Taylor en zéro :

$$G(\omega) = G(0) + \omega \frac{\partial G(\omega)}{\partial \omega} \Big|_{\omega=0} + \frac{\omega^2}{2} \frac{\partial^2 G(\omega)}{\partial \omega^2} \Big|_{\omega=0} + \frac{\omega^3}{3!} \frac{\partial^3 G(\omega)}{\partial \omega^3} \Big|_{\omega=0} + \dots \quad (\text{Eq. D-32})$$

On peut finalement exprimer la partie réelle et la partie imaginaire de G sous forme d'une série des moments :

$$Re[G(\omega)] = m_0 \left[1 - \frac{\omega^2}{2} m_2 + \frac{\omega^4}{4!} m_4 + \dots \right] \quad (\text{Eq. D-33})$$

$$Im[G(\omega)] = m_0 \left[-\omega m_1 + \frac{\omega^3}{3!} m_3 + \dots \right] \quad (\text{Eq. D-34})$$

Si on néglige les termes en ω^2 , on a :

$$\frac{Im[G(\omega)]}{Re[G(\omega)]} = \text{phase} = -\omega m_1 \quad (\text{Eq. D-35})$$

Dans cette approximation que nous ne détaillerons pas ici ($\omega \leq 300$ MHz [58]), la phase est équivalente au temps moyen.

Annexe E

Publications et participations à congrès

Les résultats obtenus ont été décrits dans les publications et communications suivantes :

Publications dans revue internationale avec comité de lecture :

- A. Laidevant, A. da Silva, M. Berger, J.-M. Dinten, « Effects of the surface boundary on the determination of the optical properties of a turbid medium with time-resolved reflectance », *Applied Optics* **45**(19), 4756-4764 (2006).
- A. Laidevant, A. da Silva, M. Berger, J. Boutet, J.-M. Dinten, A. C. Boccara, « Analytical method for localizing a fluorescent inclusion in a turbid medium », accepté, *Applied Optics*.

Brevet : A. Laidevant, A. Da Silva, and J.-M. Dinten, « Procédé et dispositif de reconstruction 3D de la distribution d'éléments fluorescents », Brevet français DD 06 07065, août 2006.

Communications à des congrès internationaux avec actes publiés :

- A. Laidevant, A. da Silva, M. Berger, and J.-M. Dinten, « Experimental test of depth dependence of solution for time-resolved diffusion equation », *Proc. SPIE* **5745** (2005), Medical Imaging, San Diego, février 2005, poster.
- A. Laidevant, A. da Silva, M. Berger, and J.-M. Dinten, « Experimental study of time-resolved measurements on turbid media : determination of optical properties and fluorescent inclusions characterization », *Proc. SPIE* **5859** (2005), European Conference in Biomedical Optics, Munich, juin 2005, poster.
- J.-M. Dinten, P. Petié, A. da Silva, J. Boutet, A. Koenig, L. Hervé, M. Berger, A. Laidevant, and P. Rizo, « Performance of different reflectance and diffuse optical imaging tomographic approaches in fluorescence molecular imaging of small animals », *Proc. SPIE* **6142** (2006), Medical Imaging, San Diego, février 2006, présentation orale.

Communications à des congrès internationaux sans actes publiés :

- A. Laidevant, A. da Silva, M. Berger, P. Peltié, J.-M. Dinten, P. Rizo, « Time-resolved measurements for characterization of fluorescent heterogeneties embedded in turbid media », Society for Molecular Imaging, Cologne, septembre 2005, poster.
- A. Laidevant, A. da Silva, J.-M. Dinten, « Time-resolved analytical approach for localization of a fluorescent inclusion in a turbid medium », Biomedical Optics, Fort Lauderdale, mars 2006, poster.
- A. Laidevant, A. da Silva, M. Berger, J.-M. Dinten, J. Falconet, R. Sablong, E. Perrin, H. Saint-Jalmes, « Comparison of spatially integral and time-resolved reflectance for the determination of the optical properties on two kinds of optical phantoms », Biomedical Optics, Fort Lauderdale, mars 2006, poster.
- A. Laidevant, A. da Silva, P. Peltié, J.-M. Dinten, C. D'Andrea, L. Spinelli, G. Valentini, R. Cubeddu, « Time-resolved imaging of a fluorescent inclusion in a turbid medium using a gated CCD camera », Biomedical Optics, Fort Lauderdale, mars 2006, poster.

