



HAL
open science

Imagerie spectrale pour l'étude de structures profondes par tomographie optique diffusive de fluorescence

Anne-Sophie Montcuquet

► **To cite this version:**

Anne-Sophie Montcuquet. Imagerie spectrale pour l'étude de structures profondes par tomographie optique diffusive de fluorescence. Biophysique [physics.bio-ph]. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT: . tel-00557141

HAL Id: tel-00557141

<https://theses.hal.science/tel-00557141>

Submitted on 18 Jan 2011

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.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE
ÉCOLE DOCTORALE ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE,
AUTOMATIQUE & TRAITEMENT DU SIGNAL

THÈSE

pour obtenir le grade de :

Docteur de l'Université de Grenoble

Spécialité : Signal, Image, Parole, Telecoms

Anne-Sophie MONTCUQUET

Imagerie spectrale pour l'étude de structures profondes par tomographie optique diffuse de fluorescence

Soutenue le 17 décembre 2010
devant le jury composé de :

M. Christian JUTTEN	Président
Mme Geneviève BOURG-HECKLY	Rapporteur
M. David BRIE	Rapporteur
Mme Christine VEVER-BIZET	Examineur
M. Yannick DEVILLE	Examineur
M. Jérôme MARS	Directeur de thèse
M. Jean-Marc DINTEN	Encadrant
M. Lionel HERVÉ	Encadrant

Laboratoire Images et Systèmes d'Acquisition - CEA-LETI - Grenoble
Laboratoire Gipsa-lab - Département Images-Signal - Grenoble

Remerciements

Cette thèse s'est déroulée au Laboratoire Imagerie et Systèmes d'Acquisitions (LISA) du CEA de Grenoble. Je remercie les chefs de département et de service, respectivement messieurs Jean Chabbal et Olivier Peyret pour leur accueil. Je remercie également Philippe Rizo, chef du laboratoire à mon arrivée, pour sa confiance et son aide jusqu'à la fin de ma thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude à David Brie et Geneviève Bourg-Heckly pour avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux, ainsi qu'à Christine Vever-Bizet et Yannick Deville. Je tiens également à remercier Christian Jutten qui a d'une part appris à mes parents à jouer au tennis, mais a surtout accepté d'être président de mon jury. Merci également à mesdames Bourg-Heckly et Vever-Bizet pour nos discussions sur le problème de l'autofluorescence tout au long de la thèse, et à David Brie pour nos échanges enrichissants autour de la problématique de séparation de sources.

Je décerne à Jérôme Mars le prix de meilleur directeur de thèse, pour sa disponibilité, son enthousiasme et ses critiques constructives. Lionel Hervé et Jean-Marc Dinten remportent de leur côté haut la main le titre d'encadrants CEA de l'année : merci pour votre intérêt et vos remarques qui m'ont permis d'avancer, merci aussi pour votre temps et votre patience.

Merci à Michel Berger, le vrai, et Mathieu Debourdeau pour leur aide précieuse sur mon projet. Merci également aux chimistes et biologistes, en particulier Julien Gravier et Isabelle Texier-Nogues. Merci beaucoup à Fabrice Navarro qui n'a jamais perdu patience et a toujours donné de son temps pour me permettre d'obtenir des résultats sur petit animal (merci aussi pour ses choix musicaux pointus et toujours appropriés). Enfin je tiens à remercier également Véronique Jossierand et Michelle Keramidas de l'Institut Albert Bonniot pour leur aide en expérimentation, et la team Fluoptics, en particulier Stéphanie Guillermet.

Merci ensuite à mes collègues pour leur soutien, leur bonne humeur et leur humour, Aurélie qui m'a accompagnée et beaucoup aidée pendant la thèse, mais aussi en dehors du travail, re-Lionel, Thomas, Cédric, Vincent, Sylvain, Mathieu D. et Mathieu D., Marco, Ludovic (je te nomme d'ailleurs officiellement par cette note de remerciements chef de la cabane), Frédéric, François, Michael, Anne(s), Agathe, Nicolas L., Nicolas D., Philippe P., Michel, Jean-Guillaume, Véronique, Henri, Jean, Laurent et tous les autres. Un grand merci au groupe du LDET pour les repas si sympathiques en leur compagnie : Nicolas, Milan, Caroline, Joachim, Jean, Charlotte, Marie-Laure, Guillaume, Eric, Andrea et Elisa.

Je voudrais terminer en remerciant mes parents, mon frère Nicolas et mes soeurs Aurélie et Christel, Michaël et Véronique, mes amis, et enfin Maxime.

Résumé

L'imagerie optique de fluorescence permet de localiser des cibles biologiques comme des tumeurs, marquées par des fluorophores. Pour des applications au diagnostic chez l'Homme où l'épaisseur des tissus atteint plusieurs centimètres, la détection parasite de l'autofluorescence naturelle des tissus compromet la détection de la fluorescence d'intérêt et son élimination est la condition *sine qua non* d'une localisation correcte de la tumeur.

L'objet de cette thèse a été l'étude spectrale de l'autofluorescence des tissus et la mise au point d'une méthode de séparation de spectres aveugle permettant de supprimer sa contribution des mesures. La Factorisation en Matrices Non-négatives a été privilégiée, et de nouveaux algorithmes ont été proposés et testés sur données réelles. Nous avons démontré les performances de notre méthode dans l'amélioration de la détection des marqueurs et la reconstruction de la position de la tumeur en tomographie optique diffuse de fluorescence.

MOTS-CLÉS : Spectroscopie de fluorescence, autofluorescence, séparation de sources, Factorisation en Matrices Non-négatives.

Abstract

Fluorescence optical imaging locates biological targets such as tumors tagged with fluorescent markers. For medical diagnostic applications where thickness of media reaches a few centimeters, unwanted autofluorescence of tissues prevents the detection of fluorescence signal of interest : its removal is a *sine qua non* condition to an accurate tumor localization.

The aims of this thesis was to spectrally study natural fluorescence of tissues and to develop a blind source separation method to remove autofluorescence contribution from measurements. Nonnegative Matrix Factorization method was chosen, original algorithms were proposed, and tested on real data. We proved our method is highly efficient to improve the detection of markers and the localization of tumors in Fluorescence Diffuse Optical Tomography reconstructions.

KEY-WORDS : Fluorescence spectroscopy, autofluorescence, source separation, Nonnegative Matrix Factorization.

Table des matières

Liste des figures	xiv
Acronymes	xv
Introduction générale	1
1 Imagerie Optique en milieux diffusants	5
1.1 Introduction	7
1.1.1 Systèmes d'imagerie adaptés à l'oncologie	7
1.1.2 Imagerie optique de fluorescence dans le proche infrarouge	13
1.1.3 Marqueurs fluorescents	16
1.2 Interaction de la lumière avec les tissus biologiques	20
1.2.1 Absorption et fenêtre thérapeutique	21
1.2.2 Diffusion	22
1.3 Propagation de la lumière	24
1.3.1 Luminance	24
1.3.2 Équation de transfert radiatif	24
1.3.3 Approximation de la diffusion	26
1.4 Détection et localisation de tumeurs	28
1.4.1 Exemples : les cancers du sein et de la prostate	28
1.4.2 Détection et localisation	31
1.5 Élimination de l'autofluorescence	33
1.5.1 Problématique	34
1.5.2 État de l'art	34
1.5.3 Solution proposée : la séparation de spectres	37
2 Dispositif expérimental et supports d'étude	41
2.1 Système d'acquisition	43
2.1.1 Matériel	44
2.1.2 Écartement sources-détecteurs	47

2.1.3	Acquisitions	49
2.2	Expérimentation	49
2.2.1	Fantômes optiques	50
2.2.2	Expérimentation <i>in vivo</i> sur souris	53
2.2.3	Marqueurs fluorescents utilisés	54
2.3	Simulations : exemple du sein	57
2.3.1	Théorie	58
2.3.2	Exemple	60
3	Étude des sources fluorescentes	65
3.1	Fluorescence naturelle des tissus	67
3.1.1	Autofluorescence dans le visible	67
3.1.2	Autofluorescence dans le proche infrarouge	68
3.2	Origine de l'autofluorescence dans le rouge	70
3.2.1	Origine exogène	71
3.2.2	Origine endogène	73
3.3	Comportement spectral de l'autofluorescence	77
3.3.1	Variation des spectres	77
3.3.2	Influence de l'illumination	79
3.4	Comportement spectral des marqueurs	81
3.4.1	Influence du milieu sur les marqueurs	81
3.4.2	Influence du système expérimental	85
4	Séparation de spectres	91
4.1	Séparation de spectres et autofluorescence	93
4.1.1	Premières approches	93
4.1.2	Séparation de sources aveugle	100
4.2	Factorisation en Matrices Non-négatives	106
4.2.1	Algorithme classique	106
4.2.2	Non-unicité de la décomposition	108
4.2.3	Distorsion des spectres de fluorescence	111
4.3	Propositions de régularisations	115
4.3.1	Étude de l'influence de l'initialisation	115
4.3.2	Prise en compte de l'information <i>a priori</i> sur les spectres	121
4.3.3	Apport de contraintes de parcimonie spatiale	125
5	Résultats sur fantômes et données <i>in vivo</i>	135
5.1	Influence de l'écart sources-détecteurs	137
5.1.1	Sur fantôme optique	137
5.1.2	Résultats <i>in vivo</i>	138
5.2	Un seul type de marqueur fluorescent utilisé	140
5.2.1	Détection d'une seule tumeur	140
5.2.2	Détection de plusieurs tumeurs	149
5.3	Multiplexage	151
5.3.1	Deux marqueurs en capillaires	151

5.3.2	Injection sur souris	154
5.4	Séparation de spectres et reconstructions FDOT	155
5.4.1	Méthode de reconstruction	156
5.4.2	Exemple sur fantôme optique	162
Conclusion et perspectives		169
A Spectromètre Andor : fiche technique		175
B Caméra CCD Andor : fiche technique		183
C Caractérisation Spectro+CCD		191
C.1	Linéarité du système	191
C.2	Bruits de lecture et d'obscurité	191
C.2.1	Bruit de lecture	191
C.2.2	Bruit d'obscurité	192
C.2.3	Le courant d'obscurité	193
D Détermination des propriétés optiques		195
D.0.4	Présentation de la chaîne d'acquisition TCSPC	195
D.0.5	Interprétation des TPSF	197
D.0.6	Détermination des paramètres optiques à partir des TPSF	200
E Protocole d'expérimentation sur souris		203
F Caractéristiques du Vert d'indocyanine		213
G Comparaison des méthodes		221
G.0.7	La SVD	222
G.0.8	Méthode séparation bayésienne de sources positives (BPSS)	224
G.0.9	La FMN	224
H Démonstration du Théorème 1		229
I Exemple tumeur réelle marquée par de l'IR800		233
Liste des publications et communications		237
I.0.10	Revue à comité de lecture	237
I.0.11	Congrès internationaux	237
I.0.12	Congrès nationaux	238
I.0.13	Brevets	239

Liste des figures

1.1	Premiers examens en imagerie X	8
1.2	Echelle de longueurs d'onde et d'énergie photonique	8
1.3	Exemple de mammographie crânio-caudale	9
1.4	Localisation de métastases par TEP	10
1.5	Imagerie du cerveau par IRM	10
1.6	Imagerie de la prostate par ultra-sons	11
1.7	Observation du sein par transillumination	11
1.8	Exemples en imagerie préclinique	12
1.9	Exemple couplage TEP-CT sur un cancer du colon	14
1.10	Imagerie petit animal : couplage optique et rayons X	14
1.11	Diagramme de Jablonski pour la spectroscopie de fluorescence	15
1.12	Fluorophores endogènes des tissus biologiques	17
1.13	Performances traceur fluorescent Cy5-labeled RAFT-c(-RGDFK-) ₄	18
1.14	Marqueurs activables à chaînes peptides	19
1.15	Marqueurs activables par le pH	20
1.16	Absorption de la lumière	21
1.17	Fenêtre thérapeutique	22
1.18	Diffusion de la lumière	22
1.19	Anisotropie de diffusion	23
1.20	Définition de la luminance	25
1.21	Établissement de ETR	25
1.22	Anatomie du sein	28
1.23	Anatomie du sein	29
1.24	Anatomie de la prostate	30
1.25	IRM de la prostate	31
1.26	Définition du contraste tumeur/tissu sain	32
1.27	Exemple de couple <i>problème direct/problème inverse</i>	33
1.28	Images multi-modes et multispectrales d'une souris par Kodak	35
1.29	Image multispectrale d'une souris par le groupe CRI	36

1.30	Exemple d'élimination de l'auto fluorescence, groupe Caliper	37
1.31	Élimination de l'auto fluorescence par séparation de spectre	38
2.1	Dispositif expérimental	43
2.2	Spectromètre imageur	44
2.3	Montée de filtre	45
2.4	Choix de la longueur d'onde d'excitation	46
2.5	Transmittance filtre RG9	47
2.6	Simulation : écart sources-détecteurs nul	48
2.7	Simulation : écart sources-détecteurs à 4 cm	48
2.8	Acquisition résolue spectralement	49
2.9	Réorganisation données	50
2.10	Absorption de l'encre de chine	51
2.11	Diffusion de l'intralipide 10%	52
2.12	Fantôme autofluorescent	52
2.13	Exemple de fantôme de sein	53
2.14	Gouttelette d'huile dans le système de nano-émulsion	55
2.15	Spectres d'absorption et de fluorescence de l'ICG	56
2.16	Schéma de structure RAFT-(cRGD) ₄ plus un fluorophore	57
2.17	Spectres d'absorption et de fluorescence de l'IRDye800	58
2.18	Absorption et diffusion réduite simulées	59
2.19	Schéma de propagation de la lumière dans le sein	60
2.20	Données de sein simulées	61
3.1	Saturation de double liaison	68
3.2	Auto fluorescence rat	69
3.3	Auto fluorescence souris saine	69
3.4	Auto fluorescence souris saine	70
3.5	Auto fluorescence tissu mammaire	71
3.6	Absorption et fluorescence chlorophylle a	72
3.7	Influence d'un régime purifié	73
3.8	Absorption PPIX	74
3.9	Comparaison PPIX et auto fluorescence, excitation à 532 nm	75
3.10	Saturation de double liaison	76
3.11	Spectres auto fluorescence	78
3.12	Spectres auto fluorescence	78
3.13	Évolution de l'auto fluorescence avec le temps	79
3.14	Évolution auto fluorescence avec le temps : spectres normalisés	80
3.15	Influence de l'intensité laser sur l'auto fluorescence	80
3.16	Spectres d'émission de l'ICG dans différents solvants	82
3.17	Modifications <i>in vivo</i>	83
3.18	Simulations : déformation et extinction des spectres de fluorescence	84
3.19	Expérimentation fantôme : coefficient k	84
3.20	Expérimentation fantôme : distorsion des spectres	85
3.21	Photoblanchiment ICG-LNP	86

3.22	Influence de l'intensité laser sur les fluorophores	87
3.23	Exemple réglage puissance	87
4.1	Exemple d'acquisition	94
4.2	Soustraction de modèle	95
4.3	Résultat méthode de soustraction de modèle	96
4.4	Valeurs singulières et élimination du bruit	97
4.5	Résultat de la méthode SVD	99
4.6	Résultat de la méthode BPSS	103
4.7	Résultat de la méthode FMN	106
4.8	Gamme de solutions d'après la théorie	110
4.9	Gamme de solutions après répétition de l'algorithme FMN	110
4.10	Simulation d'une tumeur dans un sein autofluorescent	112
4.11	Distorsion et perte d'intensité	112
4.12	Simulation avec deux tumeurs	113
4.13	Distorsion et SVD	114
4.14	Distorsion et SVD 2	115
4.15	Exemple de simulation du sein pour tester l'initialisation	116
4.16	Résultat du contraste sur donnée simulées par profondeur	117
4.17	Contraste obtenu avec une initialisation aléatoire	118
4.18	Contraste obtenu avec une initialisation de S	118
4.19	Définition d'une gamme de modèles d'initialisation	119
4.20	Contraste obtenu après initialisation à départ multiples	120
4.21	Effet du choix du paramètre α (1)	124
4.22	Comparaison de notre algorithme avec celui de Berry <i>et al.</i>	126
4.23	Concept de parcimonie spatiale	127
4.24	Exemple de valeurs de parcimonie	127
4.25	Estimation de la valeur de la parcimonie	128
4.26	Exemple sur données simulées	130
4.27	Comparatif d'algorithmes sur données parcimonieuses simulées	131
5.1	Écart entre les sources et les détecteurs : exemple sur fantôme	138
5.2	Influence de l'écart sources-détecteurs sur fantôme	138
5.3	Écart entre les sources et les détecteurs : exemple <i>in vivo</i>	139
5.4	Écart entre les sources et les détecteurs : résultats <i>in vivo</i>	139
5.5	Allure des spectres d'autofluorescence et d'ICG-LNP	141
5.6	Expérience sur un seul capillaire : présentation	142
5.7	Expérience sur un seul capillaire : résultats	143
5.8	Allure du spectre d'IRDye800	145
5.9	Expérience sur tumeur : présentation	145
5.10	Signal non spécifique mesuré 48 h après injection des marqueurs	146
5.11	Résultats de détection d'IR800 sur tumeur sous-cutanée	147
5.12	Résultats de détection d'ICG-LNP sur tumeur sous-cutanée	148
5.13	Détection ICG-LNP non spécifique	148
5.14	Expérience sur capillaires, deux profondeurs : présentation	150

5.15	Résultats de détection de capillaires à deux profondeurs	151
5.16	Multiplexage sur capillaires : présentation	152
5.17	Allure du spectre d'Alexa 750	152
5.18	Résultats de l'exemple de multiplexage sur capillaires	153
5.19	Spectre d'émission du FP750	154
5.20	Multiplexage <i>in vivo</i> : présentation	155
5.21	Multiplexage <i>in vivo</i> : résultats	156
5.22	Reconstruction sur fantôme : présentation	163
5.23	Reconstruction sur fantôme : résultats de la \mathbf{FMN}_{pdm}	164
5.24	Résultats de la reconstruction avant et après FMN	165
C.1	Étude de la linéarité du système	192
C.2	Définition des bruits de lecture et d'obscurité	192
C.3	Mesure des bruits de lecture et d'obscurité	193
C.4	Courant d'obscurité de la caméra CCD	194
D.1	Schéma de la chaîne d'acquisition TCSPC	196
D.2	Principe du TCSPC	196
D.3	Mesure de l'IRF	196
D.4	La TPSF mesurée, convolution de la TPSF vraie par l'IRF	197
D.5	Notations pour le signal mesuré sur la fibre de détection	199
D.6	Détermination de la TPSF vraie	201
D.7	Détermination de la TPSF vraie	202
G.1	Exemple d'acquisition	221
G.2	Résultat valeurs singulières méthode SVD	222
G.3	Résultat méthode SVD	223
G.4	Résultat méthode SVD : 3 ^e et 4 ^e sources	223
G.5	Résultat méthode SVD : sous-espaces signal et bruit	224
G.6	Résultat méthode BPSS : spectres et coefficients de mélange	225
G.7	Résultat méthode BPSS	225
G.8	Résultat méthode FMN : spectres de fluorescence et coefficients de mélange	226
G.9	Résultat méthode FMN	226
H.1	Fonction auxiliaire : principe	230
I.1	Résultats de détection d'IR800 sur tumeur sous-cutanée (2)	234

 Abréviations et acronymes

AD	approximation de diffusion	198
ALS	Alternating Least Squares	36
BPSS	séparation bayésienne de sources positives	ix
BSS	Séparation de Sources Aveugle	
CCD	dispositif à transfert de charge	35
CRI	Cambridge Research & Instrumentation	34
CT-scan	Computed Tomography-scan	7
DMSO	diméthylsulfoxyde	81
DOT	Diffuse Optical Tomography	12
DRE	Digital Rectal Examination	11
ETR	équation de transfert radiatif	24
FDA	Food and Drug Administration	16
FDOI	Fluorescence Diffuse Optical Imaging	
FDOT	Fluorescence Diffuse Optical Tomography	12
FMN	Factorisation en Matrices Non-négatives	89
FMP	Factorisation en Matrices Positives	101
GFP	protéine fluorescente verte	35
HBS	HEPES buffered saline	
IAB	Institut Albert Bonniot	56
ICA	Analyse en Composantes Indépendantes	93
ICG	Indocyanine Green	16
ICG-LNP	nanoparticules lipidiques chargées en ICG	
IRF	réponse de l'instrument	196
IRM	imagerie par résonance magnétique	9
LISA	Laboratoire d'Imagerie et de Systèmes d'Acquisition	
MCR	Multivariate Curve Resolution	2
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide	

PCA	Analyse en composantes principales.....	93
PM	photomultiplicateur	195
PPP	photoporphyrine	75
PPIX	protoporphyrine IX.....	51
PSA	antigènes prostatiques spécifiques.....	30
RAFT	Regioselectively Addressable Functionalized Template.....	19
RGD	Acide Arginine-Glycine-Aspartic	
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire	9
SCA	Sparse Component Analysis	100
SPECT	tomographie d'émission monophotonique	
SVD	Décomposition en Valeurs Singulières	93
TEP	Tomographie par Emission de Positons	9
TCSPC	Comptage de Photons Uniques Corrélés dans le Temps.....	52
TPSF	fonction d'étalement temporelle du point	195

Introduction générale

Avec près de 320 000 nouveaux cas décelés en France en 2005, soit environ 89% de plus qu'en 1980 (données ifop), le cancer est indéniablement l'un des plus importants problèmes de santé publique actuels. La lutte contre le cancer constitue l'un des axes majeurs de la recherche biomédicale française et internationale qui s'efforce de mettre notamment au point des techniques de dépistage simples, sensibles et spécifiques pour éviter des examens douloureux et coûteux aux patients (données Ligue contre le cancer). Aux côtés des méthodes de diagnostic généralement utilisées comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou l'imagerie fonctionnelle en médecine nucléaire, l'imagerie moléculaire optique a connu un essor important depuis une vingtaine d'années avec en particulier l'émergence de la tomographie optique diffuse. Ce nouveau mode d'imagerie peu coûteux et non ionisant apporte une information complémentaire aux techniques habituellement utilisées dans la détection de cancers. Les progrès réalisés depuis les années 2000 en chimie dans le domaine de la synthèse de marqueurs fluorescents ont permis d'ajouter une nouvelle dimension à l'imagerie optique diffuse. L'utilisation de marqueurs fluorescents permet d'augmenter la sensibilité et le contraste : injectés aux patients, les marqueurs - ou fluorophores - circulent dans le sang ou les canaux lymphatiques pour atteindre des cibles biologiques, par exemple des tumeurs cancéreuses. Soit les tumeurs expriment des récepteurs spécifiques sur lesquels les marqueurs peuvent se fixer, soit la vascularisation plus importante dans la zone tumorale permet aux marqueurs de s'accumuler autour d'elles.