Communications à des congrès nationaux :

- A. Laidevant, A. da Silva, P. Parrein, A. Planat-Chrétien, J.-P. Moy, M. Berger, J.-M. Dinten, I. Texier-Nogues, J.-L. Coll, « Imagerie de fluorescence tridimensionnelle sur le petit animal », OPTDIAG, mai 2004, communication orale.
- A. Laidevant, A. da Silva, M. Berger, J.-M. Dinten, « Experimental test of depth dependence of solution for time-resolved diffusion equation », IMVIE, Strasbourg, mars 2005, poster.
- A. Laidevant, A. da Silva, M. Berger, J.-M. Dinten, « Etude expérimentale de mesures résolues en temps sur des milieux diffusants : mesure des propriétés optiques et caractérisation d'inclusions fluorescentes », GDR ISIS - Imagerie optique non conventionnelle, ESPCI, mars 2005, communication orale.
- A. Laidevant, A. da Silva, M. Berger, P. Peltié, J.-M. Dinten, P. Rizo, « Time-resolved measurements for characterization of fluorescent heterogeneties embedded in turbid media », Horizons de l'Optique, Chambéry, novembre 2005, poster.
- A. Laidevant, « Imagerie optique 3D résolue en temps pour la caractérisation de fluorophores dans les milieux diffusants », 16ièmes Rencontres Régionales de la Recherche, Grenoble, janvier 2006, poster.

Bibliographie

- [1] S. LAM, F. LESAGE et X. INTES : Time domain fluorescent diffuse optical tomography : analytical expressions. *Optics Express*, 13(7):2263–2275, 2005.
- [2] S. WEBB : *The Physics of Medical Imaging*. IOP Publishing, 2000.
- [3] La nouvelle imagerie médicale : le corps transparent. *Pour la Science*, (338), 2005.
- [4] M. RUDIN et R. WEISSELEDER : Molecular imaging in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2):123–131, 2003.
- [5] A. P. GIBSON, J. C. HEBDEN et S. R. ARRIDGE : Recent advances in diffuse optical imaging. *Physics in Medicine and Biology*, 50(4):R1–R43, 2005.
- [6] J. R. LAKOWICZ : *Principles of fluorescence spectroscopy*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999.
- [7] S. A. PRAHL : « <http://omlc.ogi.edu/index.html> », Site web de l’Oregon Medical Center. 2006.
- [8] K LICHA et C OLBRICH : Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57:1087–1108, 2005.
- [9] J. BEUTHAN, O. MINET, J. HELFMANN, M. HERRIG et G. MULLER : The spatial variation of the refractive index in biological cells. *Physics in Medicine and Biology*, 41(3):369–382, 1996.
- [10] R. MARCHESINI, A. BERTONI, S. ANDREOLA, E. MELLONI et A. E. SICHIROLLO : Extinction and absorption-coefficients and scattering phase functions of human-tissues in vitro. *Applied Optics*, 28(12):2318–2324, 1989.
- [11] W-F. CHEONG, S. A. PRAHL et A. J. WELCH : A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 26(12):2166–2185, 1990.
- [12] G. BOURG-HECKLY, J. BLAIS, J. J. PADILLA, O. BOURDON, J. ETIENNE, F. GUILLEMIN et L. LAFAY : Endoscopic ultraviolet-induced autofluorescence spectroscopy of the esophagus : Tissue characterization and potential for early cancer diagnosis. *Endoscopy*, 32(10):756–765, 2000.
- [13] G. A. WAGNIERES, W. M. STAR et B. C. WILSON : In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem. Photobiol.*, 68:603–632, 1998.
- [14] V. TUCHIN : *Tissue optics : Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*. SPIE Press, 2000.