Les tissus biologiques possèdent une fenêtre dans le rouge et proche infrarouge (entre 600 et 900 nm environ) dans laquelle la pénétration de la lumière sur plusieurs centimètres est possible ; l'excitation des marqueurs par une source lumineuse dans ces longueurs d'onde favorise l'exploration des tissus en profondeur. Lorsque les marqueurs fluorescents sont excités par le faisceau laser incident, ils émettent un signal de fluorescence détecté par une caméra ou collecté par des fibres optiques. La tomographie optique diffuse de fluorescence (FDOT) permet de reconstruire en trois dimensions la distribution en marqueurs dans le milieu à partir des mesures de fluorescence, et de localiser précisément la tumeur. Cependant lorsque le faisceau incident excite les marqueurs

fluorescents injectés au patient, il sollicite également tous les fluorophores présents naturellement dans le milieu ; ce signal fluorescent inhérent aux tissus biologiques est appelé l'autofluorescence des tissus.

Après notamment la mise au point d'un tomographe pour l'imagerie de fluorescence du petit animal [Koenig 8], les travaux menés au sein du laboratoire Images et Systèmes d'Acquisition (LISA) en tomographique optique diffuse de fluorescence visent aujourd'hui des applications cliniques telles que la mammographie ou le guidage de la biopsie pour le cancer de la prostate. Les profondeurs de tissus à explorer atteignent alors plusieurs centimètres. Plus les marqueurs sont localisés en profondeur dans les tissus diffusants, plus les interactions lumière-tissus affectent la détection du signal fluorescent d'intérêt. Dans de telles configurations, le contraste entre le signal des marqueurs fluorescents et l'autofluorescence est fortement diminué, et l'élimination de l'autofluorescence parasite est la condition *sine qua non* d'une localisation correcte de la tumeur.

Outre leur meilleure pénétration dans les tissus, les longueurs d'onde d'excitation dans le rouge ont de surcroît l'avantage de solliciter peu de fluorophores naturels des tissus. Cette caractéristique, couplée à l'étude encore nouvelle des méthodes optiques pour le clinique a pour conséquence un état de l'art encore pauvre sur l'élimination de l'autofluorescence des tissus en imagerie optique de fluorescence.

Les quelques groupes qui se sont penchés sur ce problème (nous pourrions citer par exemple Carestream, Cambridge Research & Instrumentation et Caliper Life Sciences), ont tous opté pour des méthodes permettant de discriminer le signal d'autofluorescence des tissus par spectroscopie de fluorescence. Pour des applications sur petit animal, le groupe CRI s'appuie sur la connaissance soit du spectre des marqueurs injectés pour en déduire le signal d'autofluorescence et alors l'éliminer automatiquement, soit directement sur la connaissance précise du spectre d'autofluorescence [Hoyt 06, Cronin 05] et la méthode des moindres carrés. Face à eux, le groupe Carestream a mis au point des méthodes multispectrales qui permettent de faire varier les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sur leur système (par le biais de roues de filtres permettant de sélectionner la longueur d'onde d'excitation et la gamme de longueurs d'onde d'émission) ; leur approche d'élimination de l'autofluorescence utilise des modèles de spectres gaussiens, et une optimisation par moindres carrés non linéaires [Wood 08]. Enfin, le groupe Caliper propose une méthode basée sur la technique Multivariate Curve Resolution (MCR) qui modélise les données mélangées par une factorisation de deux matrices, l'une contenant l'information sur les spectres des sources, l'autre sur la concentration des spectres purs dans le milieu [Xu 09]. Leur méthodologie est très proche de celle que nous avons mise en œuvre pendant la thèse et a été développée quasiment en même temps que la nôtre.

Hormis les résultats récents de Caliper, les méthodes proposées dans l'état de l'art restent peu nombreuses, et sont satisfaisantes pour l'imagerie petit animal à laquelle elles sont destinées, où l'épaisseur des tissus à étudier est minimale (1 à 2 cm). Cependant pour le diagnostic chez l'Homme, quand les profondeurs de tissus à analyser sont de l'ordre de plusieurs centimètres, l'élimination du signal d'autofluorescence doit reposer sur une méthode beaucoup plus robuste que celles proposées jusqu'à maintenant.

L'objectif principal de la thèse a donc été l'étude spectrale de l'autofluorescence des tissus en vue de supprimer sa contribution de nos données et d'améliorer les reconstructions en tomographie optique diffuse de fluorescence des distributions de marqueurs en profondeur. Dans ce but, plusieurs domaines complémentaires ont été explorés :

- la mise en place d'un dispositif expérimental nouveau consacré à l'acquisition de mesures résolues en longueur d'onde,
- l'étude spectrale *in vivo* de l'autofluorescence sur petit animal, ainsi que du comportement des marqueurs selon leur profondeur dans les tissus,
- le développement de méthodes de séparation de spectres adaptées à nos données permettant de filtrer le signal d'autofluorescence, et d'identifier le signal de fluorescence d'intérêt.

Ce manuscrit retrace les différentes étapes de la thèse, et s'organise en cinq chapitres :

Le **chapitre 1** propose un tour d'horizon des techniques d'imagerie médicale aujourd'hui utilisées en oncologie dans la détection de cancers, avant de se focaliser sur l'imagerie optique diffuse de fluorescence et d'en présenter le contexte et les principes fondamentaux. Enfin ce chapitre dresse l'état de l'art concernant l'élimination du signal d'autofluorescence parasite en imagerie optique de fluorescence, et introduit la méthodologie que nous adoptons pour résoudre cette même problématique.

Afin de mettre en place une méthode d'élimination de l'autofluorescence par séparation de spectres, nous avons imaginé et monté un nouveau dispositif expérimental de mesure résolue en longueur d'onde (**chapitre 2**). Le système illumine le volume analysé et récupère en géométrie de réflexion les mesures de fluorescence par le biais d'un spectromètre couplé à une caméra CCD. Nous présentons les divers supports, les protocoles d'acquisition adaptés que nous avons mis en place. Enfin pour compléter le jeu de données réelles, et tester l'algorithmie développée pour des configurations et des paramètres optiques plus contrôlables, des simulations à partir de données cliniques du sein sont proposées.

L'étude du comportement spectral de l'autofluorescence des tissus, et des marqueurs fluorescents utilisés sur notre système (**chapitre 3**) met en évidence la variation des spectres de fluorescence mesurés *in vivo* selon les composants du milieu d'accueil, les caractéristiques optiques (absorption et diffusion), ou encore selon la profondeur de la tumeur ciblée dans les tissus. Cette étude permet de converger vers une méthode de séparation de sources aveugle, ou peu d'information *a priori* est requise au départ.

Dans le **chapitre 4** qui est le coeur de notre travail, nous présentons quelques procédés de séparation de spectres mise en œuvre en début de thèse avant de nous focaliser sur l'étude de méthodes de séparation de sources aveugles comme les résultats du chapitre 3 le préconisent. Des deux techniques particulières de séparation de sources positives aveugle que nous avons testées sur nos données, nous adopterons la méthode par Factorisation en Matrices Non-négatives dont l'implémentation simple et les temps de convergence rapides ont fait pencher la balance en sa faveur. La factori-

sation obtenue par cette méthode n'étant pas unique, l'apport d'information *a priori* est primordiale pour restreindre l'ensemble de solutions admissibles. Nous proposons plusieurs algorithmes régularisés (contrainte sur la forme des spectres, et sur la représentation parcimonieuse des marqueurs dans les tissus par exemple) pour lesquels les conditions de convergence ont été examinées.

L'implémentation de ces divers algorithmes nous permet de les appliquer sur données réelles : le **chapitre 5** expose les résultats obtenus. L'élimination de l'autofluorescence et la séparation de plusieurs fluorophores par les méthodes FMN régularisées sont ainsi testées sur fantômes optiques, et sur souris *in vivo*. Enfin nous illustrons à travers un exemple l'intérêt du prétraitement des données par FMN dans l'amélioration des reconstructions en tomographie optique de fluorescence des milieu diffusants.

CHAPITRE 1

Imagerie Optique en milieux diffusants : application à l'oncologie

Après une introduction historique sur les techniques d'imagerie utilisées en oncologie, ce chapitre introduit une nouvelle méthode d'imagerie fonctionnelle apparue depuis les années 2000 grâce aux progrès réalisés en chimie dans le domaine de la synthèse de marqueurs fluorescents : l'imagerie optique diffuse de fluorescence. Les marqueurs fluorescents présentés dans ce chapitre sont spécifiques à des cibles biologiques telles les tumeurs cancéreuses, et offrent des contrastes prometteurs pour la détection de cellules cancéreuses chez l'Homme.

Nous proposons ensuite d'étudier la théorie de l'interaction de la lumière avec les tissus, en développant les notions d'absorption, de diffusion et de fluorescence. De cette étude découlera la mise en équation d'un modèle de propagation des photons dans les tissus biologiques, modèle qui sera utilisé pour nos représentations tridimensionnelles du milieu étudié.

En ciblant notre étude au cas des cancers du seins et de la prostate, nous posons le problème de la localisation et de la détection de tumeurs cancéreuses marquées en imagerie optique diffuse. Un des freins à la localisation et à la reconstruction précise des distributions de fluorescence en profondeur dans les tissus est la fluorescence naturelle de ces tissus, appelée **autofluorescence**.

La dernière partie de ce chapitre entre dans le vif du sujet en définissant la problématique de la thèse, à savoir discriminer le signal d'intérêt émis par les fluorophores injectés de l'autofluorescence parasite des tissus biologiques. Après un tour d'horizon des procédés utilisés par différents centre de recherches, nous présentons la méthode que nous avons décidé d'adopter pour résoudre notre problématique.

Sommaire

1.1	Introduction	7
1.1.1	Systèmes d'imagerie adaptés à l'oncologie	7
1.1.2	Imagerie optique de fluorescence dans le proche infrarouge	13
1.1.3	Marqueurs fluorescents	16
1.2	Interaction de la lumière avec les tissus biologiques	20
1.2.1	Absorption et fenêtre thérapeutique	21
1.2.2	Diffusion	22
1.3	Propagation de la lumière	24
1.3.1	Luminance	24
1.3.2	Équation de transfert radiatif	24
1.3.3	Approximation de la diffusion	26
1.4	Détection et localisation de tumeurs	28
1.4.1	Exemples : les cancers du sein et de la prostate	28
1.4.2	Détection et localisation	31
1.5	Élimination de l'autofluorescence	33
1.5.1	Problématique	34
1.5.2	État de l'art	34
1.5.3	Solution proposée : la séparation de spectres	37

1.1 Introduction

1.1.1 Systèmes d'imagerie adaptés à l'oncologie

Avec près 320 000 nouveaux cas en 2005 contre 160 000 en 1980, le cancer est un des problèmes de santé publique actuels les plus importants en France. L'augmentation s'explique principalement par un effet démographique : la population française vit de plus en plus longtemps, et à un âge donné pour 100 000 habitants, il y a moins d'incidence de cancers. Ces chiffres traduisent également un meilleur dépistage de cette maladie avec l'apparition depuis les années 1980 de divers outils d'imagerie médicale adaptés au diagnostic du cancer, et qui ont contribué à une meilleure détection de la maladie, et donc à un meilleur traitement et suivi. Le taux de mortalité de cette maladie a d'ailleurs baissé de près de 25% entre 1980 et 2005. Enfin, entre 35 et 64 ans, le cancer est de très loin la maladie la plus mortelle, et la probabilité d'avoir un cancer au cours de sa vie est estimée à une sur deux pour un homme et une sur trois pour une femme (statistiques tirées de <http://www.fmrc.fr>).

Le diagnostic du cancer occupe une tranche importante de la recherche biomédicale ; l'objectif est d'améliorer les systèmes d'imagerie existants et développer de nouvelles techniques pour la détection, comme l'imagerie optique diffuse. Nous proposons de revenir brièvement sur quelques techniques d'imagerie utilisées aujourd'hui [Hendee 03] ou envisagées pour le dépistage et le suivi de cancers.

Imagerie X La radiographie est devenue une spécialité médicale dans la première décennie du XX^e siècle, après la découverte des rayons X par le Professeur Roentgen en 1895 (cf. la photographie 1.1).

Les rayons X sont un rayonnement électromagnétique à haute fréquence, à une longueur d'onde comprise approximativement entre 5 picomètres et 10 nanomètres (voir l'échelle sur la figure 1.2).

Dès les années 1970, les rayons X sont utilisés pour des examens scanner (on parle de tomodensitométrie ou encore de Computed Tomography-scan (CT-scan)), examens de référence dans les traitements en radiothérapie. Cette technique consiste à mesurer l'absorption des rayons X par les tissus pour reconstruire des images 2D ou 3D des structures anatomiques. Avec l'apparition des images 3D, les structures anatomiques ne sont plus superposées par rapport aux vues planaires et permettent d'obtenir un très bon contraste tissulaire. De plus, l'utilisation couplée d'agents de contraste améliore la résolution des informations anatomiques obtenues. Cependant, l'exposition répétée aux

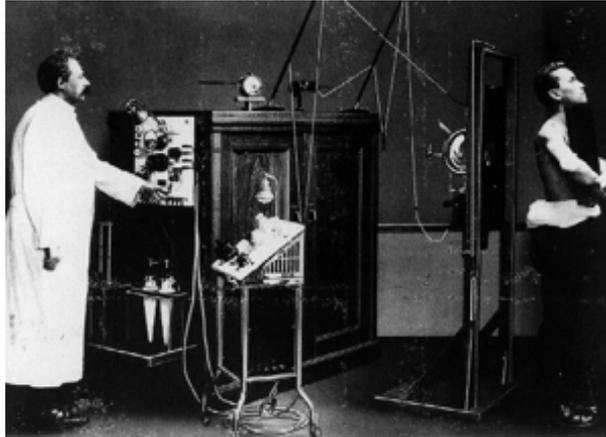


FIGURE 1.1: *Premiers examens en imagerie X au début des années 1900 (tiré de www.imaginis.com).*

rayons X peut être nocive pour l'organisme, de part son pouvoir ionisant et cancérigène, et fait de lui un outil médical utilisé lorsque la demande d'examen est justifiée [Hall 08]. Mais le rapport bénéfice/risque lié à l'irradiation penche largement en faveur de l'examen scanner, ce qui en fait une technique d'imagerie médicale de plus en plus pratiquée en oncologie.

Pour la détection particulière du cancer du sein, la mammographie en rayons X reste l'examen privilégié [Schradin 08] (voir exemple figure 1.3). Cet examen utilise des rayons X de faible énergie (entre 20 et 50 keV) et vise à déceler les cancers du sein de façon précoce, à travers la détection de masses caractéristiques et/ou de microcalcifications.

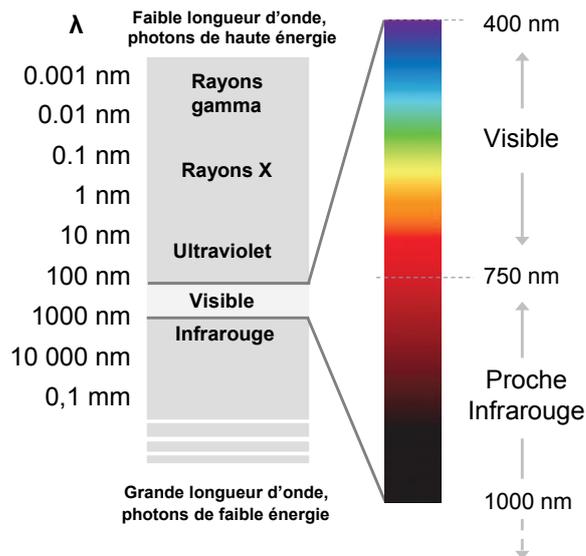


FIGURE 1.2: *Echelle de longueurs d'onde et énergie des photons : détail de la gamme du visible.*

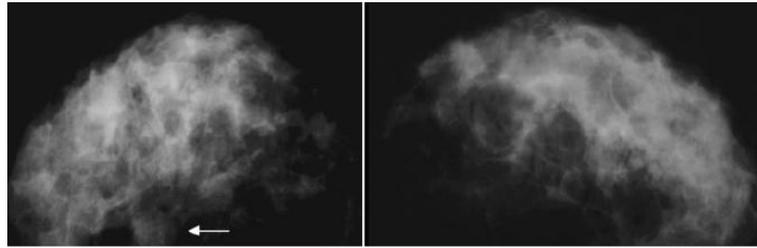


FIGURE 1.3: Mammographie crânio-caudale des seins droit et gauche révélant une masse sans calcification dans la région prépectorale du sein droit (tiré de [Schradling 08]).

Médecine nucléaire La médecine nucléaire est une famille de techniques d'imagerie qui utilisent des traceurs capables de se fixer à une cible biologique. Un des marqueurs le plus souvent utilisé est le fluor 18F, incorporé dans une molécule de glucose formant alors le traceur 18F-fluorodésoxyglucose. Ce traceur se fixe alors sur des tissus qui consomment de grandes quantités de glucose, comme les tissus cancéreux, le muscle cardiaque ou encore le cerveau. Les traceurs une fois localisés sur la cible biologique émettent une faible radiation, permettant de les localiser. Les photons sont alors émis à une longueur d'onde très courte, inférieure à 5 picomètres (cf. figure 1.2). Cette technique permet de déceler des comportements physiologiques associés au cancer, et peut identifier des problèmes médicaux à des stades plus précoces que d'autres méthodes de diagnostic.

Dans les années 1950, des caméras gamma font leur apparition. La radiation émise par les radio-isotopes peut alors être détectée par ces caméras ; c'est le principe de la tomographie d'émission monophotonique (SPECT, de l'anglais *Single Photon Emission Computed Tomography*). Nous pouvons également citer la Tomographie par Emission de Positons (TEP) : le traceur injecté est marqué par un atome radioactif qui émet des positons dont l'annihilation produit elle-même deux photons. La détection de la trajectoire de ces photons par le collimateur de la caméra TEP permet de localiser le lieu de leur émission et donc la concentration du traceur en chaque point de l'organe. Dans le cadre de la détection de cancers, la TEP s'associe au traceur fluorodésoxyglucose proche du glucose ; les cellules tumorales présentent un hypermétabolisme glucidique et accumulent alors le marqueur. Cet examen est utilisé du diagnostic au suivi du cancer, et détecte des structures tumorales de l'ordre de 2 mm (voir exemple figure 1.4).

Imagerie par résonance magnétique L'imagerie par résonance magnétique (IRM) apparaît plus tard, dans les années 1980, et repose sur la technique de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) développée initialement pour les besoins de l'analyse chimique d'interaction d'un champ magnétique avec des protons des tissus. En mesurant le signal réémis par certains atomes (en particulier l'hydrogène) d'un volume sur lequel un fort champ magnétique a été appliqué, il est possible de déterminer la composition chimique et donc la nature des tissus biologiques en chaque point du volume. Cette technique permet d'observer les tissus mous (composés de près de 60% d'atomes d'hydrogène) avec des contrastes plus élevés qu'avec un scanner X. Contrairement à ce dernier, l'examen IRM est non-invasif (sauf s'il est couplé à l'injection d'agents de contraste), et

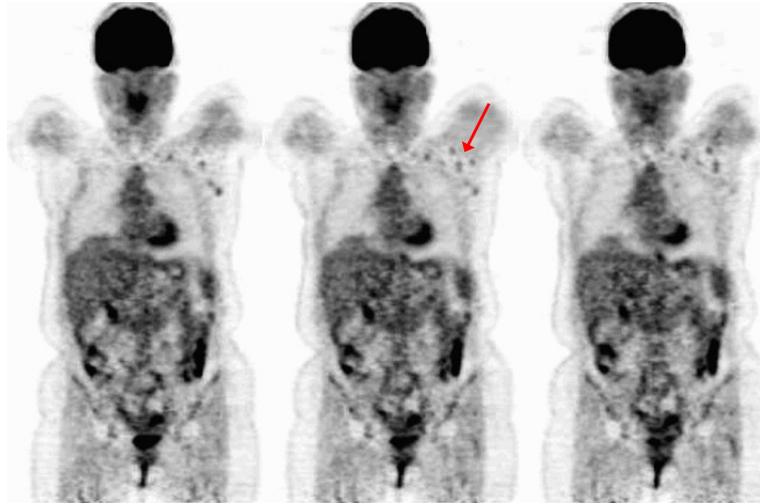


FIGURE 1.4: Localisation de métastases par TEP-18FDG en présence d'une élévation isolée d'un marqueur tumoral (tiré de [Lamy 05])

non-ionisant, et son domaine de prédilection est l'analyse du cerveau. La résolution typique obtenue par IRM en clinique est de l'ordre de $1 \times 1 \times 1$ mm pour des appareils à 1.5 ou 3 Tesla. Sur les IRM de haut-champ (7 T par exemple), la résolution atteint aujourd'hui $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ mm. Un exemple d'imagerie du cerveau sur IRM à 7 T est présenté figure 1.5.

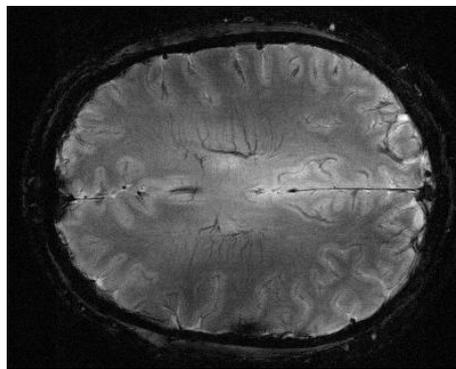


FIGURE 1.5: Image IRM du cerveau à haute résolution sur scanner IRM 7 T) (tiré de [Maclaren 10]).

En oncologie, les récents scanners IRM de haut-champ permettent l'étude de la présence et concentration de certains métabolites, et ainsi de différencier une récurrence locale d'une nécrose post-radiothérapique évitant la réalisation d'une biopsie.

Ultrasons Les années 80 voient également l'apparition des ultrasons pour les applications médicales par la technique de l'échographie. Les ultrasons sont sensibles aux propriétés mécaniques des tissus. En oncologie, cette technique permet la biopsie de zones suspectes, en particulier au niveau de la glande prostatique. Dans le cas du cancer de la prostate, un examen ultrasons est effectué lorsque le taux d'antigènes prostatiques

spécifiques (PSA pour *Prostate Specific Antigen*) est plus élevé que la normale ou que l'examen de Digital Rectal Examination (DRE) – ou toucher rectal – est anormal (voir figure 1.6).

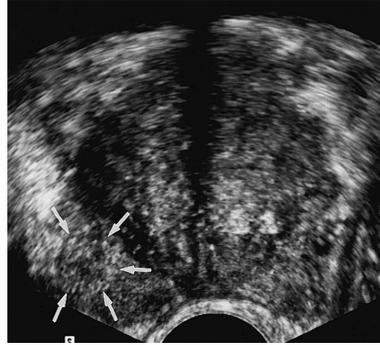


FIGURE 1.6: Image ultra-son de la prostate d'un patient de 69 ans avec un taux de PSA élevé. La biopsie révélera la présence d'une tumeur (tiré de [Halpern 01]).

Méthodes optiques Bien que les premiers résultats d'examens par méthode optique remonte au *XIX^e* siècle, avec des premiers résultats obtenus par *transillumination* (voir figure 1.7)[Cutler 31], cette technique est délaissée plusieurs années. Pas assez performante face aux nouvelles technique d'imagerie médicale (CT-scan, IRM, etc. ...), et compliquée de part la forte absorption et diffusion des photons dans les milieux explorés, elle ne referra vraiment surface que vers les années 1990. Ce retour est notamment permis grâce aux avancées dans la modélisation de la propagation de la lumière dans les tissus. Enfin, les années 2000 marquent l'utilisation de marqueurs fluorescents en imagerie optique qui améliore considérablement le contraste entre les tumeurs marquées et les tissus environnants.