- [15] B. J. TROMBERG, N. SHAH, R. LANNING, A. CERUSSI, J. ESPINOZA, T. PHAM, L. SVAASAND et J. BUTLER : Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia*, 2(1-2):26–40, 2000.
- [16] R.M.P. DOORNBOS, R. LANG, M.C. AALDERS, F.W. CROSS et H.J.C.M. STERENBORG : The determination of in vivo human tissue optical properties and absolute chromophore concentrations using spatially resolved steady-state diffuse reflectance spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, 44(4):967–981, 1999.
- [17] T. L. TROY, D. L PAGE et E. M. SEVICK-MURACA : Optical properties of normal and diseased breast tissues : prognosis for optical mammography. *Journal of Biomedical Optics*, 1:324–355, 1996.
- [18] F. BEVILACQUA, D. PIGUET, P. MARQUET, J.D. GROSS, B.J. TROMBERG et C. DEPEURSINGE : In vivo local determination of tissue optical properties. In *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, volume 3194, pages 262–268, 1997.
- [19] J. B. FISHKIN, O. COQUOZ, E. R. ANDERSON, M. BRENNER et B. J. TROMBERG : Frequency-domain photon migration measurements of normal and malignant tissue optical properties in a human subject. *Applied Optics*, 36(1):10–20, 1997.
- [20] R. WEISSLEDER : Scaling down imaging : molecular mapping of cancer in mice. *Nature Reviews*, 2:1–8, 2002.
- [21] T VO-DINH : *Biomedical Photonics Handbook*. D.C. Press, 2003.
- [22] C. BREMER, V. NTZIACHRISTOS et R. WEISSLEDER : Optical-based molecular imaging : contrast agents and potential medical applications. *European Radiology*, 13(2):231–243, 2003.
- [23] R. WEISSLEDER, C. H. TUNG, U. MAHMOOD et A. BOGDANOV : In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nature Biotechnology*, 17(4):375–378, 1999.
- [24] R. WEISSLEDER : A clearer vision for in vivo imaging. *Nature Biotechnology*, 19(4):316–317, 2001.
- [25] S. CHANDRASEKHAR : *Radiative transfert*. Dover publication, 1960.
- [26] K. M. CASE et P. F. ZWEIFEL : *Linear transport theory*. Addison-Wesley, 1967.
- [27] A. ISHIMARU : *Wave propagation and scattering in random media.*, volume 1. Academic, New York, 1978.
- [28] J. M. TUALLE : *Réflectance résolue dans le temps et dans l'espace appliquée à l'étude des propriétés optiques des milieux diffusants*. Thèse de doctorat, Université Paris-Nord, 1996.
- [29] M. S. PATTERSON, B. C. WILSON et D. R. WYMAN : The propagation of optical radiation in tissue I. Models of radiation transport and their application. *Lasers Med. Sci.*, 6:155–168, 1991.
- [30] J RIPOLL : *Light diffusion in turbid media with biomedical application*. Thèse de doctorat, Faculty of the Universidad Autonoma de Madrid, 2000.

- [31] S. R. ARRIDGE : Optical tomography in medical imaging. *Inverse Problems*, 15(2):R41–R93, 1999.
- [32] M. S. PATTERSON, B. CHANCE et B. C. WILSON : Time-resolved reflectance and transmittance for the non invasive measurement of tissue optical properties. *Applied Optics*, 28:2331–2336, 1989.
- [33] K. FURUTSU : Diffusion equation derived from space-time transport-equation. *Journal of the Optical Society of America*, 70(4):360–366, 1980.
- [34] K. FURUTSU et Y. YAMADA : Diffusion-approximation for a dissipative random medium and the applications. *Physical Review E*, 50(5):3634–3640, 1994.
- [35] M. BASSANI, F. MARTELLI, G. ZACCANTI et D. CONTINI : Independence of the diffusion coefficient from absorption : Experimental and numerical evidence. *Optics Letters*, 22(12):853–855, 1997.
- [36] T. DURDURAN, A. G. YODH, B. CHANCE et D. A. BOAS : Does the photon-diffusion coefficient depend on absorption? *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, 14(12):3358–3365, 1997.
- [37] D. J. DURIAN : The diffusion coefficient depends on absorption. *Optics Letters*, 23(19):1502–1504, 1998.
- [38] R. ARONSON et N. CORNGOLD : Photon diffusion coefficient in an absorbing medium. *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, 16(5):1066–1071, 1999.
- [39] W. CAI, M. XU, M. LAX et R. R. ALFANO : Diffusion coefficient depends on time, not on absorption. *Optics Letters*, 27(9):731–733, 2002.
- [40] D. CONTINI, F. MARTELLI et G. ZACCANTI : Photon migration through a turbid slab described by a model based on diffusion approximation .I. Theory. *Applied Optics*, 36(19):4587–4599, 1997.
- [41] A. H. HIELSCHER, R. E. ALCOUFFE et R. L. BARBOUR : Comparison of finite-difference transport and diffusion calculations for photon migration in homogeneous and heterogeneous tissues. *Physics in Medicine and Biology*, 43(5):1285–1302, 1998.
- [42] A.H. HIELSCHER, A.D. KLOSE, A. SCHEEL, A. BLUESTONE, J.M. LASKER, B. MOA-ANDERSON, J.M. MASCIOTTI, U. NETZ, J. BEUTHAN, M. STEWART et G. ABDOULAEV : Optical tomographic imaging of small tissue volumes : From rat brains to human finger joints. In *2004 2nd IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : Macro to Nano*, volume 2, pages 1467–1470, 2004.
- [43] L. H. WANG, S. L. JACQUES et L. Q. ZHENG : Monte-Carlo modeling of light transport in multilayered tissues. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 47(2):131–146, 1995.
- [44] R. F. BONNER, R. NOSSAL, S. HAVLIN et G. H. WEISS : Model for photon migration in turbid biological media. *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, 4(3):423–432, 1987.