FIGURE 1.7: Observation du sein par transillumination (tiré de [Cutler 31]).

Son caractère non-ionisant qui la différencie de bien des méthodes de diagnostic existantes, son faible coût de réalisation ont eu raison du manque d'intérêt dont l'imagerie optique des milieux diffusants avait souffert. L'utilisation d'une source d'excitation

adaptée dans une gamme de longueur d'onde optimale (on parlera de fenêtre thérapeutique) et dans certains cas de marqueurs fluorescents injectés au patient permet de détecter des particularités du tissu à plusieurs centimètres de profondeur. Une des méthodes les plus classiques qui découle de cette technique est sans doute la Diffuse Optical Tomography (DOT), qui propose des applications dans l'imagerie du cerveau chez le nouveau-né prématuré ou encore dans le diagnostic du cancer du sein [Leff 08] par exemple.

L'imagerie optique offre un contraste morphologique comparable à l'imagerie X, mais peut également fournir des informations sur la composition (notamment en hémoglobine ou eau) d'un tissu étudié.

Imagerie préclinique Avant la mise en place de nouveaux outils d'imagerie ou de traitements appliqués à l'homme, une phase d'étude préclinique est nécessaire, et les techniques présentées ci-dessus ont des équipements adaptés pour le petit animal. Les modèles animaux aident à comprendre la physiologie et les mécanismes impliqués dans les maladies, permettent d'évaluer de façon plus précise de nouveaux traitements, ou encore d'améliorer les appareils d'imagerie existants qui bénéficient des progrès réalisés sur les dispositifs miniaturisés. En imagerie optique par exemple, les systèmes de Fluorescence Diffuse Optical Tomography (FDOT) aident les chercheurs à quantifier l'activité cancéreuse et à évaluer l'efficacité des traitements en phase préclinique.

La figure 1.8 propose quelques acquisitions obtenues en imagerie petit animal en rayons X, rayons Gamma, ou encore en imagerie optique de fluorescence.

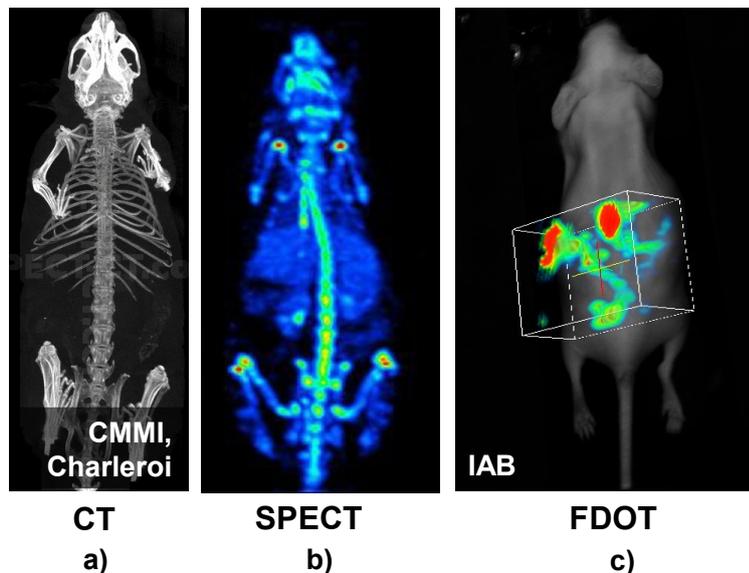


FIGURE 1.8: Exemples en imagerie préclinique sur souris : a) image CT-scan (www.spect-ct.com), b) image SPECT [Meikle 5], c) image FDOT (Institut Albert Bonniot, acquisition sur Tomofluo3D, CEA).

Bilan comparatif Le tableau suivant dresse un bref comparatif des performances des quelques méthodes d'imagerie applicables à la détection de cancer (détection en profondeur, résolution, et temps d'examen). Les performances atteintes ont été observées sur l'imagerie du petit animal [Rudin 03]; les valeurs proposées ici ne sont pas toujours atteintes en clinique (par exemple la résolution des IRM en clinique est plus proche du mm dans les trois dimensions de l'espace, ou $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ pour les IRM à haut-champ) :

Technique	Profondeur atteinte	Résolution	Temps d'examen
CT-scan	pas de limite	$5\mu m$	min
TEP	pas de limite	1 à $2mm$	min
IRM	pas de limite	10 à $100\mu m$	min/h
Ultrasons	mm-cm	$50\mu m$	min
Tomographie de fluorescence	qqs cm	1mm	min

Du côté des marqueurs injectés, dans la plupart des applications de l'imagerie optique à la chirurgie, les doses injectées de marqueurs fluorescents sont de l'ordre d'une dizaine de mg, soit 700 fois moins et environ 5600 fois moins que la dose d'agents de contraste respectivement en IRM, et pour les examens CT-scan [Gioux 10].

L'éventail de techniques d'imagerie performantes est large, et leurs utilisations sont très souvent complémentaires, voire associées en un seul instrument.

Vers la bi-modalité Les techniques brièvement décrites précédemment s'avèrent à juste titre souvent complémentaires. Au vu de cette particularité, plusieurs équipes travaillent sur le développement d'instruments bi-modalité pour le médical. Nous pourrions citer le couplage TEP-CT, dont un résultat est présenté figure 1.9 [Bar-Shalom 03, Beyer 00], ou encore la technique développée en partie (pour l'optique) au CEA qui couple imagerie X et imagerie de fluorescence (voir figure 1.10)[Koenig 10]. Enfin nous pourrions citer des essais de bi-modalité entre DOT et mammographie (imagerie X) pour l'imagerie du sein [Fang 09].

1.1.2 Imagerie optique de fluorescence dans le proche infrarouge

1.1.2.1 Généralités

Les techniques qui nous intéressent ici sont l'Imagerie Optique Diffusive de Fluorescence (FDOI pour *Fluorescence Diffuse Optical Imaging*), et plus particulièrement la Tomographie Optique Diffusive de Fluorescence (FDOT pour *Fluorescence Diffuse Optical Tomography*) pour la localisation tridimensionnelle de cibles biologiques. Cette technique connaît un essor important ces dernières années au regard du nombre de publications sur le sujet depuis les années 2000. Elle diffère de la DOT par l'utilisation de marqueurs fluorescents injectés au patient et capables de se fixer sur des cibles biologiques particulières. Les marqueurs fluorescents permettent d'augmenter le contraste parfois trop faible en DOT entre les cibles biologiques et les tissus environnants. Les

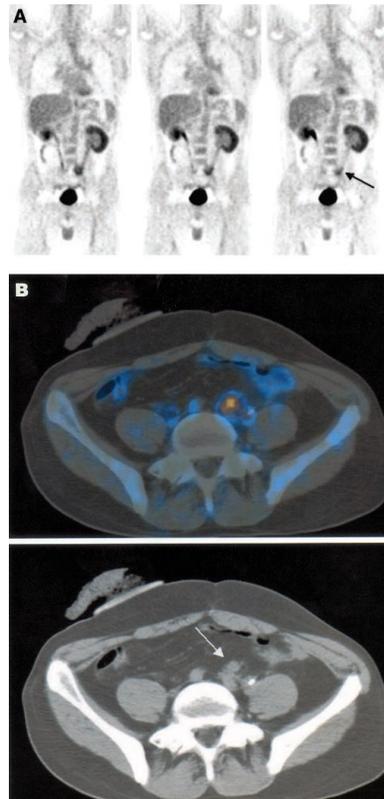


FIGURE 1.9: Couplage nécessaire pour la détection d'une récurrence d'un cancer du colon : indépendamment, les techniques CT-scan et TEP ne peuvent conclure sur la localisation de la tumeur. A) L'image TEP met en évidence une région où le marqueur ^{18}F -FDG est fortement présent (voir flèche), B) L'image couplée TEP-CT localise précisément cette zone (en jaune), C) L'image CT seule ne distingue pas la tumeur (voir flèche) sans l'analyse en parallèle de l'acquisition couplée TEP-CT (tiré de [Bar-Shalom 03]).

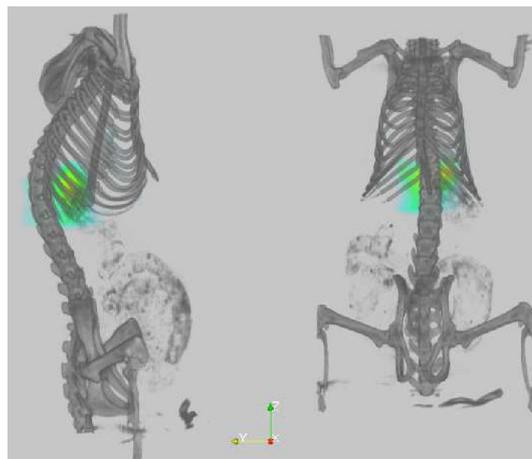


FIGURE 1.10: Expérience sur souris, avec un tube capillaire rempli de 2 pmol d'Alexa 750 introduit dans la zone des poumons : reconstruction couplée rayons X et fluorescence (tiré de [Koenig 10]).

marqueurs fluorescents une fois excités par une source extérieure à une longueur d'onde optimale, ont la particularité de ré-émettre un signal de fluorescence à une longueur d'onde en général supérieure. Une fenêtre dite thérapeutique de longueurs d'onde dans le rouge et proche infrarouge est généralement privilégiée pour l'imagerie optique de fluorescence. Cette notion sera présentée plus en détails par la suite. La FDOT s'intéresse à localiser précisément les marqueurs fluorescents à plusieurs centimètres dans les tissus, avec une résolution aujourd'hui d'environ 1 mm [Ntziachristos 04]. Un effort est porté sur la *localisation* précise des marqueurs, au delà de leur simple *détection* dans le milieu. Quand la détection se contente de cartes en 2 dimensions (2D), on parle de *topographie* ; quand la localisation des marqueurs requiert elle une reconstruction en 3 dimensions (3D), on parle alors de *tomographie*.

1.1.2.2 Diagramme de Jablonski

La fluorescence est un phénomène d'émission lumineuse intervenant lors de la désexcitation d'une molécule fluorescente excitée par un éclairage externe. Une molécule est donc qualifiée de fluorescente si elle absorbe une onde lumineuse à une longueur d'onde spécifique et qu'elle en réémet une à une longueur d'onde supérieure (décalage de Stokes [Lakowicz 99]) après un laps de temps de l'ordre de la nanoseconde (on parle du *temps de vie de fluorescence*). 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*. Le diagramme de Jablonski (cf. figure 1.11)) présente les niveaux d'énergie impliqués dans l'absorption et l'émission de lumière par une molécule fluorescente.

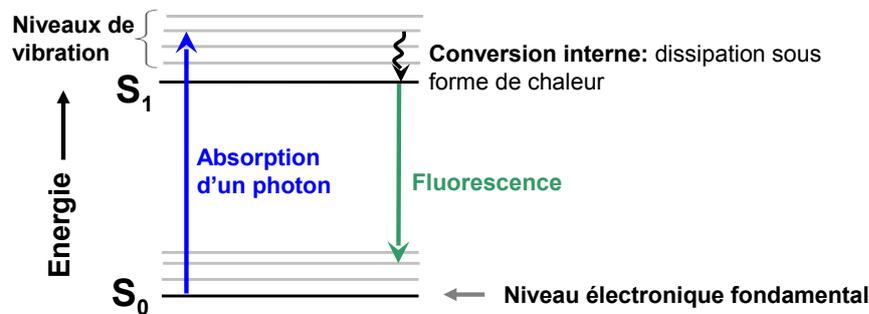


FIGURE 1.11: Diagramme de Jablonski pour la spectroscopie de fluorescence : excitation à un photon (inspiré de [Gobinet 06, Lakowicz 99]).

Spectre d'absorption et de fluorescence Un spectre est l'analyse de l'intensité lumineuse en fonction de la longueur d'onde. Dans le cadre de l'imagerie de fluorescence, nous en distinguons deux types : *le spectre d'émission de fluorescence* qui est l'intensité du rayonnement de fluorescence émis par les molécules excitées en fonction de la longueur d'onde de fluorescence et *le spectre d'absorption* ou d'excitation qui est l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

Comme schématisé sur le diagramme de Jablonski présenté précédemment, l'énergie d'émission est typiquement plus faible que l'énergie d'absorption : la fluorescence se

produit en général à des énergies plus basses et donc à des longueurs d'onde plus élevées que l'absorption. Une autre propriété fondamentale de la fluorescence est que le spectre d'émission est généralement indépendant de la longueur d'onde d'excitation. Ce résultat, observé dès 1926 par Vavilov, est plus connu sous le nom de loi de Kasha [Kasha 50].

Lors de mesures de la fluorescence d'un milieu, divers phénomènes perturbateurs peuvent interférer :

- le spectre de fluorescence parasite d'un constituant majoritaire du milieu de mesure dont les niveaux d'énergie sont très proches de la fluorescence spécifique, comme l'autofluorescence des tissus par exemple.
- la fluorescence des filtres (filtre d'excitation, ou filtre de fluorescence) et de tout autre élément du système.

Et de moindre importance :

- le spectre Raman : lorsque la fréquence de l'onde électromagnétique est très différente de toute fréquence de vibration de la molécule, il se produit un phénomène de diffusion Raman, qui fait intervenir des niveaux énergétiques virtuels. Ce phénomène est de très faible intensité et ne gêne pas l'acquisition du spectre de fluorescence.
- le matériel utilisé peut également être à l'origine de bruit de mesures parasites, tel que le courant noir. Nous détaillerons dans le second chapitre ce phénomène.

1.1.3 Marqueurs fluorescents

1.1.3.1 Marqueurs endogènes et exogènes

Les marqueurs fluorescents (encore appelés fluorophores ou agents de contrastes) sont indispensables à l'imagerie optique de fluorescence. Il est difficile de décrire tous les fluorophores tant ils sont nombreux, aussi nous proposons dans cette partie de présenter les fluorophores les plus communs intervenant en imagerie optique de fluorescence dans le rouge et proche infrarouge, leurs propriétés et applications.

Il existe deux classes de marqueurs fluorescents : *endogènes* s'ils sont engendrés par le tissu biologique lui-même, ou *exogènes* s'ils sont étrangers au tissu considéré. Parmi les fluorophores endogènes, nous pouvons citer le NADH (forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide), la flavine, ou encore la chlorophylle (cf. figure 1.12).

Les fluorophores exogènes sont eux introduits dans un milieu afin de produire de la fluorescence spécifique, lorsque aucun fluorophore endogène ne peut fournir l'information de localisation d'une cible biologique par exemple, ou encore pour modifier les propriétés spectrales du milieu. Les fluorophores exogènes comptent parmi eux la fluorescéine, la rhodamine et de nombreux autres produits. La famille de fluorophores couramment utilisée dans les gammes de longueur d'onde du rouge et du proche infrarouge est la famille des cyanines, dans laquelle figure notamment l'Indocyanine Green (ICG), candidat approprié pour l'imagerie optique de fluorescence puisque cet agent de contraste hydrosoluble bénéficie d'ores et déjà d'une autorisation d'injection de la *Food and Drug Administration (FDA)* ; il s'utilise notamment pour divers examens

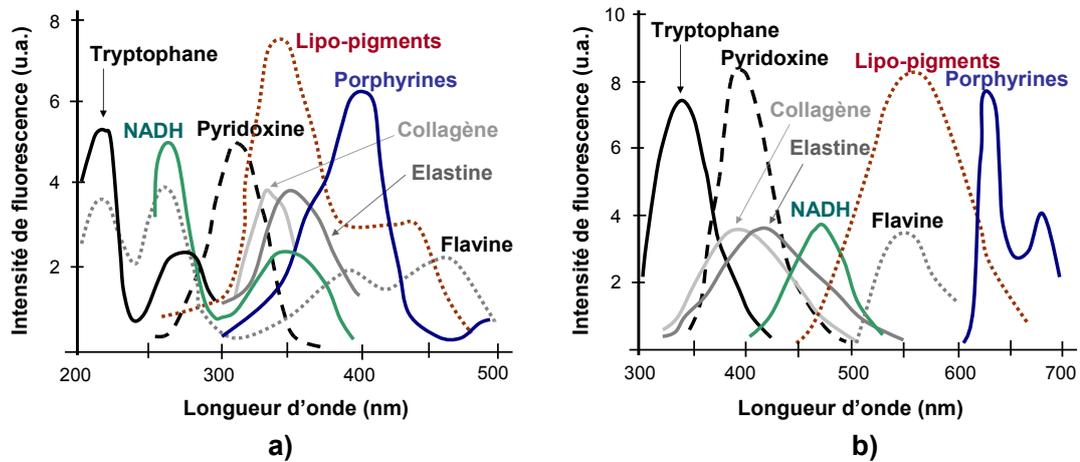


FIGURE 1.12: a) Spectres d'absorption, b) spectres d'émission des principaux fluorophores endogènes des tissus biologiques (d'après [Wagnières 98]).

médicaux chez l'homme, comme les angiographies, ou l'imagerie vasculaire du cerveau, les premiers tests remontant déjà à plus de vingt ans [Frangioni 03].

1.1.3.2 Spécificité et stabilité des marqueurs exogènes

Fréquemment, les molécules d'intérêt (par exemple présentes au sein de tumeurs) ne sont pas fluorescentes, ou leur fluorescence intrinsèque n'est pas adaptée au système d'imagerie utilisé. Dans ce cas, des marqueurs fluorescents sont injectés dans le but de pointer les molécules d'intérêt. Le nombre de fluorophores pouvant être utilisés pour cibler les molécules est considérable ; un grand nombre est répertorié dans le catalogue Molecular Probes [Haugland 96].

Les fluorophores exogènes peuvent être associés à des ligands spécifiques afin que l'ensemble *ligand-fluorophore* (ou encore *marqueur*) aille se fixer à une cible conjuguée du ligand. Les fluorophores peuvent également être associés à des vecteurs non spécifiques (nous parlons alors habituellement de **traceur** pour l'ensemble *vecteur-fluorophore*, mais le terme marqueur pourra être utilisé par abus de langage par la suite). Les dits traceurs n'ont pas la spécificité des marqueurs, mais ont tout de même tendance à s'accumuler autour des tumeurs qui demandent un apport en hémoglobine plus important pour croître.

Enfin, même pour les marqueurs dits *spécifiques*, capables de cibler la tumeur, les marqueurs et traceurs classiques souffrent toujours de non-spécificité (marqueur fluorescent injecté non fixé sur sa cible biologique).

Ratio tumeur/tissu sain Afin de juger la spécificité des marqueurs fluorescents, les biologistes et chimistes utilisent souvent la notion de ratio, que nous pouvons simplement définir comme suit : le ratio $r_{T,N}$ entre une zone tumorale T et une zone saine N est égal à $\frac{\bar{T}}{\bar{N}}$ (\bar{T} et \bar{N} sont généralement les intensités moyennes en photons par pixel des zones T et N sur l'image détectée). La fluorescence mesurée sur la zone saine provient

de l'auto fluorescence naturelle des tissus, mais également de la fluorescence dite non spécifique du marqueur qui ne s'est pas fixé à sa cible.

La spécificité et les performances des marqueurs pourront être déduites de la valeur du ratio $r_{T,N}$. Dans la bibliographie sur les marqueurs pour l'imagerie optique de fluorescence, nous trouvons des ratios tumeur/tissu sain en géométrie de réflexion variant globalement entre 3 (pour les traceurs non spécifiques) et 15 [Jin 07] (pour les marqueurs plus spécifiques, voir figure 1.13).

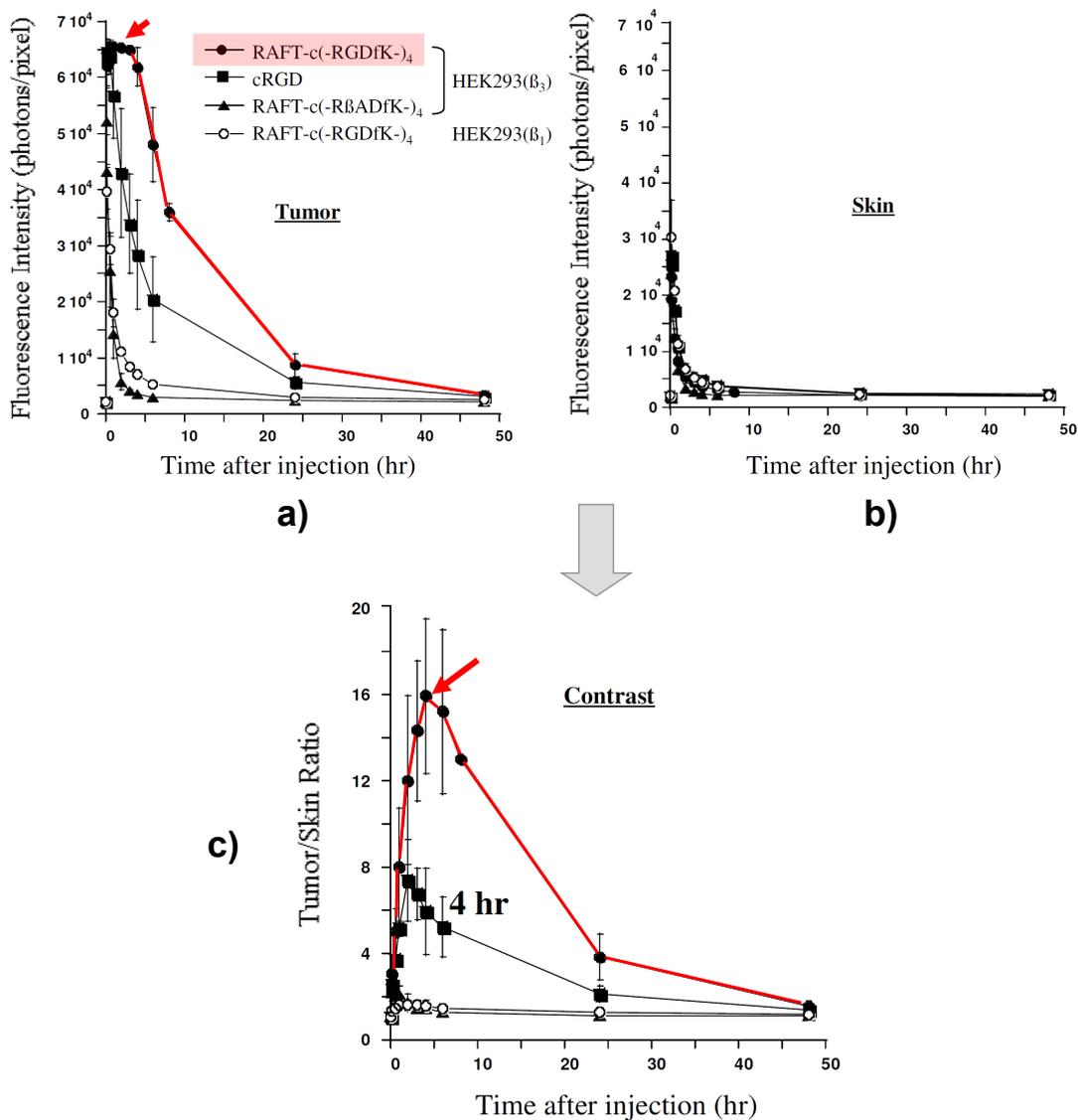


FIGURE 1.13: *Intensité de fluorescence dans les tumeurs et les tissus sains, ainsi que les ratios tumeur/tissus sain après injection de 10 nmol Cy5-labeled RAFT-c(-RGDFK)₄ (en rouge) (tiré de [Jin 07]).*

La spécificité est un premier critère important dans le choix des marqueurs en imagerie optique de fluorescence ; leur résistance et la sauvegarde de leur propriétés fluorescentes sous illumination constante est toute aussi importante. Quasiment tous les

fluorophores souffrent de photoblanchiment (ou photobleaching en anglais) sous illumination constante, c'est-à-dire de destruction photochimique du fluorophore. La photostabilité peut dépendre de l'environnement d'accueil du fluorophore : par exemple, la photo-stabilité peut parfois être améliorée dans un milieu pauvre en oxygène, tandis que dans certains milieux la présence d'oxygène n'aura aucun effet [Lakowicz 99]. En pratique nous nous intéresserons à la photo-stabilité des marqueurs que nous utiliserons en expérimentation, et la testerons sous illumination constante.

De part la mise au point de marqueurs résistants face au phénomène de photoblanchiment, un effort important est apporté pour mettre au point des marqueurs fluorescents au ciblage biologique performant en améliorant la brillance des marqueurs, ou encore en développant de nouveaux marqueurs dits activables.

1.1.3.3 Marqueurs activables

Comme expliqué dans la partie précédente, le contraste qu'offre la plupart des marqueurs fluorescents s'avère souvent médiocre, et souffre du problème de non-spécificité. En effet, une large partie des marqueurs ne se fixe pas à la cible biologique, mais reste en circulation dans le réseau sanguin, ou diffuse dans divers organes. Différentes solutions au problème de non-spécificité ont été proposées depuis 1999, notamment avec le travail de Weissleder *et al.* [Weissleder 99]. Ils ont mis au point des marqueurs dont la base est constituée de chaînes peptidiques : la fluorescence des marqueurs n'est alors activée qu'une fois la chaîne peptidique coupée. En imagerie du petit animal, la présence d'une activité enzymatique dite protéolytique (soit avec coupure de peptides) dans certaines zones du sujet a permis d'activer ces marqueurs de façon beaucoup plus spécifique, et d'atteindre des ratios tumeur/tissu sain égaux à 36.

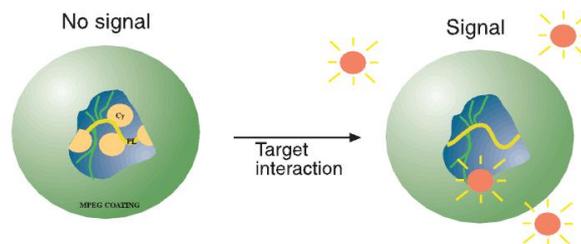


FIGURE 1.14: Activation des marqueurs après coupure de peptides. La proximité initiale (à gauche) des molécules fluorescentes les unes par rapport aux autres résulte dans l'extinction du signal fluorescent. À droite, après coupure des chaînes peptidiques, le signal fluorescent est activé (tiré de [Weissleder 99]).

En 2006, Razkin *et al.* proposent des marqueurs activables construits sur une base appelée Regioselectively Addressable Functionalized Template (RAFT)[Razkin 06]. A cette base s'ajoute notamment un inhibiteur de fluorescence (du QSY21) relié au fluorophore choisi par un pont disulfure S-S clivable. Une fois le marqueur dans les cellules tumorales, le pont est clivé, et la fluorescence du marqueur est alors activée. Ce nouveau marqueur offre des ratios tumeur/tissu sain 2 à 3 fois supérieurs au ratio obtenu habituellement avec un même type de marqueur non activable, pouvant alors atteindre

des valeurs proches de 24. Enfin, l'équipe d'Urano (affilié à la Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo) a proposé en 2009 [Urano 08] des marqueurs activés dans un milieu où le pH est acide ; ils ont ainsi activé des marqueurs dans un lysosome (pH entre 5 et 6), distinct des autres organites cellulaires par son pH plus faible (le pH du cytoplasme des autres organites cellulaires est plutôt proche de 7.4) comme schématisé figure 1.15.

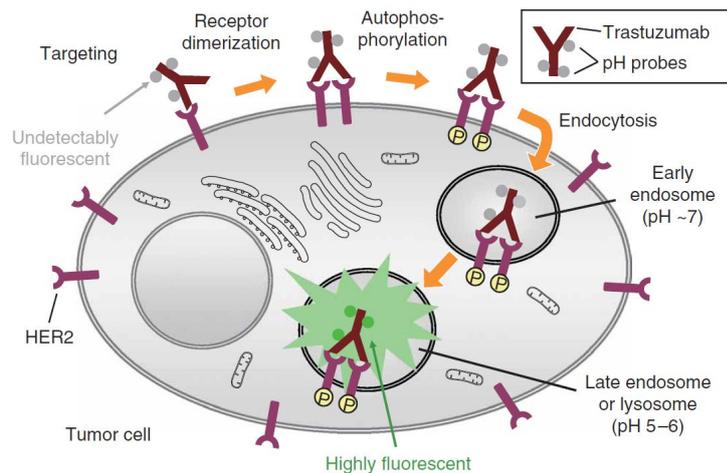


FIGURE 1.15: Schéma représentatif de marquage de tumeur très sélectif à l'aide d'un marqueur fluorescent activable. Le marqueur n'est pas fluorescent en dehors des cellules tumorales : il le devient après accumulation dans les lysosomes et endosomes, où le pH acide l'active. Le marqueur émet alors un fort signal de fluorescence (tiré de [Urano 08]).

Leurs marqueurs offrent (dans le visible et *in vitro*) des ratios atteignant 180. De tels résultats n'ont pas encore été obtenus dans le proche infrarouge ou *in vivo* mais offrent la possibilité de nouvelles générations de marqueurs activables dont les ratios amélioreraient considérablement la détection et localisation des marqueurs en profondeur (plusieurs centimètres).

Le but de la tomographie de fluorescence est de reconstruire la distribution de fluorescence (endogène ou exogène) du volume étudié ; cette technique repose sur un modèle direct qui décrit l'interaction de la lumière avec le milieu. Afin de situer le contexte de la FDOT, nous décrivons dans les paragraphes suivants les principes d'interactions de la lumière avec les tissus biologiques.

1.2 Interaction de la lumière avec les tissus biologiques

L'interaction de la lumière avec les tissus est principalement gouvernée par les phénomènes d'absorption, de diffusion et d'émission de fluorescence des photons. Nous proposons dans cette partie de revenir en détail sur ces trois processus fondamentaux.

1.2.1 Absorption et fenêtre thérapeutique

Absorption des tissus Dès 1729, Bouguer proposait une relation entre l'absorption de la lumière dans un milieu non diffusant et l'épaisseur de ce milieu. Quelques années plus tard, Lambert propose une expression mathématique pour traduire cette relation, plus connue sous le nom de la loi Lambert-Bouguer :

$$\frac{dI}{I} = \mu_a dl \quad (1.1)$$

Cette loi décrit l'absorption de la même fraction dI/I de l'intensité I d'un faisceau collimaté par chaque couche dl successive du milieu, pour une valeur constante de μ_a .

Le coefficient μ_a est plus connu comme le coefficient d'absorption (généralement en cm^{-1}), et dépend de la longueur d'onde λ du faisceau considéré. Ainsi, pour une intensité incidente I_0 , l'intensité I transmise à travers une épaisseur z du milieu (cf. figure 1.16) s'exprime comme :

$$I = I_0 \cdot e^{-\mu_a(\lambda)z} \quad (1.2)$$

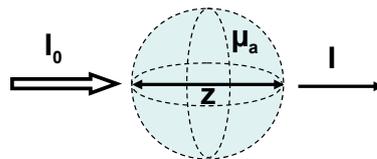


FIGURE 1.16: *Absorption : atténuation de la lumière à travers un milieu non diffusant.*

Le coefficient d'absorption peut donc être décrit comme la probabilité d'absorption d'un photon par le milieu par unité de longueur.

Fenêtre thérapeutique Diverses structures présentes dans les tissus, des plus petites molécules (sucres, eau, ions, nucléotides) à de plus importantes structures (organites, membranes cellulaires) en passant par des macro-molécules (protéines, ADN, ARN) absorbent la lumière, de l'ultra-violet au visible. L'absorption conséquente dans ces longueurs d'onde limite la pénétration de la lumière dans les tissus à seulement quelques centaines de microns.

Afin d'étudier des structures de quelques centimètres, une gamme de longueurs d'onde nommée "fenêtre thérapeutique" comprise entre 600 nm et 900 nm est privilégiée en imagerie optique de fluorescence. Dans cette plage de longueurs d'onde, les absorbeurs principaux sont l'hémoglobine (sous ses deux formes, oxygénée HbO_2 et désoxygénée Hb), l'eau et la graisse. Une courbe d'absorption de l'eau, de l'hémoglobine sous ses deux formes et de la graisse est représentée figure 1.17 : le choix de la gamme de longueurs d'onde 600 – 900 nm se justifie par une absorption minimale à ces longueurs d'onde.

En effet, dans la gamme spectrale de la fenêtre thérapeutique, l'absorption des tissus est parfois 10 fois moins importante que dans les longueurs d'onde du visible, entre 400 et 600 nm [Leblond 10]. Utiliser des sources de lumière dans le proche infrarouge où

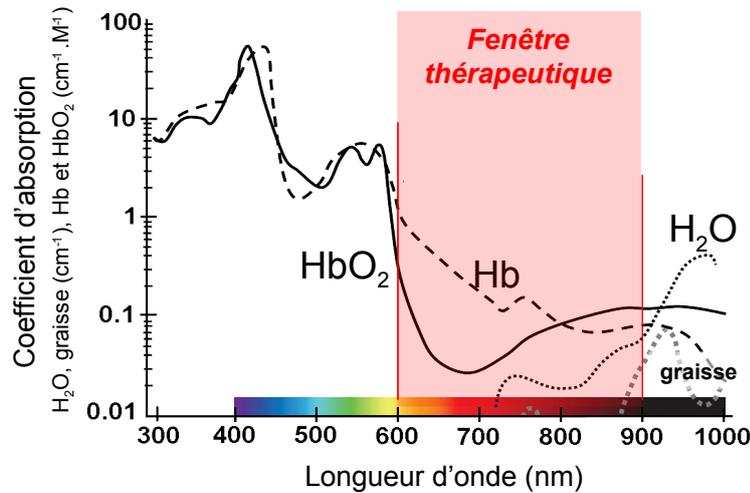


FIGURE 1.17: Spectres d'absorption de l'eau H_2O et de l'hémoglobine (oxygénée HbO_2 et désoxygénée Hb) : définition de la fenêtre thérapeutique entre 600 et 900 nm environ (adapté de <http://omlc.ogi.edu/spectra/fat>).

l'absorption des tissus est minimale permet alors de mesurer des signaux de fluorescence à travers plusieurs centimètres de tissus.

1.2.2 Diffusion

Le second paramètre qui décrit un milieu est son coefficient de diffusion. La diffusion se manifeste par le changement de direction de l'onde incidente au niveau du milieu diffusant : à l'échelle microscopique, l'onde incidente est déviée à de multiples reprises, après interaction avec des particules d'indices de réfraction différents de celui du milieu qui les héberge (notamment lors de la traversée des membranes cellulaires).

De manière analogue à l'absorption, le coefficient de diffusion μ_s , en cm^{-1} , permet d'exprimer dans un milieu homogène d'épaisseur z et non absorbant la partie lumineuse I non diffusée à la sortie du milieu, en fonction de l'intensité incidente I_0 [Mobley 03](cf. figure 1.18) comme :

$$I = I_0 \cdot e^{[-\mu_s(\lambda)z]} \quad (1.3)$$

Le coefficient de diffusion dépend également de la longueur d'onde λ .

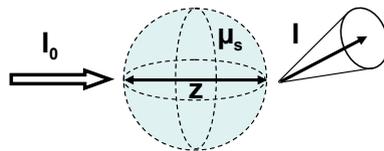


FIGURE 1.18: Illustration d'un événement diffusif.

Anisotropie Lorsque nous décrivons les propriétés de diffusion des tissus biologiques, nous utilisons généralement le coefficient de diffusion dit réduit, μ'_s . Afin de l'exprimer,

il faut en premier lieu définir la notion d'anisotropie d'un milieu diffusant. Considérons qu'un photon d'incidence s rencontre un diffuseur, et se trouve diffusé selon la direction \hat{s} , variant d'un angle θ par rapport à sa direction initiale s , comme décrit sur le schéma 1.19. La composante de cette nouvelle trajectoire projetée sur la direction initiale (en rouge sur le schéma) est égale à $\cos(\theta)$: la valeur moyenne de $\cos(\theta)$ (aussi égale au produit scalaire $s \cdot \hat{s}$) est définie comme l'**anisotropie** g . Enfin nous définissons f , dite fonction de phase, qui traduit la densité de probabilité qu'un photon de direction d'incidence s soit diffusé selon la direction \hat{s} .

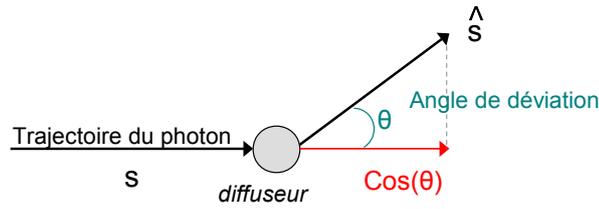


FIGURE 1.19: Illustration de l'anisotropie : la rencontre avec un diffuseur dévie la trajectoire initiale s du photon d'un angle θ : la valeur moyenne de $\cos(\theta)$ est définie comme l'**anisotropie**.

Ainsi g peut s'écrire comme suit :

$$g = \int_{-1}^1 f(\cos(\theta)) \cos(\theta) d(\cos(\theta)) = \langle \cos(\theta) \rangle \quad (1.4)$$

L'anisotropie g varie entre -1 lorsque la direction de diffusion est entièrement vers l'arrière, et 1 pour une diffusion uniquement vers l'avant. Lorsque g est nul, la diffusion est isotrope. Dans les tissus biologiques, g varie essentiellement entre 0.7 et 0.99 [Cheong 90, Marchesini 89]. En simulation, une valeur moyenne de 0.9 est généralement choisie.

Nous définissons maintenant le *coefficient de diffusion réduit* μ'_s , qui prend en compte l'anisotropie de diffusion :

$$\mu'_s = (1 - g) \cdot \mu_s \quad (1.5)$$

Cette grandeur est notamment utilisée dans la définition de l'approximation de diffusion présentée ultérieurement, et peut être interprétée comme le coefficient de diffusion équivalent dans un milieu où la diffusion serait parfaitement **isotrope**.

L'analyse de l'absorption et de la diffusion permettent de mieux cerner les propriétés optiques des tissus biologiques, bien qu'il soit très difficile d'en mesurer précisément les propriétés macroscopiques, en particulier dans des conditions *in vivo*. Quelques valeurs de coefficients d'absorption et de diffusion mesurées *in vivo* pour différents organes ont été répertoriés dans plusieurs publications [Cheong 90, Mobley 03]. Le tableau 1.1 propose quelques exemples de valeurs de coefficients d'absorption μ_a et de diffusion réduits μ'_s de différents tissus biologiques.

tissu	$\lambda(nm)$	$\mu_a(cm^{-1})$	$\mu'_s(cm^{-1})$
peau	750-800	0.25-2.5	8-150
sein	753	0.046	8.9
poumon	635	8.1	81
muscle	900	0.32	5.9
prostate	850	0.6	14
cerveau	800-1100	0.2-1	10-40

TABLE 1.1: Quelques coefficients d'absorption (μ_a) et de diffusion réduit (μ'_s) de différents tissus humains mesurés in vivo (tiré de [Mobley 03, Tuchin 07]).

1.3 Modélisation de la propagation de la lumière dans les tissus

Après avoir présenté les principes physiques fondamentaux de l'imagerie optique, nous présentons ici les modèles mathématiques utilisés pour décrire la propagation de la lumière dans les tissus biologiques. Ce modèle de propagation nous sera utile pour reconstruire en 3D la position des marqueurs fluorescents.

1.3.1 Luminance

Considérons un milieu diffusant, et intéressons nous à l'énergie moyenne des ondes lumineuses dans ce milieu. Le flux de lumière à travers le milieu est décrit par la théorie de transfert radiatif, comparable à la théorie de propagation d'onde électrique ou magnétique. Ici, la quantité qui remplace le champ électromagnétique dans le modèle de transfert radiatif, est la *luminance* $L(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t)$ définie par la relation suivante [Mobley 03] :

$$dP = L(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t) \cos\theta dA d\Omega \quad (1.6)$$

où dP est la puissance lumineuse à l'instant t et au point \mathbf{r} dirigée dans un cône de l'angle solide $d\Omega$, orienté selon la direction du vecteur unitaire $\hat{\mathbf{s}}$, à partir de la surface élémentaire dA normale à $\hat{\mathbf{s}}$ (cf. figure 1.20). Ainsi, la luminance $L(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t)$ est la puissance lumineuse par unité de surface, par unité d'angle solide, et s'exprime donc en $W.cm^{-2}.sr^{-1}$. Enfin, comme l'énergie dans un champ de lumière monochromatique est proportionnelle au nombre de photons que le champ contient, la luminance est représentative du nombre de photons par seconde franchissant le point \mathbf{r} dans le cône de l'angle solide [Mobley 03].

1.3.2 Équation de transfert radiatif

La propagation de la lumière en milieu diffusant est décrite par l'équation de transfert radiatif (ETR), également connue sous le nom d'équation de transport de Boltzman. Considérons un paquet d'énergie lumineuse élémentaire, défini par sa position $\mathbf{r}(t)$ et

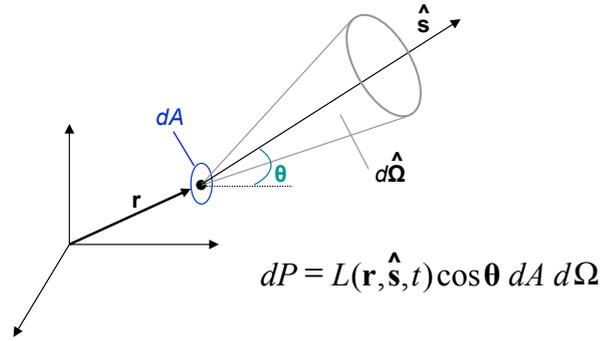


FIGURE 1.20: La puissance lumineuse qui passe à travers la surface élémentaire de normale au vecteur unitaire $\hat{\mathbf{s}}$, à l'intérieur d'un cône de l'angle solide $d\Omega$, de direction l'angle θ , est proportionnelle à la luminance $L(r, \hat{\mathbf{s}}, t)$ (d'après [Mobley 03]).

sa direction de propagation \mathbf{s} (voir figure 1.21). En un intervalle de temps dt , le paquet perd de l'énergie en se propageant dans l'espace, à cause de l'absorption et de la diffusion du milieu en dehors de \mathbf{s} . Mais il acquiert également de l'énergie émanant de la lumière diffuse dans la direction \mathbf{s}' en $\mathbf{r}(t)$, provenant d'autres directions \mathbf{s}' et de n'importe quelle source de lumière locale du milieu, comme schématisé sur la figure 1.21.

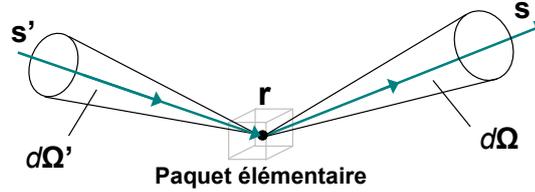


FIGURE 1.21: Bilan énergétique dans un paquet élémentaire en $\mathbf{r}(t)$: le paquet perd de l'énergie (absorption et diffusion du milieu en dehors de \mathbf{s}) et en acquiert (lumière dans la direction \mathbf{s}' provenant d'autres directions \mathbf{s}' et de n'importe quelle source de lumière du milieu). Le bilan énergétique permet d'établir l'ETR.

Ces échanges sont décrits par la relation de transfert radiatif suivante :

$$\begin{aligned}
 \underbrace{\frac{1}{c} \frac{\partial L(\mathbf{r}, \mathbf{s}, t)}{\partial t}}_{\text{Variations temporelles de la luminance}} &= \underbrace{-\mathbf{s} \nabla L(\mathbf{r}, \mathbf{s}, t)}_{\text{Variations spatiales}} + \underbrace{(\mu_a(\mathbf{r}) + \mu_s(\mathbf{r})) L(\mathbf{r}, \mathbf{s}, t)}_{\text{Pertes dues à l'absorption et la diffusion}} \\
 + \underbrace{\frac{\mu_a(\mathbf{r}) + \mu_s(\mathbf{r})}{4\pi} \int_{4\pi} f(\mathbf{s} \cdot \mathbf{s}') L(\mathbf{r}, \mathbf{s}', t) d\Omega'}_{\text{Gain dû à la diffusion provenant d'autres directions, dans le cône } \mathbf{s}} &+ \underbrace{Q(\mathbf{r}, \mathbf{s}, t)}_{\text{Gain provenant d'autres sources, en } \mathbf{r}}
 \end{aligned} \tag{1.7}$$

Où :

- $L(\mathbf{r}, \mathbf{s}, t)$ est la luminance selon la direction \mathbf{s} ;
- c est la vitesse de propagation de la lumière dans le milieu ;
- $\mu_a(\mathbf{r})$ et $\mu_s(\mathbf{r})$ sont respectivement les coefficients d'absorption et de diffusion du milieu en \mathbf{r} ;

- $f(\mathbf{s}\cdot\mathbf{s}')$ est la **fonction de phase** : elle décrit la fraction d'énergie lumineuse provenant de la direction \mathbf{s}' incidente sur un diffuseur, et qui est ensuite diffusée selon la direction \mathbf{s}
- $Q(\mathbf{r},\mathbf{s},t)$ est le terme de source, exprimé en $W.m^{-3}.sr^{-1}$.

Résolution de l'équation de transfert radiatif Pour des géométries bien définies, l'ETR peut être résolue de façon analytique. Pour des cas plus généraux, des méthodes numériques sont adoptées. Nous présentons dans la partie suivante un modèle largement utilisé, régi par l'équation de la diffusion, et qui sera utilisé par la suite pour l'étape de reconstruction.

1.3.3 Approximation de la diffusion

Différentes méthodes et approximations permettent de résoudre de façon numérique l'ETR présentée dans le paragraphe précédent. Les approximations que nous présentons brièvement dans ce paragraphe mènent à la définition d'une équation simplifiée appelée **approximation de la diffusion**. Le problème de la résolution de l'ETR a été largement étudié, et il existe d'ores et déjà des références détaillées reprenant le passage de l'équation de transfert radiatif à l'approximation de la diffusion : nous citerons par exemple le travail d'Arridge [Arridge 99].