- [45] A. H. GANDJBAKHCHÉ et G. H. WEISS : Random walk and diffusion-like model of photon migration in turbid media. volume 34, pages 333–402. E. Wolf, Elsevier North Holland, Amsterdam, 1995.
- [46] A. H. GANDJBAKHCHÉ, R. F. BONNER, R. NOSSAL et G. H. WEISS : Effects of multiple-passage probabilities on fluorescent signals from biological media. *Applied Optics*, 36(19):4613–4619, 1997.
- [47] M. S. PATTERSON et B. W. POGUE : Mathematical-model for time-resolved and frequency-domain fluorescence spectroscopy in biological tissue. *Applied Optics*, 33(10):1963–1974, 1994.
- [48] C. L. HUTCHINSON, J.R. LAKOWICZ et E. M. SEWICK-MURACA : Fluorescence lifetime-based sensing in tissues : a computational study. *Biophysical Journal*, 68:1574–1582, 1995.
- [49] E. M. SEWICK-MURACA et C. L. BURCH : Origin of phosphorescence signals reemitted from tissues. *Optics Letters*, 19(23):1928–1930, 1994.
- [50] M. A. O’LEARY : *Imaging with diffuse photon density waves*. Thèse de doctorat, University of Pennsylvania, 1996.
- [51] D. HALL, G. MA, F. LESAGE et Y. WANG : Simple time-domain optical method for estimating the depth and concentration of a fluorescent inclusion in a turbid medium. *Optics Letters*, 29(19):2258–2260, 2004.
- [52] D. T. DELPY et M. COPE : Quantification in tissue near-infrared spectroscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 352(1354):649–659, 1997.
- [53] A. GODAVARTY, M. J. EPPSTEIN, C. Y. ZHANG, S. THERU, A. B. THOMPSON, M. GURFINKEL et E. M. SEWICK-MURACA : Fluorescence-enhanced optical imaging in large tissue volumes using a gain-modulated ICCD camera. *Physics in Medicine and Biology*, 48(12):1701–1720, 2003.
- [54] W. BECKER, A. BERGMANN, G. BISCOTTI et A. RÜCK : Advanced time-correlated single photon counting technique. In SPIE, éditeur : *Commercial and Biomedical Applications of Ultrafast Lasers IV*, volume 5340. SPIE, 2004.
- [55] C. V. ZINT, W. UHRING, M. TORREGROSSA, B. CUNIN et P. POULET : Streak camera : a multidetector for diffuse optical tomography. *Applied Optics*, 42(16):3313–3320, 2003.
- [56] C. D’ANDREA, D. COMELLI, A. PIFFERI, A. TORRICELLI, G. VALENTINI et R. CUBEDDU : Time-resolved optical imaging through turbid media using a fast data acquisition system based on a gated CCD camera. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 36(14):1675–1681, 2003.
- [57] S. R. ARRIDGE : Photon-measurement density-functions .1. Analytical forms. *Applied Optics*, 34(31):7395–7409, 1995.
- [58] S. R. ARRIDGE, M. COPE et D. T. DELPY : The theoretical basis for the determination of optical pathlengths in tissue : temporal and frequency analysis. *Phys. Med. Biol.*, 37:1531–1560, 1992.