Approximation P_N Cette première approximation décompose les fonctions f , L et Q (grandeurs qui dépendent des angles) de l'ETR en harmoniques sphériques ou en polynômes de Legendre, à un ordre fini N . Les calculs sont détaillés dans l'article de référence d'Arridge [Arridge 99]. Notamment sous cette première approximation, la fonction de phase f ne dépend plus que de l'angle de diffusion θ avec $\cos(\theta) = s\cdot s'$. Les décompositions en harmoniques obtenues sont les suivantes (cf. [Arridge 99], paragraphe 3.1) :

$$f(\hat{s},\hat{s}') = \sum_{l=0}^N \sum_{m=-l}^l g_l Y_{l,m}^*(\hat{s}') Y_{l,m}(\hat{s}) \quad (1.8)$$

$$L(\mathbf{r},\mathbf{s},t) = \sum_{l=0}^N \sum_{m=-l}^l \sqrt{\frac{2l+1}{4\pi}} L_{l,m}(\mathbf{r},t) Y_{l,m}(\hat{s}) \quad (1.9)$$

$$Q(\mathbf{r},\mathbf{s},t) = \sum_{l=0}^N \sum_{m=-l}^l \sqrt{\frac{2l+1}{4\pi}} S_{l,m}(\mathbf{r},t) Y_{l,m}(\hat{s}) \quad (1.10)$$

avec l l'ordre des polynômes de Legendre, et $Y_{l,m}$ les harmoniques sphériques. g_l , $L_{l,m}$ et $S_{l,m}$ sont les coefficients des décompositions.

Approximation P_1 L'équation est encore simplifiée, en développant les fonctions L à l'ordre 1. La luminance L s'écrit alors :

$$L(\mathbf{r},\mathbf{s},t) = \frac{1}{4\pi} \Phi(\mathbf{r},t) + \frac{3}{4\pi} \mathbf{J}(\mathbf{r},t) \cdot \hat{s} \quad (1.11)$$

avec Φ ($W.cm^{-2}$) la densité de photons diffusés :

$$\Phi(\mathbf{r}, t) = \int_{4\pi} L(\mathbf{r}, \mathbf{s}, t) d(\Omega) \quad (1.12)$$

et \mathbf{J} ($W.m^{-2}$) le flux de photons diffusés :

$$\mathbf{J}(\mathbf{r}, t) = \int_{4\pi} L(\mathbf{r}, \mathbf{s}, t) \hat{\mathbf{s}} d(\Omega) \quad (1.13)$$

Approximation de la diffusion Pour finir, deux nouvelles hypothèses sont considérées pour aboutir à l'approximation finale de la diffusion.

1. La source est supposée isotrope, donc tous les termes non-isotropes sont ignorés.
2. Nous supposons également que le flux de photons varie lentement, d'où :

$$\frac{\partial \mathbf{J}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = 0 \quad (1.14)$$

En prenant en compte ces deux hypothèses, nous pouvons écrire le flux sous la forme suivante :

$$\mathbf{J}(\mathbf{r}, t) = -D \nabla \Phi(\mathbf{r}, t) \quad (1.15)$$

Nous obtenons finalement l'approximation de la diffusion suivante :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial \Phi(\mathbf{r}, t)}{\partial t} - \nabla(D(\mathbf{r}) \nabla \Phi(\mathbf{r}, t)) + \mu_a \Phi(\mathbf{r}, t) = Q(\mathbf{r}, t) \quad (1.16)$$

où :

- $Q(\mathbf{r}, t)$ est un terme de source isotrope ;
- et D est le terme de diffusion, défini par [Patterson 89] :

$$D = \frac{1}{3(\mu_a + \mu'_s)}. \quad (1.17)$$

C'est cette approximation qui sera utilisée par la suite dans nos travaux.

Résolution Des solutions analytiques de l'approximation de diffusion existent pour des géométries particulières simples, comme le milieu infini, ou encore semi-infini [Patterson 89]. La résolution en milieu homogène infini est la plus simple : en notant r la distance des marqueurs à la source, le flux de photons solution de l'équation de diffusion 1.16 en milieu infini est de la forme suivante [Chandrasekhar 43] :

$$\Phi(\mathbf{r}, t) = \frac{c}{(4\pi Dct)^{3/2}} \exp\left(-\frac{r^2}{4Dct} - \mu_a ct\right) \quad (1.18)$$

Pour éviter la résolution analytique de l'équation de diffusion, diverses méthodes numériques telles la méthode des différences finies, des éléments finis ou encore des volumes finis existent. Ces méthodes sont adaptées à toutes géométries et admettent que le milieu possède des inhomogénéités. Par la suite, pour obtenir des reconstructions de la distribution de marqueurs, nous utiliserons la méthode des volumes finis pour résoudre l'équation de diffusion. Cette technique sera alors détaillée en même temps que l'algorithme de reconstruction, dans le dernier chapitre de cette thèse.

1.4 Détection et localisation de cibles fluorescentes dans les tissus biologiques

1.4.1 Exemples : les cancers du sein et de la prostate

Les types de cellules cancéreuses sont nombreux et nécessitent une analyse particulière poussée. Dans la partie suivante nous nous intéressons aux cas du cancer du sein et de la prostate comme exemple d'application de l'imagerie optique de fluorescence, en gardant un œil d'opticien et de physicien sur ces sujets : nous nous intéressons à déterminer la quantité de tumeurs à détecter, les profondeurs extrêmes amenées à être explorées ou encore la taille des nodules. Les cancers du sein et de la prostate sont parmi les types de cancer les plus fréquents respectivement chez la femme et l'homme. Aux Etats-Unis en 2009, 15% des décès de cancer chez les femmes étaient liés au cancer du sein, tandis que chez les hommes, 9% des cas de mortalité d'un cancer étaient associés au cancer de la prostate (voir figure 1.22) [Jemal 09]. Face à ces statistiques, la détection de ces cancers est devenue un axe de recherche privilégié, auquel l'imagerie optique s'intéresse.

Mortalité

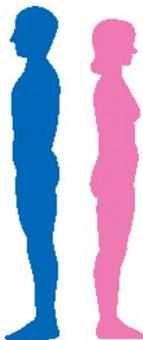
		Hommes		Femmes	
Lung & bronchus	88,900	30%		Lung & bronchus	70,490 26%
Prostate	27,360	9%		Breast	40,170 15%
Colon & rectum	25,240	9%		Colon & rectum	24,680 9%
Pancreas	18,030	6%		Pancreas	17,210 6%
Leukemia	12,590	4%		Ovary	14,600 5%
Liver & intrahepatic bile duct	12,090	4%		Non-Hodgkin lymphoma	9,670 4%
Esophagus	11,490	4%		Leukemia	9,280 3%
Urinary bladder	10,180	3%		Uterine Corpus	7,780 3%
Non-Hodgkin lymphoma	9,830	3%		Liver & intrahepatic bile duct	6,070 2%
Kidney & renal pelvis	8,160	3%		Brain & other nervous system	5,590 2%
All Sites	292,540	100%	All Sites	269,800	100%

FIGURE 1.22: Dix cancers principaux dans l'estimation du taux de mortalité de cette maladie aux Etats Unis en 2009 (tiré de [Jemal 09]).

La plupart des résultats que nous présentons dans le paragraphe suivant sont tirés des entretiens avec un oncologue du CHU de Besançon (Dr P. Montcuquet).

1.4.1.1 Cancer du sein

Anatomie Le sein présente une structure relativement homogène, principalement composé de graisse, et des glandes (dont la taille diminue après ménopause) comme présenté figure 1.23.

Dépistage par rayons X Aujourd'hui la technique d'imagerie privilégiée pour le diagnostic du cancer du sein reste l'imagerie X avec la mammographie. Les rayons X

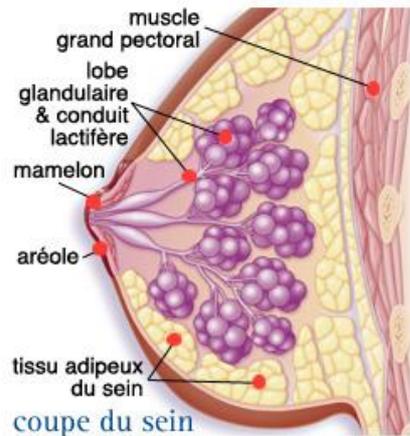


FIGURE 1.23: Anatomie du sein (tiré de www.arcagy.org/infocancer).

distinguent les calcifications dans le sein qui peuvent être interprétées comme signe indirect de cancer, ou des opacités plus denses correspondant au cancer lui-même. Ces dernières années, il n'est pas rare que la mammographie soit couplée à un examen IRM surtout chez les femmes jeunes, en raison de la forte densité glandulaire du sein.

Caractéristiques des tumeurs Après chirurgie, les tumeurs retirées peuvent présenter des tailles variables, environ de **2 – 3 mm** jusqu'à parfois 7 à 8 cm pour un cancer invasif. Nous distinguerons ici deux types principaux de cancer du sein, canalaire ou lobulaire [Guinebretière 06] suivant la zone où le cancer se développe. La seconde classe dite lobulaire nécessite souvent l'utilisation d'un examen IRM : ce type de cancer est souvent multi-focal, c'est-à-dire qu'il présente divers nodules cancéreux. Dans ce type de cas, **7 – 8 sites tumoraux** distincts peuvent être développés dans un même sein, et des localisations dans le sein controlatéral sont possibles.

La mammographie aplatit le sein pour obtenir une épaisseur d'organe minimale et détecter par rayons X les grosseurs suspectes. Outre le côté invasif des rayons X, cet examen peut être douloureux pour la patiente : de nouvelles techniques d'imagerie optique (non ionisantes) DOT ou FDOT s'intéresse à diagnostiquer le cancer du sein sans passer par la mammographie. L'homogénéité de cet organe, et son absorption modérée (environ 0.4 cm^{-1}) font de lui un candidat privilégié pour l'imagerie optique. La profondeur des tumeurs par rapport à la surface du sein est encore une fois très variable d'un cas à un autre et nous ne pouvons ici que proposer une estimation de la profondeur de tissus à explorer. En imaginant une détection par sonde optique pouvant se déplacer autour de l'organe, pour les seins les plus opulents et dans le cas de tumeurs proches de la cage thoracique (donc éloignées de la surface du sein), les profondeurs à traverser pourraient atteindre environ **10 cm**.

Pour résumer, l'application de méthodes optiques à la détection du cancer du sein requiert le développement de techniques d'imagerie capables de détecter des signaux jusqu'à **10 cm de profondeur**, avec une **résolution proche du millimètre**, et de localiser jusqu'à **une dizaine** de tumeurs distinctes.

1.4.1.2 Cancer de la prostate

Une étude similaire peut être effectuée pour le cancer de la prostate, bien que l'étude des nodules cancéreux est plus délicate.

Anatomie L'anatomie de la prostate est proposée sur le schéma 1.24. Près de dix fois plus absorbante que le sein, la prostate est cependant de plus petite taille (environ 3 cm de haut, et 2.5 cm de profondeur).

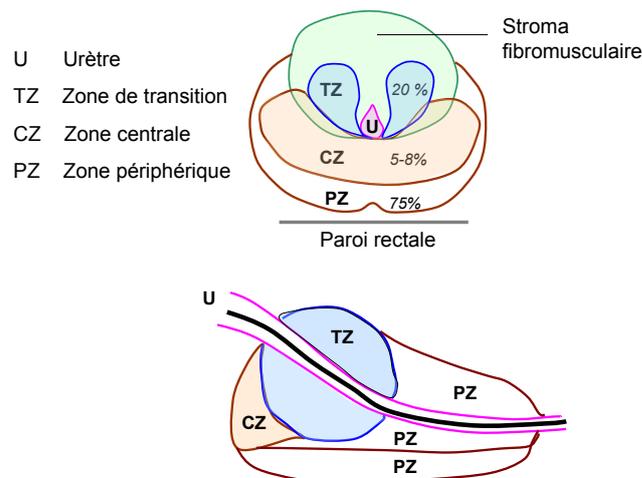


FIGURE 1.24: Anatomie de la prostate (tiré de www.asburyparklibrary.org).

Imagerie Aujourd'hui l'examen le plus utilisé pour la détection de cancers de la prostate reste les ultrasons qui permettent de détecter des zones suspectes de l'organe. La détection de tumeurs s'avère plus délicate que dans le cas du sein, puisque le cancer prend souvent la forme d'infiltrations en plus des nodules, peut toucher différents lobes, etc...

Pour déceler un cancer de la prostate, une mesure du taux d'antigènes prostatiques spécifiques (PSA) dans le sang est effectuée. Pour un taux de PSA élevé, un examen ultrasons ou par palpation est effectué. Souvent ces examens ne révèlent pas de nodule visible ou palpable malgré le fort taux de PSA : des biopsies multiples sont alors effectuées dans différentes zones de l'organe, jusqu'à 18 par patient. Dans le cas où un nodule est détecté, un certain nombre de biopsies est tout de même pratiqué. Ces biopsies permettent d'obtenir diverses informations sur les tumeurs, de leur taille à leur type. Bien que la biopsie reste indispensable pour l'analyse de la masse cancéreuse, un nombre réduit de biopsies uniquement au niveau du site de la tumeur suffiraient. Le manque de spécificité de l'examen ultrasons et de la mauvaise détection des tumeurs justifient ce nombre important de biopsies, rendant l'examen difficile.

De plus en plus, un examen IRM de la prostate est effectué sur les patients, ce qui permet de mieux guider les biopsies dans de nombreux cas mais surtout de détecter

des cas contre indiqués pour une opération chirurgicale (notamment lorsque la tumeur s'étend au delà de la capsule et peut se propager dans les tissus environnants).

Une nouvelle technique de traitement jusqu'ici sans récurrence, appelée *Curiethérapie* ou *Brachythérapie* (ou plus couramment *Internal-Beam Radiation* en anglais, par opposition à la radiation classique *External-Beam Radiation*) bénéficie des examens IRM. En effet, dès 1997, une équipe de chirurgiens menée par le docteur D'Amico (Harvard Medical School) a testé un traitement des cancers de la prostate en phase précoce par Brachythérapie qui s'est avéré pour certains patients aussi efficace que la radiation (durant 7 semaines) ou la chirurgie. L'équipe utilise les données IRM pour placer dans les tumeurs de la prostate une centaine de « grains » radioactifs [D'Amico 98] capables de détruire les cellules cancéreuses voir figure 1.25. Depuis, cette technique est couramment exercée, et le placement des grains radioactifs permis par l'IRM est beaucoup plus performant qu'avec les ultrasons.

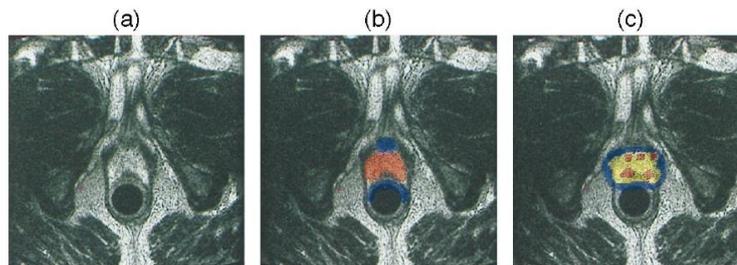


FIGURE 1.25: a) Image IRM de la prostate. b) Identification de la zone périphérique de la prostate, de la paroi rectale et de l'urètre. c) Dose totale d'agents radioactifs reçue, basé sur la position des sources d' ^{125}I (tiré de [D'Amico 98]).

Les ultrasons sont ainsi petit à petit relégués par des techniques d'imagerie comme l'IRM plus adaptés au cas de la prostate. Dans ce but, un des axes nouveaux de recherche sur la détection du cancer de la prostate propose d'adapter l'imagerie optique en DOT [Pu 09] ou FDOT et en couplant éventuellement l'optique aux ultrasons [Boutet 09]. Comme présenté précédemment, les tissus de la prostate sont environ 10 fois plus absorbants que ceux du sein (le coefficient μ_a est environ égal à $0,6 \text{ cm}^{-1}$ pour une excitation à 850 nm), mais la **profondeur à explorer** se restreint à **quelques centimètres**. Comme pour le sein, la détection de **différents sites tumoraux**, avec une **résolution proche du millimètre** est à envisager dans le cas de la prostate.

1.4.2 Détection et localisation

L'imagerie optique de fluorescence offre différentes possibilités pour visualiser les marqueurs au sein des tissus biologiques. La détection d'un signal de fluorescence à distinguer du fond non spécifique (marqueur fluorescent circulant, et non fixé à la cible biologique) auquel s'ajoute l'autofluorescence des tissus permet d'obtenir une cartographie 2D des tissus. Le passage en 3D demande une localisation dans le milieu (intrinsèquement tridimensionnel), et requiert des méthodes de tomographie. Nous proposons

de détailler ces deux notions dans les paragraphes suivants, et de mettre en place les outils numériques nécessaires à la détection et localisation de tumeurs.

1.4.2.1 Détection et contraste

La localisation ne peut être juste sans une détection efficace des marqueurs. Afin de quantifier la détection des marqueurs, nous avons déjà précédemment parlé du ratio $r_{T,N} = \frac{\bar{T}}{\bar{N}}$ entre la zone tumorale T et la zone saine N (\bar{T} et \bar{N} sont respectivement les intensités moyennes en photons par pixel des zones T et N). Ici nous introduisons également la notion de contraste, noté $C_{T,N}$, entre une zone tumorale T et une zone saine N , comme schématisé figure 1.26.

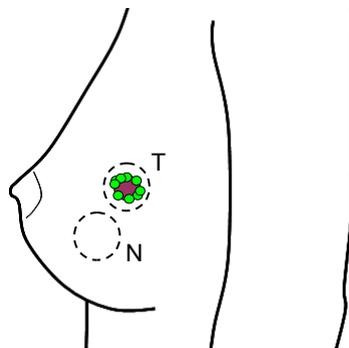


FIGURE 1.26: Définition du contraste entre une zone saine (N) et la zone tumorale marquée (T).

En pratique, l'intensité moyenne de fluorescence est mesurée sur les deux zones d'intérêt :

$$C_{T,N} = \frac{\bar{T} - \bar{N}}{\bar{T} + \bar{N}} \quad (1.19)$$

Le contraste varie entre 0 et 1 : plus sa valeur est proche de 1, meilleure est la détection. Ce critère sera par la suite utilisé afin de juger la qualité de détection tant en simulation que sur données expérimentales.

1.4.2.2 Localisation : problème direct, problème inverse

Prévoir les signaux de fluorescence émis lorsque nous connaissons la distribution des fluorophores dans le milieu diffusant ainsi que les paramètres optiques de ce dernier, est le *problème direct*, posé dans « le sens naturel de la physique » [Demoment 01a]. A l'opposé, déduire la répartition alors inconnue des fluorophores dans le milieu diffusant à partir des signaux de fluorescence émis constitue le *problème inverse*. Dans cette partie seront présentées les notions de problèmes direct et inverse, utiles à la reconstruction tridimensionnelle de la distribution de marqueurs, et donc à la localisation des cibles biologiques marquées.

Problème direct – Connaissant l'objet et le mécanisme d'observation (caractéristiques x de l'objet), nous pouvons définir une description mathématique des mesures y alors

observées. Nous obtenons alors un *modèle*, qui doit être assez précis afin d'avoir une représentation correcte du phénomène physique en jeu, mais aussi suffisamment simple pour se prêter à un traitement numérique [Demoment 01b]. Autrement dit, il s'agit de déterminer l'opérateur F de X dans Y tel que :

$$\begin{aligned} F : X &\longrightarrow Y \\ x &\longmapsto y = F(x) \end{aligned} \quad (1.20)$$

X et Y sont des espaces vectoriels, par exemple \mathbb{R}^m et \mathbb{R}^n en dimension finie.

Problème inverse A partir des mesures y et du modèle direct, il s'agit de reconstruire x .

Entre ces deux problèmes peut s'intercaler ce que Demoment et al. appellent un **problème d'instrumentation** [Demoment 01b] : nous devons collecter des données (ici spectrales) les plus précises et porteuses d'information possibles afin de faciliter la résolution des problèmes direct et inverse.

En imagerie de fluorescence Comme présenté précédemment, dans le cas de l'imagerie de fluorescence, le problème direct consiste à trouver des mesures de fluorescence, en connaissant le milieu diffusant exploré et la répartition spatiale des fluorophores dans ce milieu. Le problème inverse, quant à lui, cherche à déterminer la répartition spatiale des fluorophores à partir des mesures de fluorescence, comme illustré sur la figure 1.27.

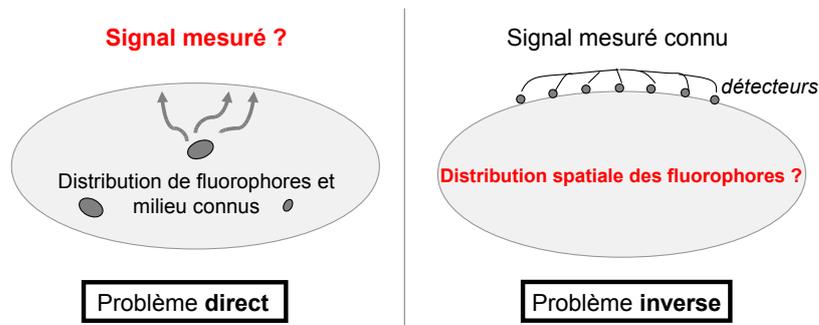


FIGURE 1.27: Exemple de couple problème direct/problème inverse en imagerie de fluorescence. Le problème direct consiste à prévoir les acquisitions de fluorescence tandis que le problème inverse cherche à localiser les fluorophores à partir des mesures recueillies sur les détecteurs.

1.5 Élimination de l'autofluorescence

L'imagerie optique de fluorescence dépend énormément des biomarqueurs utilisés. Nous avons présenté précédemment différentes technologies permettant d'atteindre des contrastes tumeur/tissu sain satisfaisants pour l'imagerie *in vivo* du petit animal. Pour l'imagerie en profondeur et le transfert de la technique au diagnostic chez l'Homme, la

localisation des marqueurs les plus performants se heurtera toujours au problème de la fluorescence naturelle ou autofluorescence des tissus.

1.5.1 Problématique

En dehors de la fluorescence spécifique émise par les marqueurs autour de la cible, une fluorescence dite **non spécifique** émise par les marqueurs circulant et qui ne se sont pas fixés à la cible détériore le contraste tumeur/tissu sain. Enfin, les tissus émettent également un signal de fluorescence, appelé **autofluorescence**. Les fluorophores performants pour l'imagerie *in vivo* sur petit animal, qui émettent un signal de fluorescence spécifique largement supérieur au signal non spécifique et à l'autofluorescence, voient leur efficacité fortement diminuer pour l'imagerie en profondeur. En effet, la fluorescence émise par les marqueurs fixés à la cible biologique décroît de façon exponentielle avec la profondeur de tissus traversés. Le signal d'autofluorescence, ainsi que le signal non spécifique, tout deux constants quelle que soit la profondeur des marqueurs, deviennent alors gênants et compromettent la localisation de la cible biologique.

1.5.2 Élimination de l'autofluorescence des tissus en imagerie optique de fluorescence : état de l'art

Jusqu'à présent, peu d'équipes se sont penchées sur le problème de l'autofluorescence dans les longueurs d'onde rouges et proches infrarouges. Mais plusieurs appareils d'imagerie de fluorescence ont été mis au point et parfois commercialisés, pour l'étude de la fluorescence sur petit animal. Alors que certains groupes ne mentionnent pas du tout le problème d'autofluorescence des tissus, certains le présentent, et proposent une écriture du problème ainsi que des méthodes de résolution afin de l'éliminer. En effectuant un état de l'art sur le sujet, quelques noms principaux ressortent comme Carestream, Cambridge Research & Instrumentation (CRI), ou encore Caliper Life Sciences.

1.5.2.1 Carestream

Chez Carestream [Wood 08], la méthode utilisée n'est pas clairement explicitée. Leur approche est fondée sur la variation de la longueur d'onde d'excitation et de la gamme d'émission observée : un système de roues de filtres permet de sélectionner des longueurs d'onde d'excitation de 390 nm à 770 nm, ainsi que diverses gammes d'émission de 440 nm à 830 nm. Les spectres d'excitation et d'émission sont modélisés par une superposition de plusieurs fonctions gaussiennes. Ces modèles sont utilisés ensuite pour séparer les spectres (notamment de fluorescence spécifique et d'autofluorescence), en utilisant *les moindres carrés non linéaires*¹. Les dernières avancées de ce groupe présentent une combinaison de modes d'imagerie (rayons X et fluorescence) pour la mise au point d'un appareil d'imagerie de petit animal. D'après les informations présentes à propos de leur

1. Les moindres carrés non linéaires est une forme des moindres carrés spécialisée dans l'estimation d'un modèle non linéaire en n paramètres à partir de m observations ($m > n$). Une méthode pour estimer ce genre de problème est de considérer des itérations successives se fondant sur une version linéarisée du modèle initial

système, la contribution d'autofluorescence est retirée des images obtenues, mais peu de détails sont donnés sur les méthodes utilisées (cf. figure 1.28).

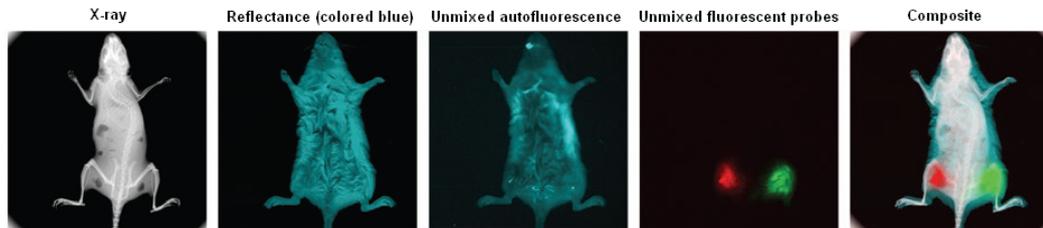


FIGURE 1.28: *Images multi-modes et multi-spectrales d'une souris produites par le logiciel Multispectral Kodak. Les deux premières images à gauche sont des données acquises, tandis que les images nommées « unmixed » ont été calculées à partir d'un ajustement de modèle numérique aux images uniformes d'épi-illumination corrigées. La dernière image est composée des images de rayons X et de fluorescence, après retrait de l'autofluorescence (tiré de <http://www.carestreamhealth.com>).*

1.5.2.2 Cambridge Research & Instrumentation

L'équipe d'imagerie moléculaire de Cambridge Research & Instrumentation (CRI) a développé un appareil d'imagerie de fluorescence pour petit animal. Leur système sépare l'émission de fluorescence de l'illumination par des filtres « barrières », puis détecte la fluorescence (le fluorophore utilisé est la protéine fluorescente verte (GFP)) à l'aide d'une caméra très sensible (comme une caméra dispositif à transfert de charge (CCD) refroidie). Enfin le système distingue les signaux d'autofluorescence parasites provenant de différentes zones du spécimen, et le signal désiré provenant de la zone ciblée. L'équipe de Cambridge Research & Instrumentation (CRI) s'est donc heurtée au problème d'autofluorescence, et l'analyse de ses brevets publiés nous informe sur le mode de résolution qui a été choisi. La mise en équation que les brevets présentent –sous forme additive– est la suivante [Levenson 05, Levenson 06, Levenson 08, Hoyt 06, Cronin 04, Cronin 05] :

$$V(\lambda) = a.F(\lambda) + b.G(\lambda) \quad (1.21)$$

où λ est la longueur d'onde, V la mesure, F le spectre d'émission d'autofluorescence, G le spectre d'émission de protéine fluorescente verte (GFP), et enfin a et b sont respectivement les coefficients de pondérations d'autofluorescence et de protéine fluorescente verte (GFP). En posant $E = \begin{pmatrix} F & G \end{pmatrix}$, et $A = \begin{pmatrix} a \\ b \end{pmatrix}$, nous aboutissons à l'écriture simplifiée de l'équation 1.21 :

$$V(\lambda) = E(\lambda).A \quad (1.22)$$

A partir de cette équation simplifiée, et en supposant que la fluorescence ou l'autofluorescence (soit la quantité F , soit G) soit connue, CRI déduit la quantité inconnue dans un premier temps par simple soustraction. Nous testerons cette méthode (la plus intuitive et la plus simple) dans la partie suivante.

Cette équipe mentionne également une technique de *séparation multispectrale du signal d'autofluorescence*. Leur système peut donc acquérir une série d'images pour différentes longueurs d'onde d'excitation. Seulement l'analyse des brevets ne nous a pas permis de comprendre suffisamment cette technique pour en proposer ici une description détaillée. Il en ressort tout de même que la méthode des moindres carrés semble être la méthode privilégiée, couplée à l'utilisation de bibliothèques spectrales.

Enfin la figure 1.29 présente les résultats qu'ils obtiennent sur souris avec leur système d'imagerie multispectral Maestro™ où ils distinguent jusqu'à cinq contributions fluorescentes distinctes.

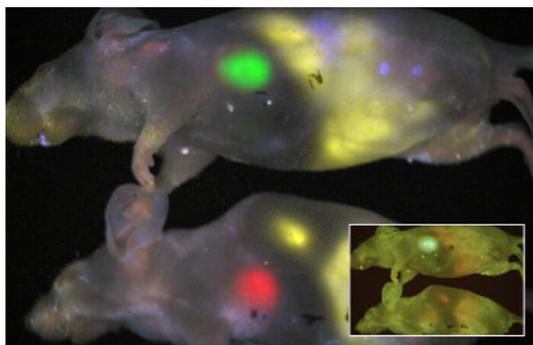


FIGURE 1.29: Image multispectrale d'une souris, séparant 5 composantes fluorescentes : Cy3,5 (bleu), FITC (vert), TRITC (rouge), nourriture (jaune) et la peau (gris) (tiré de <http://www.cri-inc.com>).

1.5.2.3 Caliper Life Sciences

Enfin le groupe le plus proche de nos travaux sur la problématique de l'élimination de l'autofluorescence est le groupe Caliper Life Sciences spécialisé en imagerie optique de fluorescence *in vivo* sur petit animal. Afin d'éliminer l'autofluorescence des tissus de leur données, Xu *et al.* utilisent une méthode dérivée de la méthode MCR [Xu 08, Xu 09], couramment utilisée en chimométrie ou en expression génique. La méthode décompose une matrice de mesures D de fluorescence en un produit de deux matrices de tailles inférieures C et S (plus éventuellement une matrice de bruit E). La matrice C est la matrice des concentrations des composants recherchés, et S la matrice de spectres purs :

$$D = CS + E \quad (1.23)$$

Partant d'images multispectrales et de quelques contraintes sur les spectres recherchés (non-négativité des valeurs des spectres et concentrations dans le milieu, ou parcimonie par exemple), leur algorithme est capable de séparer différentes sources spectrales associées à plusieurs composants présents dans le milieu analysé. Il requiert que les matrices C et S soient initialisées, et que le nombre de sources à rechercher soit fixé. Le couple solution (C, S) est mis à jour itérativement par un algorithme de Alternating Least Squares (ALS) soit une approche par moindres carrés alternativement sur chaque matrice C et S , jusqu'à convergence. Un exemple des performances de leur algorithme est proposé figure 1.30.

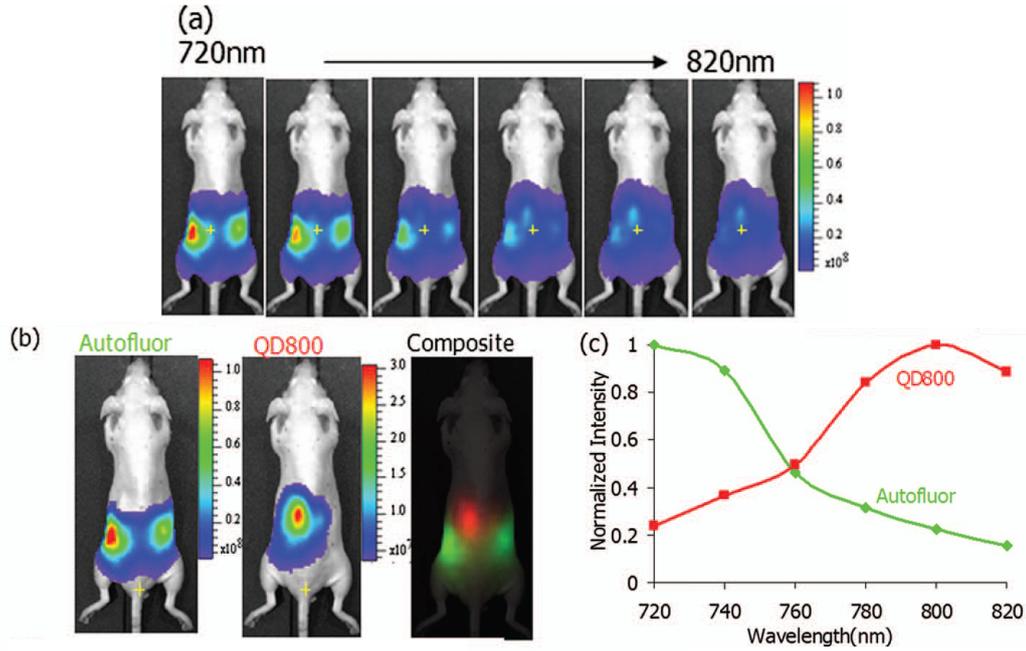


FIGURE 1.30: a) Fluorescence du tube capillaire rempli de QD800 implanté dans l'animal, images de 720 à 820 nm tous les 20 nm, pour une excitation en transillumination à 675 nm. La position de l'implant est marquée par une croix. b) Distributions séparées de l'autofluorescence et du QD800 respectivement, et l'image composite (autofluorescence en vert, et QD800 en rouge). c) Spectres séparés (tiré de [Xu 09]).

Au regard des différentes méthodes proposées, nous nous sommes également orientés vers une méthode permettant de discriminer les fluorophores injectés de l'autofluorescence des tissus par leurs spectres de fluorescence.

1.5.3 Solution proposée : la séparation de spectres

Toutes les méthodes détaillées précédemment s'intéressent aux spectres de fluorescence supposés distincts de l'autofluorescence et de la fluorescence des marqueurs. Cette idée nous a également paru être la plus judicieuse pour séparer les sources de fluorescence en jeu. Le modèle que nous considérons est identique à ceux décrits par CRI et Caliper, à savoir qu'un spectre de fluorescence s mesuré en un point m de la zone d'intérêt du patient est une combinaison linéaire du spectre de fluorescence des marqueurs s_1 et d'autofluorescence s_2 :

$$\underline{s} = a_1 \underline{s}_1 + a_2 \underline{s}_2 \quad (1.24)$$

A partir de ce modèle (voir figure 1.31), il s'agit de déterminer les coefficients de mélange (a_i) et les spectres (\underline{s}_i). Une fois les coefficients de mélange et spectre d'autofluorescence obtenus, il sera facile d'éliminer la contribution indésirée d'autofluorescence des données initiales.

L'état de l'art a proposé diverses méthodes de résolution du problème, la plupart du temps en considérant les spectres de fluorescence connus, ou en apportant le maxi-

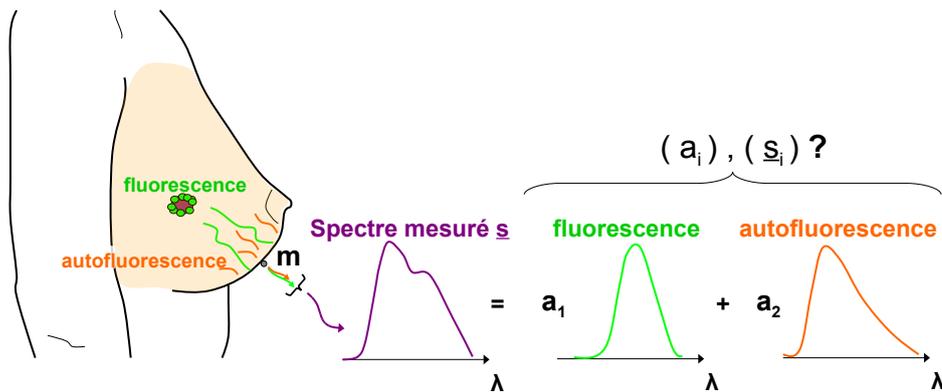


FIGURE 1.31: Élimination de l'autofluorescence par séparation de spectre : les spectres mesurés sont une combinaison linéaire des différents spectres de fluorescence présents dans le milieu, ici la fluorescence des marqueurs et l'autofluorescence naturelle des tissus.

mum d'information sur les spectres sans nécessiter qu'ils sont complètement connus au départ (Caliper). Dans le chapitre suivant, nous proposons une étude spectrale de l'autofluorescence ainsi que des marqueurs fluorescents introduits *in vivo* qui nous orientera vers une méthode de séparation de source dite **aveugle**, qui ne nécessite pas ou peu d'information *a priori* sur les données initiales du problème.

Bilan du chapitre

Ce chapitre présente un éventail de méthodes d'imagerie médicale couramment utilisées dans le clinique et appliquées à l'oncologie. Face aux ultrasons ou encore à l'IRM, et devant la forte diffusion des tissus biologiques, l'imagerie optique s'est effacée malgré les premières expériences de transillumination de Cutler ou encore de Bright dès 1831 qui observa le crâne d'un patient à la bougie. Depuis les années 2000 cependant, les progrès dans la modélisation de la propagation de la lumière dans les tissus et des méthodes de reconstruction associées ont permis le regain d'intérêt pour l'imagerie optique. Nous avons proposé dans ce chapitre une description des phénomènes d'interaction de la lumière avec les tissus biologiques : le modèle théorique pour décrire la propagation de la lumière dans les tissus – l'approximation de la diffusion – que nous utiliserons par la suite a été présenté.

C'est tout d'abord la tomographie optique diffuse DOT qui s'est développée, pour obtenir des reconstructions en trois dimensions des propriétés optiques d'un milieu. Face aux résultats encourageants de cette méthode, l'utilisation de marqueurs fluorescents capables de se fixer à des cibles biologiques comme les tumeurs a permis d'améliorer les contrastes tumeur/tissu sains en FDOT. Nous avons brièvement passé en revue dans ce chapitre quelques marqueurs fluorescents connus. Parallèlement au développement de marqueurs de plus en plus spécifiques et brillants, la localisation des marqueurs nécessite le traitement des acquisitions détériorées par le signal d'autofluorescence des tissus. L'autofluorescence étant la plupart du temps négligeable pour l'imagerie *in vivo* du

petit animal, peu de méthodes d'élimination de l'autofluorescence ont été développées. L'état de l'art dressé dans ce chapitre rassemble trois grands groupes (CRI, Carestream et Caliper Life Sciences) seulement, et confirme le manque de méthodologie sur ce sujet. Alors que les domaines d'applications autrefois réservés au petit animal s'ouvrent aujourd'hui à l'Homme, l'élimination de l'autofluorescence est nécessaire pour obtenir des représentations 3D précises de la distribution des marqueurs. Nous proposons de développer une méthode de séparation de spectres de fluorescence pour démarquer la fluorescence spécifique des marqueurs de l'autofluorescence gênante dans les longueurs d'onde utilisées en FDOT.

Le chapitre suivant décrit en détails le système expérimental mis en œuvre durant cette thèse pour l'acquisition de données spectroscopiques sur fantôme et *in vivo* sur petit animal.

CHAPITRE 2

Dispositif expérimental et supports d'étude

Ce chapitre a pour objectif de présenter le dispositif expérimental que nous proposons pour l'étude de l'élimination de l'autofluorescence par spectroscopie. Nous avons imaginé, réalisé et validé un système d'acquisition de spectres de fluorescence en géométrie de réflexion, que nous avons testé sur divers supports.

Nos expérimentations ont été menées sur fantômes optiques permettant de simuler des tissus biologiques, et *in vivo* sur souris. Nous détaillons dans ce chapitre ces supports d'acquisitions, ainsi que les différents marqueurs fluorescents utilisés et les protocoles d'expérimentation associés.

Enfin, pour proposer une alternative à l'expérimentation et afin de travailler sur des données proches de celles du diagnostic chez l'Homme, nous avons également travaillé sur simulations ; nous décrivons en fin de chapitre la simulation sur données du sein que nous avons développée à partir de données cliniques.

Sommaire

2.1	Système d'acquisition	43
2.1.1	Matériel	44
2.1.2	Écartement sources-détecteurs	47
2.1.3	Acquisitions	49
2.2	Expérimentation	49
2.2.1	Fantômes optiques	50
2.2.2	Expérimentation <i>in vivo</i> sur souris	53
2.2.3	Marqueurs fluorescents utilisés	54
2.3	Simulations : exemple du sein	57
2.3.1	Théorie	58
2.3.2	Exemple	60

2.1 Système d'acquisition

Le choix d'une étude spectrale du phénomène d'autofluorescence nous a mené à monter le système complet présenté figure 2.1. L'imagerie optique de fluorescence requiert l'utilisation d'une source lumineuse d'excitation dans une longueur d'onde adaptée (cf. chapitre 1). La source illumine une zone d'intérêt et excite les fluorophores présents dans le milieu. Afin de collecter le signal de fluorescence réémis par le milieu, un spectromètre couplé à une caméra à dispositif à transfert de charge (CCD) est utilisé. Pour l'expérimentation animale, un dispositif d'anesthésie à l'isoflurane s'ajoute au dispositif initial. La géométrie qui a été privilégiée ici est une géométrie de réflexion, qui peut s'adapter à l'étude de beaucoup d'organes comme par exemple celle de la prostate. Ce choix de géométrie plutôt qu'une géométrie de transmission où les sources sont positionnées d'un côté de l'objet, et les détecteurs de l'autre peut se justifier par les applications visées. Enfin le signal d'autofluorescence est beaucoup plus gênant dans la géométrie de réflexion : se placer dans le cas le plus difficile nous permet d'analyser plus en profondeur le phénomène. Enfin, une platine de translation permet de déplacer l'objet analysé et d'en obtenir un scan complet. Tout le matériel utilisé est détaillé dans les paragraphes suivants.

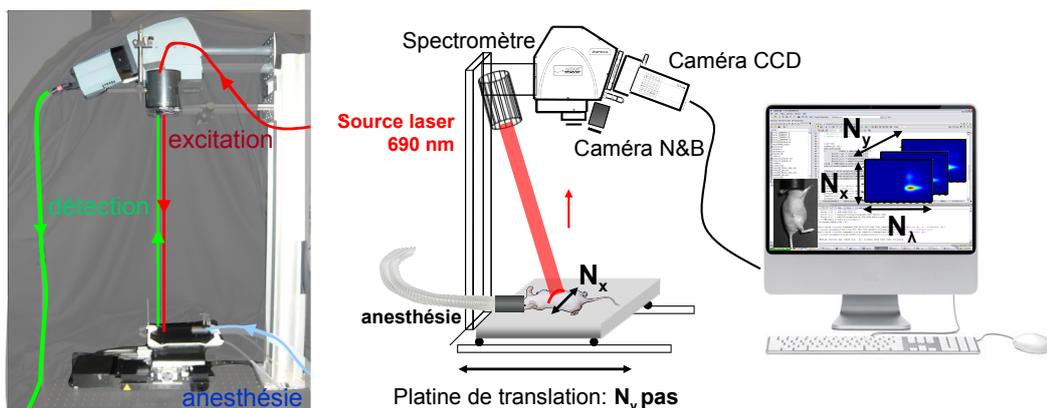


FIGURE 2.1: Dispositif expérimental : illumination de la zone d'intérêt à 690 nm, et détection de la fluorescence par la caméra CCD couplée au spectromètre imageur (Andor technologies). Après avoir scanné toute la zone d'intérêt, le cube de données obtenu sera traité sous Matlab.

2.1.1 Matériel

2.1.1.1 Spectromètre-caméra CCD

Présentation Nous utilisons un spectromètre Andor Shamrock SR-163 (cf. notice en annexe A), couplé à une caméra CCD Andor iDus DV420A (cf. notice en annexe B); le système ainsi monté permet de mesurer les spectres d'émission émis par le support analysé sur une ligne entière, grâce à un réseau de diffraction optique qui décompose le faisceau lumineux entrant selon la longueur d'onde (voir schéma 2.2).

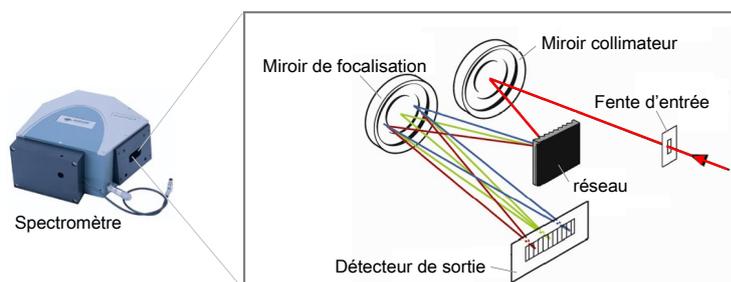


FIGURE 2.2: *Le spectromètre sépare la lumière selon la longueur d'onde (adapté du site du constructeur Andor : <http://www.andor.com/learning/spectrographs/?docID=340>).*

Résolution spectrale Pour une longueur d'onde λ égale à 546 nm, le plus petit intervalle $\Delta\lambda$ de longueur d'onde qui peut être mesuré est égal à 0.57 nm, ce qui porte sa résolution spectrale $R = \lambda/\Delta\lambda$ à près de 960.

Plan image Dans notre cas, la fente d'entrée du spectromètre est de dimension $75 \mu\text{m}$ par 3 mm. Un objectif (Schott-Schneider Xenon 0.95/25) est placé devant la fente. L'ensemble est situé à la verticale du plan de travail où se trouve l'objet analysé : pour une distance par exemple de 65 cm, la distance focale de l'objectif étant de 25, nous obtenons une image de la fente d'environ 2 mm par 7,8 cm.

Le spectromètre est couplé à une caméra CCD refroidie à -50°C : le détecteur CCD assure la conversion du signal lumineux en sortie du spectromètre en un signal électrique analogique.

2.1.1.2 Source laser et longueur d'onde d'excitation

Nous utilisons une diode laser qui émet à 690 nm. Cette longueur d'onde s'accorde avec les fluorophores utilisés par la suite, notamment l'ICG.