- [59] M. SADOQI, P. RISEBOROUGH et S. KUMAR : Analytical models for time resolved fluorescence spectroscopy in tissues. *Physics in Medicine and Biology*, 46(10): 2725–2743, 2001.
- [60] A. H. GANDJBAKHCHÉ : Diffuse optical imaging and spectroscopy, in vivo. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série IV Physique Astrophysique*, 2(8):1073–1089, 2001.
- [61] D. HATTERY, V. CHERNOMORDIK, M. LOEW, I. GANNOT et A. GANDJBAKHCHÉ : Analytical solutions for time-resolved fluorescence lifetime imaging in a turbid medium such as tissue. *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, 20(9), 2001.
- [62] J. WU, Y. WANG, L. PERELMAN, I. ITZKAN, R. R. DASARI et M. S. FELD : Time-resolved multichannel imaging of fluorescent objects embedded in turbid media. *Optics Letters*, 20(5):489–491, 1995.
- [63] J. WU, Y. WANG, L. PERELMAN, I. ITZKAN, R. R. DASARI et M. S. FELD : 3-dimensional imaging of objects embedded in turbid media with fluorescence and raman-spectroscopy. *Applied Optics*, 34(18):3425–3430, 1995.
- [64] J. WU, L. PERELMAN, R. R. DASARI et M. S. FELD : Fluorescence tomographic imaging in turbid media using early-arriving photons and Laplace transforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16):8783–8788, 1997.
- [65] H. QUAN et Z. GUO : Fast 3D optical imaging with transient fluorescent signal. *Optics Express*, 12(3):449–455, 2004.
- [66] F. GAO, H. J. ZHAO, Y. TANIKAWA, A. MARJONO et Y. YAMADA : Time-domain fluorescence molecular tomography : A FEM-diffusion based forward model. *In Biomed*, 2006.
- [67] J. D. RILEY, M. HASSAN, V. CHERNOMORDICK, G. GANNOT et A. GANDJBAKHCHÉ : Time-resolved lifetime fluorescence imaging - an inverse model based on analytical solutions. *In Biomed*, 2006.
- [68] A. T. N. KUMAR, J. SKOCH, B. J. BACSKAI, D. A. BOAS et A. K. DUNN : Fluorescence-lifetime-based tomography for turbid media. *Optics Letters*, 30(24): 3347–3349, 2005.
- [69] S. BLOCH, F. LESAGE, L. MCINTOSH, A. GANDJBAKHCHÉ, K. X. LIANG et S. ACHILEFU : Whole-body fluorescence lifetime imaging of a tumor-targeted near-infrared molecular probe in mice. *Journal of Biomedical Optics*, 10(5), 2005.
- [70] A. C. KAK et M. SLANEY : *Principles of Computerized Tomographic Imaging*. IEEE Press, NY, 1987.
- [71] D. HALL : Simultaneous reconstruction of different time gates in TPSF based optical imaging, 2004.
- [72] D. HALL, M. GUOBIN, F. LESAGE et P. GALLANT : A time domain method and apparatus for determining the depth and concentration of a fluorophore in a turbid medium, 2005.