Choix de la longueur d'onde d'excitation Nous avons choisi une excitation à 690 nm sur notre dispositif final après avoir testé différentes longueurs d'onde ; une longueur d'onde plus élevée que 690 nm permettrait pourtant d'une part **d'atténuer le phénomène d'autofluorescence** (par exemple 785 nm qui a aussi été testée sur notre système), **mais aussi d'exciter les fluorophores à une longueur d'onde optimale**

(correspondant à un pic d'absorption des marqueurs). Cependant, si la longueur d'onde est trop élevée, la séparation de source est compromise par une zone de recouvrement entre les spectres d'autofluorescence et de fluorescence trop importante. Un exemple est proposé dans le paragraphe suivant pour illustrer ce problème.

Exemple Quelle que soit la longueur d'onde d'excitation choisie, le signal d'excitation doit être filtré, par exemple par un filtre passe-haut (schéma 2.3-a). Le signal de fluorescence alors collecté, s'il émet dans les longueurs d'onde proches de l'excitation, aura l'allure présentée sur la figure 2.3-b : bien que le pic d'émission vrai du signal se situe à la longueur d'onde λ_e , le pic que nous observons en réalité en λ_f est dû au filtre (on parle de **montée du filtre**).

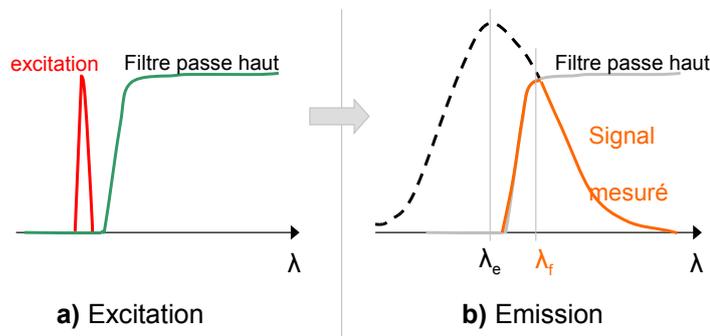


FIGURE 2.3: Schématisation du phénomène de montée de filtre : a) le filtre passe-haut permet de bloquer la longueur d'onde d'excitation. b) le filtre est responsable de la visualisation d'un pic observé à la longueur d'onde λ_f quand le fluorophore émet en fait à la longueur d'onde λ_e .

Le schéma 2.4 propose d'illustrer le comportement des émissions de fluorescence (fluorophore et autofluorescence) obtenues pour deux longueurs d'onde d'excitation différentes dans un cas proche du notre. Le signal d'autofluorescence est représenté en orange (proche de celui observé en expérimentations), et le signal des marqueurs spécifiques en vert (ici proche de la fluorescence de l'ICG).

premier cas : longueur d'onde d'excitation λ_1 Le cas de la figure 2.4-a propose d'utiliser une longueur d'onde d'excitation λ_1 , avec un pic de montée de filtre à λ'_1 . L'émission de fluorescence résultante est représentée sur la figure 2.4-a à droite : les pics d'autofluorescence (à λ'_1) et de fluorescence des marqueurs (à λ_m) sont suffisamment distincts pour qu'une méthode de séparation de spectres soit efficace (l'éloignement minimum acceptable dépendra des marqueurs choisis, et de la méthode de séparation de spectres utilisée : un travail complémentaire sur simulations pourrait au cas par cas déterminer les longueurs d'onde optimales).

second cas : longueur d'onde d'excitation $\lambda_2 > \lambda_1$ Sur le second cas (figure 2.4-b) la longueur d'onde d'excitation λ_2 est plus grande : elle est plus adaptée à l'excitation

des marqueurs, et excite moins les fluorophores responsables de l'auto fluorescence. Cependant, comme présenté sur le schéma 2.4-b à droite, les pics d'auto fluorescence (donc du filtre) à λ'_2 et de fluorescence spécifique à λ_m sont cette fois plus rapprochés, et l'expérience nous a montré que ce type de configuration rendait la séparation de spectres moins précise.

Pour conclure, on préférera une longueur d'onde plus basse et **moins adaptée au marqueur mais permettant d'optimiser ensuite la séparation des spectres de l'auto fluorescence et de la fluorescence d'intérêt.**

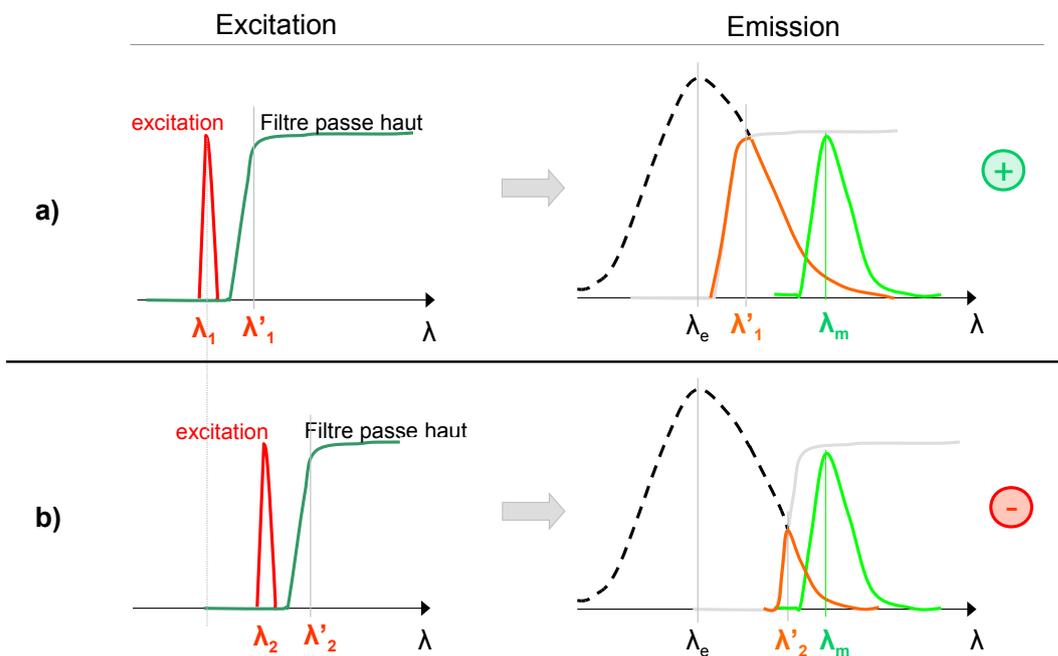


FIGURE 2.4: Le choix de la longueur d'onde d'excitation demande un compromis entre excitation optimale des marqueurs et atténuation de l'auto fluorescence d'un côté, et une bonne configuration pour la séparation des spectres de l'autre. Exemple schématisé pour deux longueurs d'onde d'excitation : on préférera une longueur d'onde plus basse et moins adaptée au marqueur pour optimiser ensuite la séparation des spectres de l'auto fluorescence et de la fluorescence d'intérêt.

Filtrage Un filtre passe-haut est en général utilisé pour sélectionner uniquement les longueurs d'onde supérieures à la longueur d'onde d'excitation. Ici nous utilisons un filtre coloré Schott *RG9*, placé devant l'objectif, dont la courbe de transmittance est donnée figure 2.5. Nous nous sommes assurés que les filtres utilisés ne sont pas ou peu fluorescents.

Pour finir, une caméra noir et blanc peut être ajoutée au système pour obtenir une photographie de la scène sur laquelle les acquisitions de fluorescence peuvent être superposées si nécessaire.

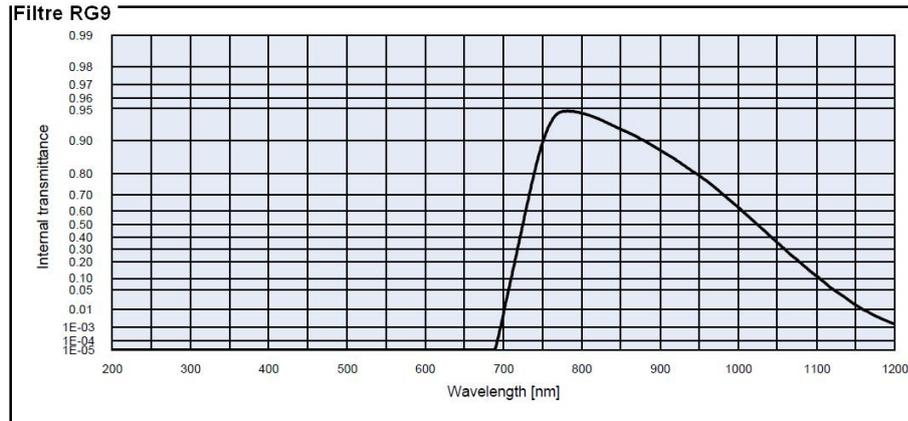


FIGURE 2.5: Transmittance du filtre RG9 placé avant l'objectif.

Enfin le système a été caractérisé : les résultats sont présentés en annexe (cf. annexe C).

2.1.2 Écartement sources-détecteurs

L'écartement entre la ligne source et la ligne de détecteurs influence directement la quantité de signal de fluorescence détectée. Nous proposons ici pour illustrer cette idée une simulation simple (sous Matlab) : nous considérons un milieu fluorescent homogène semi-infini (à comparer à un milieu homogène autofluorescent tel un tissu biologique), et faisons varier la distance d_{s-d} entre les sources et les détecteurs. Pour cet exemple, les valeurs des propriétés optiques sont fixées à $\mu_a = 0,4 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$ (valeurs proches de celles de la prostate).

Distance sources-détecteurs nulle Le premier cas proposé est obtenu en superposant les sources et détecteurs ($d_{s-d} = 0$), comme illustré sur le schéma 2.6-a. Dans ce scénario, si nous représentons la trajectoire des photons émis par la source S , nous observons que 98,4% des photons émis par S et détectés par D dans cette configuration proviennent des 5 premiers millimètres de tissu (voir figure 2.6-b et 2.6-c). On peut donc imaginer que dans le cas où un marqueur fluorescent spécifique serait positionné à par exemple 1,5 cm de profondeur dans les tissus, il ne serait excité que par un faible pourcentage de photons émis par S dans les 1,6% restants détectables par D qui auraient migré plus profondément que 5 mm.

Distance sources-détecteurs à 4 cm Si nous considérons maintenant un second scénario (voir figure 2.7-a) dans lequel les sources et détecteurs sont écartés de 4 cm ($d_{s-d} = 4 \text{ cm}$). Comme pour l'exemple précédent, nous traçons la trajectoire des photons émis par S et détectés en D : le résultat est présenté figure 2.7-b. Cette fois, seulement 45,6 % des photons émis par S et détectés par D proviennent des 5 premiers mm de tissu, et 98,34% des photons ont été répartis sur les 15 premiers millimètres de tissu

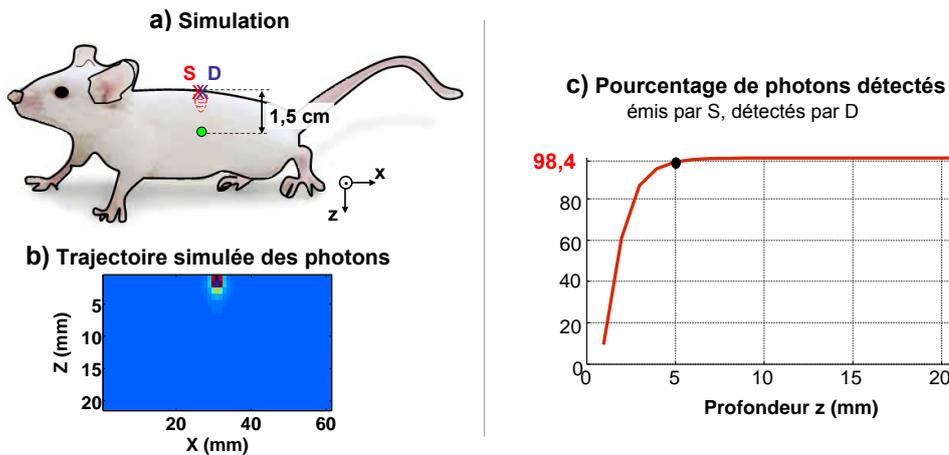


FIGURE 2.6: *Première simulation : position des sources et détecteurs confondue.* a) Description du cas étudié, b) trajectoire des photons émis par S et détectés par D, c) pourcentage de photons détectés par mm dans le tissu.

(voir figure 2.7-c). Cette configuration est mieux adaptée pour exciter des marqueurs fluorescents à 1,5 cm de profondeur.

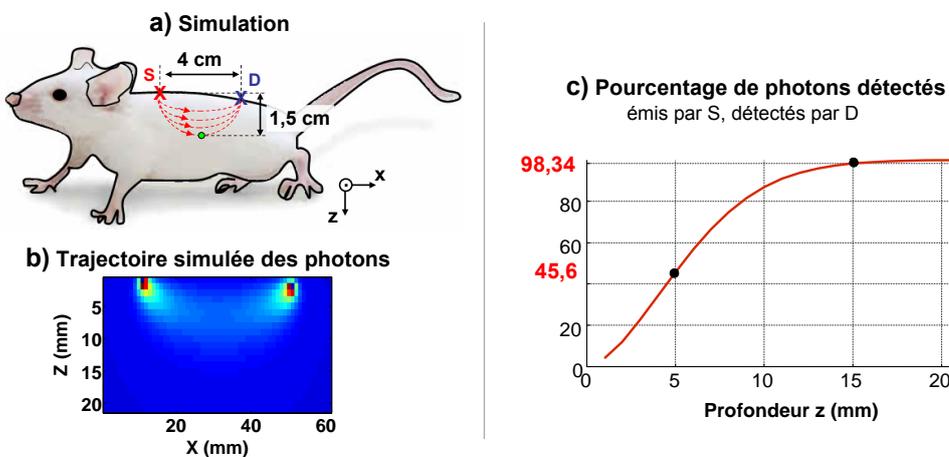


FIGURE 2.7: *Second résultat : écart sources-détecteurs égal à 4 cm.* a) Description du cas étudié, b) trajectoire des photons émis par S et détectés par D, c) pourcentage de photons détectés par mm dans le tissu.

En augmentant la distance entre la ligne source et la ligne de détection, on peut améliorer la détection de marqueurs en profondeur en augmentant le contraste tumeur-tissu sain. Les systèmes d'imagerie optique prévoient différentes positions sources-détecteurs dont l'écartement varie et obtiennent un jeu de données contenant beaucoup plus d'information que si l'écartement était fixé.

Une illustration de la variabilité du contraste tumeur-tissu sain selon la position des sources et détecteurs les uns par rapport aux autres sera présentée dans les résultats du dernier chapitre de cette thèse.

2.1.3 Acquisitions

Une fois le système entièrement réglé, les acquisitions résolues spectralement sont obtenues en illuminant la zone d'intérêt avec le laser ligne. Le signal de fluorescence est collecté sur une ligne de détecteur de N_x points ($N_x = 255$ dans notre cas) comme schématisé figure 2.1. Le signal mesuré est décomposé selon son spectre, en N_λ longueurs d'onde ($N_\lambda = 1024$ ici, et couvre environ 380 nm). Enfin, une platine de translation couvrant N_y pas de 1 mm minimum est utilisée pour obtenir un scan complet de l'objet analysé. En pratique, des distances d'environ 7 cm sont scannées. Pour chaque position de la platine, une acquisition de taille $N_x \times N_\lambda$ est ainsi obtenue (cf. figure 2.8-a).

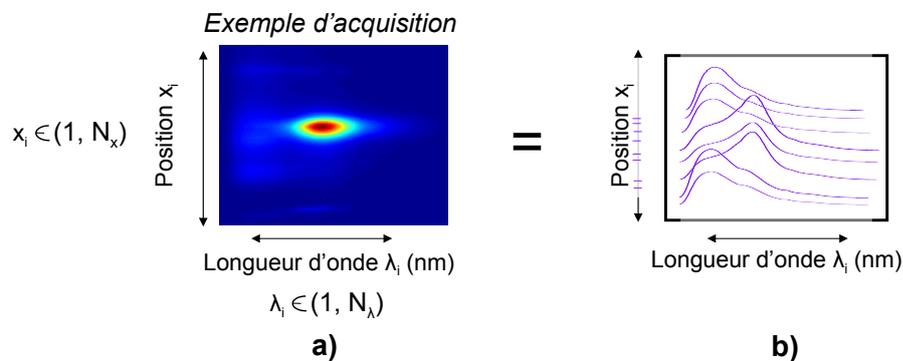


FIGURE 2.8: *Acquisition résolue spectralement : a) pour chaque position de la platine de translation, une acquisition de taille $N_x \times N_\lambda$ est obtenue. b) Chaque ligne de la matrice $N_x \times N_\lambda$ est un spectre mélangé des différents spectres de sources présentes dans le milieu.*

A la fin du scan, nous obtenons alors un cube de données, de taille $(N_y \times N_x \times N_\lambda)$, comme présenté figure 2.9. Afin de simplifier le traitement des données, nous choisissons de réorganiser le cube en un tableau à deux dimensions, de taille $(N_y \times N_x, N_\lambda)$ (ou encore (N_s, N_λ)). Cette réorganisation regroupe les dimensions spatiales entre elles, et laisse les longueurs d'onde indépendantes ; le traitement de ce nouveau tableau 2D permettra d'utiliser des algorithmes plus simples à implémenter (le traitement du cube 3D nécessiterait la manipulation de tenseurs). De plus, les premiers tests que nous avons effectués ont longtemps été sur données 2D avant la mise en place de la platine de translation sur le système, et l'algorithmie développée en parallèle était alors adaptée à ces dimensions. Nous avons sauvegardé l'implémentation simple, et la réorganisation des données n'a pour l'instant pas handicapé la séparation des spectres.

2.2 Expérimentation

Le dispositif expérimental ainsi mis en place permet l'acquisition de données résolues spectralement sur fantômes optiques, ou *in vivo* sur petit animal. Nous détaillons ces divers supports d'étude dans les paragraphes suivants.

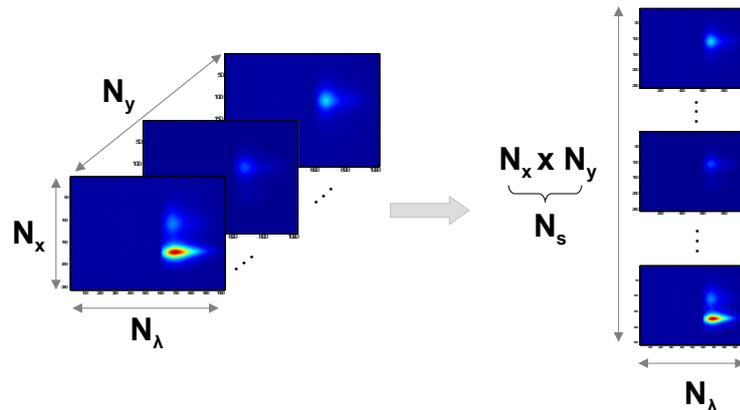


FIGURE 2.9: Le cube de données acquis de taille $(N_y \times N_x \times N_\lambda)$ est réorganisé en un tableau de dimension (N_s, N_λ) , avec $N_x \times N_y = N_s$, pour le traitement des acquisitions.

2.2.1 Fantômes optiques

Des supports optiques comme les fantômes permettent de reproduire les caractéristiques optiques (en termes d'absorption et diffusion) de tissus biologiques vivants. Nous présentons les caractéristiques et donnons quelques exemple de réalisations dans les parties ultérieures.

2.2.1.1 Définition

Un fantôme optique cherche à reproduire les propriétés optiques des tissus biologiques, et cet outil est fréquemment utilisé en imagerie [Dehghani 03, Hebden 01]. L'utiliser comme support d'étude simplifie les expérimentations (contrôle de la géométrie et des paramètres optiques) et épargne une expérimentation animale plus coûteuse et fastidieuse. L'expérimentation *in vivo* reste tout de même nécessaire, les fantômes ne pouvant naturellement pas reproduire de façon optimale la structure complexe des tissus biologiques.

2.2.1.2 Principaux constituants

En général, un fantôme est constitué de trois principaux groupes de composants :

1. Une **matrice** (qui constitue le milieu ; on pourra la rendre liquide, solide, ou encore « gélatineuse » en y ajoutant divers composants),
2. des **particules diffusantes**,
3. des **particules absorbantes**.

Chaque groupe possède différents candidats : la matrice sera en général composée d'eau, transparente aux longueurs d'onde considérées, tandis que le choix des particules diffusantes et absorbantes est plus diversifié. Parmi les particules diffusantes couramment utilisées existent sphères calibrées en latex ou polystyrène, de l'Intralipide (à base d'émulsions grasses d'huile de soja et de lécithine) [Flock 92], ou encore de la simple peinture blanche. Du côté des particules absorbantes, on pourra ajouter simplement de

l'encre de chine, ou se rapprocher des tissus biologiques en y ajoutant au fantôme de l'hémoglobine (de bœuf par exemple)[De Grand 06]. Il est à noter tout de même que les particules diffusantes pourront également s'avérer être faiblement absorbantes, et *vice versa*. Un effort est porté sur le choix des composants pour limiter cet effet, mais sera difficilement évité. A ces trois constituants peuvent s'ajouter des particules fluorescentes, d'une part pour recréer le signal non spécifique (marqueurs fluorescents qui ne se sont pas fixés à la cible biologique), ou l'autofluorescence (signal de fluorescence à un longueur d'onde différente).

Dans un souci de faible coût de fabrication, et pour une conservation de plusieurs jours, nous utilisons en général de l'encre de chine (Dalbe) comme élément absorbant (cf. courbe d'absorption figure 2.10), et de l'Intralipide (Intralipid-20%) comme diffusant (des courbes de diffusion d'intralipide 10% sont présentées figure 2.11). L'absorption de l'intralipide est principalement due à l'eau et l'huile de soja. Nous avons principalement recours à des fantômes liquides, où la matrice est constituée uniquement d'eau, ou des fantômes gélatineux dans lesquels de la gélatine alimentaire est ajoutée. L'aspect final rendu par la gélatine est intéressant, puisque nous nous rapprochons – en plus des caractéristiques optiques – de la consistance des tissus biologiques.

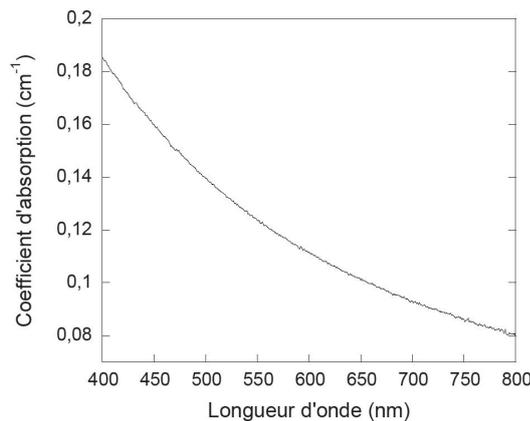


FIGURE 2.10: *Coefficient d'absorption de l'encre de chine (Dalbe) diluée à 0.0053% en volume dans de l'eau distillée, mesuré au spectrophotomètre Cary, Varian (Courbe tirée de [Laidevant 06]).*

Enfin, pour recréer un signal d'autofluorescence à une longueur d'onde d'émission comparable à celle des tissus biologiques, des fluorophores émettant à des longueurs d'onde plus basses peuvent être ajoutés à la préparation. En pratique, nous ajoutons de la protoporphyrine IX (PPIX) (Protoporphyrin IX, Sigma Aldrich, CAS Number : 553–12–8) préalablement diluée dans de l'éthanol pur pour spectroscopie. Bien que la PPIX ne fluoresce pas au delà de 700 nm (mesures au spectrofluorimètre), il semblerait que les agrégats formés par la PPIX pas tout à fait dissolue aient été responsable d'un signal détecté au delà de 700 nm, à attribuer peut-être à un signal de diffusion (cf. spectres d'émission de la PPIX et d'autofluorescence d'une souris figure 2.12). La cause de ce signal reste floue, mais sa ressemblance avec le signal observé sur souris en début de thèse nous avait poussés à utiliser la PPIX dans nos fantômes.