- [73] X. INTES, F. LESAGE et S. LAM : Method for fluorescent tomographic imaging, 2006.
- [74] V. NTZIACHRISTOS, X. MA et B. CHANCE : Time-correlated single photon counting imager for simultaneous magnetic resonance and near infrared mammography. *Review of Scientific Instruments*, 69:4221–4233, 1998.
- [75] P. TARONI, G. DANESINI, A. TORRICELLI, A. PIFFERI, L. SPINELLI et R. CUBEDDU : Clinical trial of time-resolved scanning optical mammography at 4 wavelengths between 683 and 975 nm. *Journal of Biomedical Optics*, 9(3):464–473, 2004.
- [76] P. TARONI, A. TORRICELLI, L. SPINELLI, A. PIFFERI, F. ARPAIA, G. DANESINI et R. CUBEDDU : Time-resolved optical mammography between 637 and 985 nm : clinical study on the detection and identification of breast lesions. *Physics in Medicine and Biology*, 50(11):2469–2488, 2005.
- [77] B. EBERT : Near-infrared fluorescent dyes for enhanced contrast in optical mammography : phantom experiments. *Journal of Biomedical Optics*, 6(2):134–140, 2001.
- [78] A. LIEBERT, H. WABNITZ, H. OBRIG, R. ERDMANN, M. MOLLER, R. MACDONALD, H. RINNEBERG, A. VILLRINGER et J. STEINBRINK : Non-invasive detection of fluorescence from exogenous chromophores in the adult human brain. *Neuroimage*, 31(2):600–608, 2006.
- [79] E. M. C. HILLMAN : *Experimental and theoretical investigations of near infrared tomographic imaging methods and clinical applications*. Thèse de doctorat, University College London, 2002.
- [80] B. MONTCEL : *Tomographie optique diffuse résolue en temps : Applications aux neurosciences*. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur Strasbourg 1, 2005.
- [81] W. BECKER : *The bh TCSPC Handbook*. 2005.
- [82] A. LAIDEVANT, A. DA SILVA, M. BERGER et J.-M. DINTEN : Effects of the surface boundary on the determination of the optical properties of a turbid medium with time-resolved reflectance. *Applied Optics*, 45(19):4756–4764, 2006.
- [83] S. CHANDRASEKHAR : Stochastic problems in physics and astronomy. *Rev. Mod. Phys.*, 15:1–88, 1943.
- [84] L. RADE et B WESTEREGREN : *Beta - Mathematics Handbooks*. CRC Press, 1990.
- [85] T. J. FARRELL et M. S. PATTERSON : A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the non-invasive determination of tissue optical properties in vivo. *Medical Physics*, 19(4):879–888, 1992.
- [86] R. C. HASKELL, L. O. SVASAAND, T. T. TSAY, T. C. FENG, M. S. MCADAMS et B. J. TROMBERG : Boundary conditions for the diffusion equation in radiative transfer. *Journal of the Optical Society of America A*, 11:2727–2741, 1994.
- [87] A. H. HIELSCHER, Jacques S. L., L. WANG et F. K. TITTEL : The influence of boundary conditions on the accuracy of diffusion theory in time-resolved reflectance spectroscopy of biological tissues. *Physics in Medicine and Biology*, 40:1957–1975, 1995.

- [88] G. H. BRYAN : An application of the methods of images to the conduction of heat. *Proc. London Math. Soc.*, 22:424–430, 1891.
- [89] J. D. MOULTON : Diffusion modelling of picosecond laser pulse propagation in turbid media. master's dissertation (McMaster University, Hamilton, Ont.), 1990.
- [90] R. CUBEDDU, A. PIFFERI, P. TARONI, A. TORRICELLI et Valentini G. : Experimental test of theoretical models for time-resolved reflectance. *Medical Physics*, 9:1625–1633, 1996.
- [91] J. C. LAGARIAS, J. A. REEDS, M. H. WRIGHT et P. E. WRIGHT : Convergence properties of the Nelder-Mead simplex method in low dimensions. *SIAM Journal on Optimization*, 9(1):112–147, 1998.
- [92] M. FIRBANK et D.T. DELPY : A design for a stable and reproducible phantom for use in near infra-red imaging and spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, 38(6):847–853, 1993.
- [93] M. FIRBANK, M. ODA et D. T. DELPY : An improved design for a stable and reproducible phantom material for use in near-infrared spectroscopy and imaging. *Physics in Medicine and Biology*, 40(5):955–961, 1995.
- [94] R. CUBEDDU, A. PIFFERI, P. TARONI, A. TORRICELLI et G. VALENTINI : A solid tissue phantom for photon migration studies. *Physics in Medicine and Biology*, 42(10):1971–1979, 1997.
- [95] C. V. ZINT : *Tomographie optique proche infrarouge, résolue en temps, des milieux diffusants*. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg I, 2002.
- [96] I. DRIVER, J.W. FEATHER, P.R. KING et J.B. DAWSON : The optical properties of aqueous suspensions of Intralipid, a fat emulsion. *Physics in Medicine and Biology*, 34(12):1927–1930, 1989.
- [97] H. G. van STAVEREN, C. J. M. MOES, J. van MARLE, S. A. PRAHL et M. J. C. van GEMERT : Light scattering in Intralipid-10% in the wavelength range of 400-1100 nanometers. *Applied Optics*, 30:4507–4514, 1991.
- [98] S.T. FLOCK, S.L. JACQUES, B.C. WILSON, W.M. STAR et M.J.C. VAN GEMERT : Optical properties of Intralipid : A phantom medium for light propagation studies. *Lasers in Surgery and Medicine*, 12(5):510–519, 1992.
- [99] Notice Frésenius Kabi.
- [100] C. J. M. MOES, M. J. C. VAN GEMERT, W. M. STAR, J. P. A. MARIJNISSEN et S. A. PRAHL : Measurements and calculations of the energy fluence rate in a scattering and absorbing phantom at 633 nm. *Applied Optics*, 28(12):2292–2296, 1989.
- [101] W. M. STAR et J. P. A. MARIJNISSEN : Calculating the response of isotropic light dosimetry probes as a function of the tissue refractive-index. *Applied Optics*, 28(12):2288–2291, 1989.
- [102] S.J. MADSEN, M. S. PATTERSON et B. C. WILSON : The use of india ink as an optical absorber in tissue-simulating phantoms. *Physics in Medicine and Biology*, 37(4):985–993, 1992.

- [103] A. KIENLE et M.S. PATTERSON : Improved solutions of the steady-state and the time-resolved diffusion equations for reflectance from a semi-infinite turbid medium. *Journal of the Optical Society of America A*, 14(1):246–254, 1997.
- [104] L.K. LEE, C. WHITEHURST, Q. CHEN, M.L. PANTELIDES, F.W. HETZEL et J.V. MOORE : Interstitial photodynamic therapy in the canine prostate. *British Journal of Urology*, 80(6):898–902, 1997.
- [105] M.S. THOMPSON, A. JOHANSSON, T. JOHANSSON, S. ANDERSSON-ENGELS, S. SVANBERG, N. BENDSOE et K. SVANBERG : Clinical system for interstitial photodynamic therapy with combined on-line dosimetry measurements. *Applied Optics*, 44(19):4023–4031, 2005.
- [106] T. SVENSSON, S. ANDERSSON-ENGELS, M. EINARSDOTTIR et K. SVANBERG : In vivo optical characterization of human prostatic tissue using time-resolved near infra-red spectroscopy. *In Biomed*, 2006.
- [107] L. VOISON-GOBIN : *Quantification de l'interaction lumière-tissus biologiques par la mesure non invasive du coefficient d'absorption et du coefficient réduit de diffusion*. Thèse de doctorat, Université Paris XII, 1999.
- [108] L. GOBIN, L. BLANCHOT et H. SAINT-JALMES : Integrating the digitized backscattered image to measure absorption and reduced-scattering coefficients in vivo. *Applied Optics*, 38(19):4217–4227, 1999.
- [109] M. SCHWEIGER et S. R. ARRIDGE : Application of temporal filters to time resolved data in optical tomography. *Physics in Medicine and Biology*, 44(7):1699–1717, 1999.
- [110] A. LIEBERT, H. WABNITZ, D. GROSENICK, M. MOLLER, R. MACDONALD et H. RINNEBERG : Evaluation of optical properties of highly scattering media by moments of distributions of times of flight of photons. *Applied Optics*, 42(28): 5785–5792, 2003.
- [111] X. INTES, F. LESAGE et S. LAM : Method for fluorescence tomographic imaging, 2006.
- [112] A. LAIDEVANT, A. DA SILVA et J.-M. DINTEN : Procédé et dispositif de reconstruction 3D de la distribution d'éléments fluorescents, 2006.
- [113] A. LAIDEVANT, A. DA SILVA, P. PELTIE, J.-M. DINTEN, C. D'ANDREA, L. SPINELLI, G. VALENTINI et R. . CUBEDDU : Time-resolved imaging of a fluorescent inclusion in a turbid medium using a gated CCD camera. *In Biomed*, 2006.