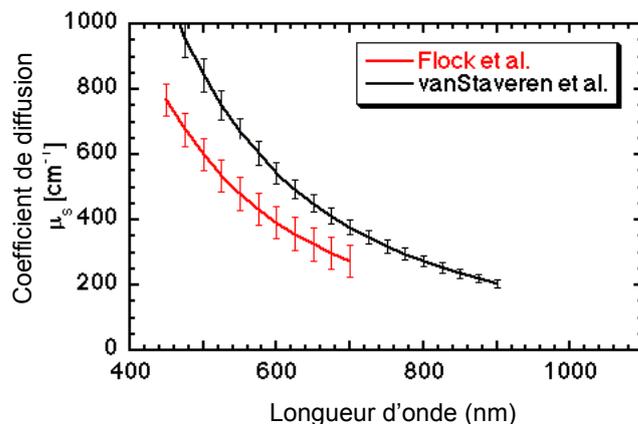


FIGURE 2.11: Coefficient de diffusion de l'intralipide 10% (adapté de <http://omlc.ogi.edu/spectra/intralipid/index.html>).

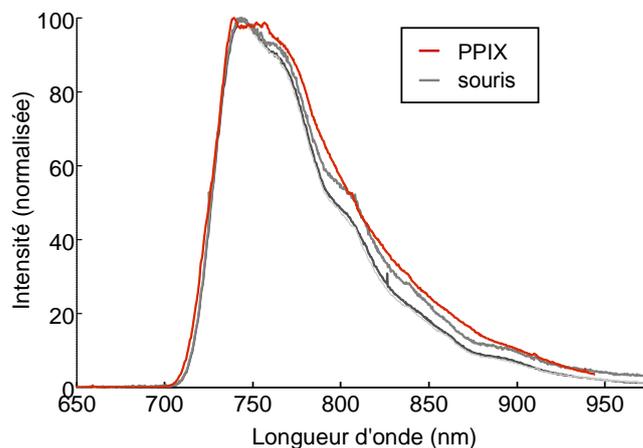


FIGURE 2.12: Comparaison des spectres de fluorescence entre 700 et 1000 nm des tissus de plusieurs souris et de la PPIX.

Les propriétés optiques du fantôme pourront être mesurées précisément sur la chaîne d'acquisition Comptage de Photons Uniques Corrélés dans le Temps (TCSPC) (de l'anglais *Time Correlated Single Photon Counting*) dont nous disposons. Une explication détaillée de la chaîne et du procédé de mesures des propriétés optiques est présentée en annexe (cf. annexe D).

Un exemple de réalisation de fantôme gélatineux de sein est donné dans le paragraphe suivant.

2.2.1.3 Exemple de procédé de réalisation

Nous proposons un exemple de réalisation d'un fantôme de sein. Les paramètres optiques de cet organe ont été mesurés et publiés en clinique à plusieurs reprises. Ici nous nous sommes basés sur les travaux de Cerussi *et al.* sur le sujet [Cerussi 01], et

avons choisi des valeurs d'absorption et de diffusion pour notre fantôme qui sont cohérentes avec ses résultats, c'est à dire proches de $0,07 \text{ cm}^{-1}$ à 800 nm pour l'absorption, et de $7,6 \text{ cm}^{-1}$ à 800 nm pour le coefficient de diffusion réduit. Les quantités d'encre et d'intralipide utiles pour obtenir des valeurs d'absorption et de diffusion souhaitées sont tirées de travaux précédents au sein du laboratoire [Laidevant 06]. Une première mesure de l'encre dans l'eau sous spectrophotomètre (Cary, varian) permet d'estimer la valeur d'absorption du mélange. Une fois le fantôme réalisé, une mesure plus précise des propriétés d'absorption et de diffusion du fantôme sur TCSPC est possible. Les quantités utilisées pour cette expérience en particulier sont présentées dans le tableau ci-dessous à titre indicatif :

Composant	quantité
Eau	570 ml
Intralipide	30 ml
Encre de chine	$20 \mu\text{l}$
PPIX	25 mg (environ $75 \mu\text{M}$)
Gélatine	14 feuilles (environ 26 g)

Nous utilisons ici un moule semi-rigide dans lequel une demi-boule a été creusée. Les différentes étapes de fabrication d'un tel fantôme optique sont présentées figure 2.13, ainsi que le résultat final obtenu ; le procédé de réalisation avec la gélatine est inspiré des travaux de Frangioni *et al.* [De Grand 06].

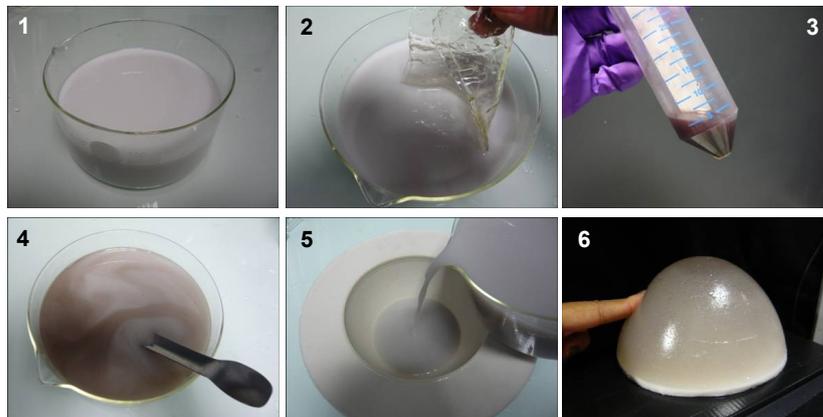


FIGURE 2.13: Exemple de réalisation d'un fantôme de sein. 1) solution eau + intralipide + encre, 2) ajout de gélatine alimentaire, 3) préparation de 25 mg de PPIX dissolue dans de l'éthanol pur pour spectroscopie, 4) ajout de la PPIX dans la solution d'intralipide et encre, 5) remplissage du moule, et mise au frais, 6) résultat.

2.2.2 Expérimentation *in vivo* sur souris

Comité d'éthique Les souris sont à ce jour un support indispensable pour acquérir des données réalistes, notamment en ce qui concerne l'autofluorescence. L'expérimen-

tation sur souris nécessite de réaliser un protocole précis et particulier à chaque expérience, soumis à l'accord d'un comité d'éthique. En annexe est présenté un exemple de protocole (cf. annexe E).

Toutes les expériences sur souris reposent néanmoins sur une même base : les procédures sont conformes aux directives de l'Union Européenne (réglementation n°86/609) et de la loi Française concernant l'expérimentation animale (décret 87/848). Tous les efforts possibles sont mis en place pour minimiser les souffrances de l'animal. La manipulation des souris s'effectue avec des outils stériles et approuvés par le comité d'utilisation et de soins des animaux de Grenoble (enregistrement n°20_iRTSV Léti-FNG-02).

Soins administrés Des souris femelles adultes **nude** (Janvier, Le Genest saint-isle, France) sont utilisées pour nos expériences. Elles sont placées dans des équipements appropriés, à $21\pm 1^\circ\text{C}$ sous éclairage diurne. Enfin les souris arrivent sur place deux semaines avant les campagnes expérimentales, et ont toujours libre accès à la nourriture et l'eau.

Anesthésie La plupart du temps pour nos expériences *in vivo*, les souris sont anesthésiées à l'isoflurane par voie gazeuse (4% pour l'induction, 2% pour le maintien). Pendant l'anesthésie, les souris sont maintenues à une température appropriée (plaque chauffante à environ 37°C).

Implantation de tumeurs L'implantation de tumeurs est effectuée par les biologistes plusieurs jours avant la campagne d'expérimentations : le protocole est décrit en annexe (cf. annexe E).

2.2.3 Marqueurs fluorescents utilisés

Les marqueurs fluorescents que nous utilisons en expérimentation sont soit placés dans un capillaire en verre (4 cm de long environ, et 1 mm de diamètre), soit directement injectés au petit animal. Les capillaires, contenant en général environ $5\ \mu\text{l}$ de fluorophore, sont introduits dans un fantôme ou placés sur une souris pour simuler une cible biologique marquée. Les injections sur petit animal sont en général effectuées en intraveineuse de façon à ce que les marqueurs s'accumulent autour de la cible biologique, plus rarement en sous-cutané. Pour les expérimentations de cette thèse, deux types principaux de fluorophores ont été utilisés, et sont décrits dans les paragraphes suivants : l'Indocyanine Green (ICG) (soit «libre», soit encapsulé dans des nanoparticules pour former des ICG-LNP) et l'IRDye800 (LI-COR) , ici greffé à des RAFT-(cRGD)₄ (Angiostamp, Fluoptics).

L'Indocyanine Green (ICG) L'ICG est un candidat approprié pour l'imagerie optique de fluorescence puisqu'il émet dans les longueurs d'onde de la fenêtre thérapeutique (cf. figure 1.17 du chapitre 1) comme nous l'avons présenté dans le premier chapitre. De plus, cet agent de contraste hydrosoluble bénéficie d'ores et déjà d'une autorisation d'injection de la FDA. Cependant, l'ICG est une molécule instable en

solution aqueuse, susceptible d'être dégradée ou de former des agrégats aux propriétés optiques très différentes de celles pour lesquelles elle aurait été choisie au départ [Desmettre 00, Saxena 03]. L'ICG a également le défaut, une fois injecté, de se lier rapidement et de manière non spécifique à des protéines plasmatiques, et de voir une fois de plus ses propriétés optiques modifiées. Enfin, les possibilités de greffer l'ICG à des ligands spécifiques pour le ciblage d'une zone d'intérêt se révèlent être très limitées.

Les nanoparticules lipidiques chargées en ICG Afin de palier aux faiblesses de l'ICG que nous venons de présenter, la stratégie du laboratoire du SBSC/LFCM au CEA a été d'encapsuler de l'ICG dans des nano-particules organiques, elles-mêmes développées au sein de cette équipe [Navarro 09]. Les nano-émulsions qui font fonction de vecteurs, sont des nano-particules organiques correspondant à la dispersion de gouttelettes d'huile (voir figure 2.14) de taille nano-métrique dans un solvant liquide. Chaque gouttelette d'huile est composée d'un corps huileux qui correspond à un mélange d'huiles bio-compatibles d'origine végétale et/ou synthétiques (l'huile de soja par exemple), et d'une cire (glycérides semi-synthétiques). Les nanoparticules peuvent contenir divers types de fluorophores. Dans notre cas, les nanoparticules sont donc chargées en ICG pour former les ICG-LNP.

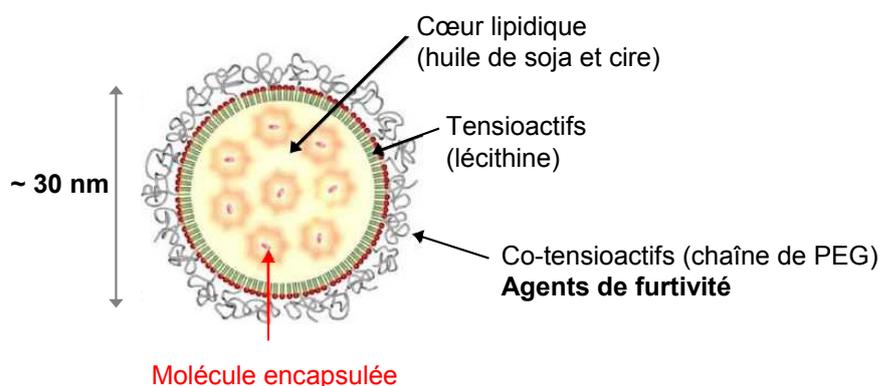


FIGURE 2.14: Schéma récapitulatif d'une gouttelette d'huile dans le système de nano-émulsion (d'après [Navarro 09]).

Il a été vérifié que cette nouvelle formulation confère à l'ICG une plus grande stabilité en solution injectable (soit saline, ou tampon phosphate salin) et de meilleures propriétés optiques, et que le nano-traceur permet une meilleure détection des tumeurs sur souris par imagerie optique de fluorescence. En effet, en comparaison à l'ICG non encapsulé (dit libre), le rendement quantique des ICG-LNP est environ deux fois meilleur que celui de l'ICG, et très stable dans le temps (plus de 40 jours, à condition de garder le fluorophore à l'abri de la lumière). Les courbes d'absorption et de fluorescence de l'ICG et des ICG-LNP sont présentées figure 2.15 : lorsque l'ICG est encapsulé, son pic d'absorption est décalé dans le rouge d'environ 20 nm (cf. figure 2.15-A) et son pic de fluorescence se situe à 820 nm (804 nm pour l'ICG libre). Il est connu que le pic d'absorption de l'ICG est susceptible de se décaler dans le rouge lorsque son milieu environnant est modifié. Dans le cas des ICG-LNP, Navarro *et al.* [Navarro 09] émettent

l'hypothèse que l'ICG pourrait en partie être piégé à l'interface eau-huile dans la partie hydrophobe des phospholipides à cause de sa nature amphiphilique¹. Navarro *et al.* ont relevé que ce phénomène avait déjà été observé pour d'autres systèmes lipidiques dans les travaux de Baker, Devoisselle ou encore plus récemment Yuan [Baker 66, Devoisselle 98, Yuan 04].

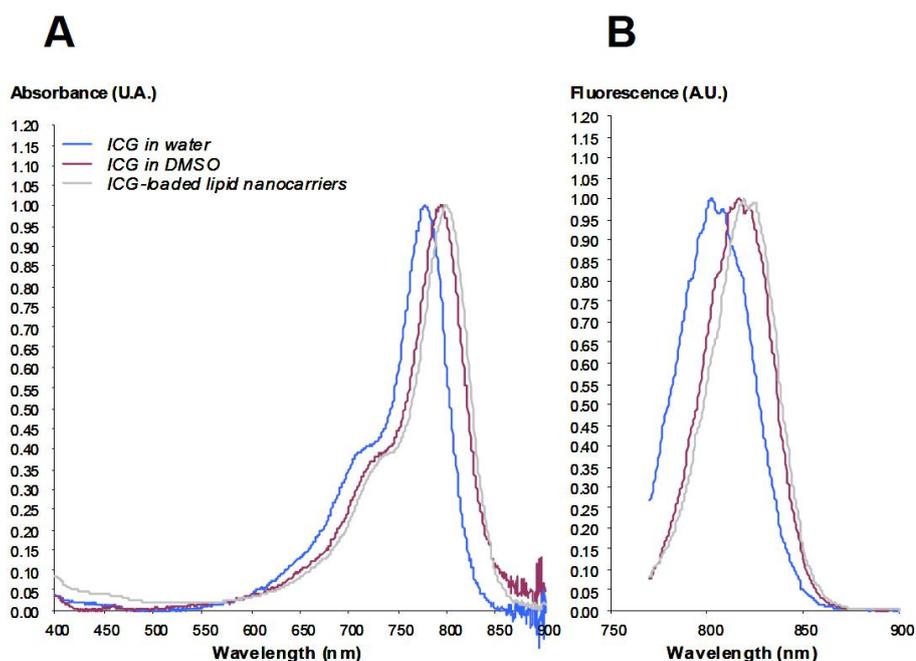


FIGURE 2.15: Spectres d'absorption (A) et de fluorescence (B) de l'ICG dans de l'eau, du DMSO ou encapsulé dans des nanoparticules (tiré de [Navarro 09]).

Les ICG-LNP possèdent une brillance améliorée, une stabilité dans le temps et un spectre d'émission dans le proche infrarouge qui font d'elles un fluorophore particulièrement adapté à l'imagerie optique de fluorescence.

Enfin ces marqueurs sont éliminés du corps **par voie entéro-hépatique**, et transitent donc par le foie et les intestins (des études comparées de la concentration du fluorophore dans la circulation arrivant et repartant de divers organes ont montré que la captation était négligeable au niveau des reins, des poumons et du liquide céphalo-rachidien). La détection d'un signal non négligeable des marqueurs principalement au niveau des intestins et du foie est donc à prévoir en expérimentation *in vivo*.

Les caractéristiques de IICG(SERB) utilisé en expérimentation sont décrites en annexe F.

Les vecteurs RAFT-(cRGD)₄ Pour une plus grande spécificité aux modèles de tumeurs utilisés en expérimentation en collaboration avec l'Institut Albert Bonniot (IAB) de Grenoble, nous utilisons également des vecteurs de type RAFT-(cRGD)₄

1. Une espèce chimique est dite amphiphile lorsqu'elle possède à la fois un groupe hydrophile et un groupe hydrophobe.

(AngioLone, Fluoptics) : les peptides RGD (abréviation pour acide Arginine-Glycine-Aspartic) reconnaissent spécifiquement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ surexprimée par certaines tumeurs cancéreuses, ou par le mécanisme de néo-angiogenèse² associé à la croissance de tumeurs cancéreuses [Beer 08, Schottelius 09, Garanger 05, Foillard 08]. L'utilisation du Regioselectively Addressable Functionalized Template (RAFT) permet de fixer un fluorophore sur une face de la matrice, et les 4 peptides RGD de l'autre pour éviter l'encombrement stérique³(cf. schéma figure 2.16).

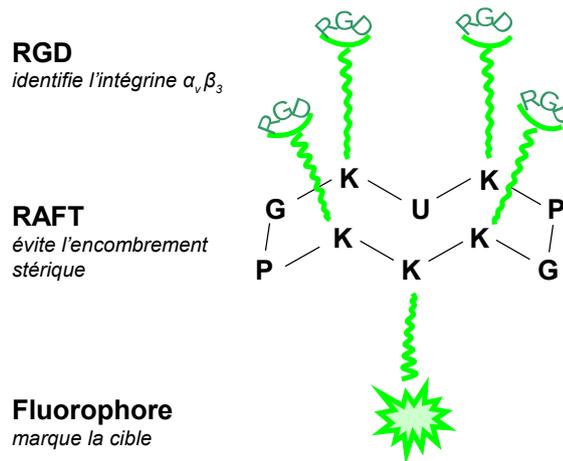


FIGURE 2.16: Schéma de structure RAFT-(cRGD)₄ pour la vectorisation en cancérologie, à laquelle un label fluorescent est greffé (inspiré de [Foillard 08] et [Boturyn 04]).

Aux RAFT-(cRGD)₄ peuvent être greffés divers fluorophores. Pour une longueur d'onde d'émission intéressante, nous avons dans notre cas utilisé de l'IRDye800 (LI-COR). Les courbes d'absorption et d'émission obtenues sont présentées figure 2.17.

Ce marqueur est éliminé du corps par voie urinaire, et transite donc par les reins et la vessie ; en expérimentation, nous observerons effectivement une forte fluorescence au niveau des reins de l'animal où le marqueur s'accumule massivement (en général plus que dans la tumeur) et une fluorescence plus faible identifiée au niveau de la vessie.

2.3 Simulations : exemple du sein

Enfin, pour compléter les supports d'études sur lesquels tester notre algorithme de séparation de spectres, nous présentons dans cette partie les simulations mises en place sous Matlab. Les simulations permettent de travailler sur des données théoriques ou cliniques d'absorption et de diffusion plus précises et contrôlables que celles obtenues en pratique sur fantôme optique. Nous proposons ici un cas d'étude du sein, dont la théorie est directement tirée de la bibliographie sur le sujet.

2. L'angiogenèse est un processus décrivant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants.

3. On parle d'encombrement stérique lorsque le volume occupé par une partie d'une molécule gêne l'approche d'un réactif ou d'une autre partie de la molécule.

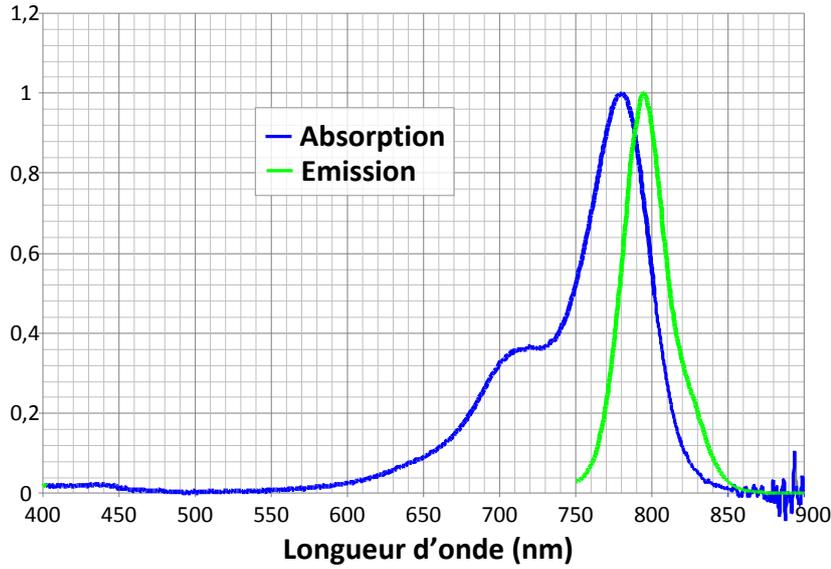


FIGURE 2.17: Spectres d'absorption et de fluorescence de l'IRDye800 (LI-COR) greffé à des RAFT-(cRGD)₄ (AngioLone, Fluoptics).

2.3.1 Théorie

Plusieurs résultats publiés d'expérimentations cliniques nous ont permis de concevoir une simulation d'étude du sein avec des propriétés optiques réalistes. Un milieu autofluorescent est considéré, et une tumeur marquée à détecter dans ce milieu est simulée. En considérant la théorie de la propagation de la lumière dans les tissus, nous sommes alors capables de simuler la décroissance de l'intensité des marqueurs selon la profondeur à laquelle la tumeur se situe dans les tissus.

Paramètres optiques En 2001, Cerussi *et al.* ont mené une campagne de mesures de propriétés optiques du sein sur 28 patientes saines [Cerussi 01], et obtenu des coefficients moyens de diffusion et d'absorption dépendant de la longueur d'onde et classés en deux groupes, pro- ou post-ménopause. À partir de ces résultats, nous avons défini à notre tour des valeurs d'absorption μ_a (en cm^{-1}) et de diffusion réduite μ_s' (en cm^{-1}) moyennes à utiliser dans notre simulation (voir figure 2.18).

Propagation de la lumière Nous avons présenté dans le premier chapitre la théorie de la propagation de la lumière dans les tissus. Nous utilisons directement les résultats que nous avons obtenus pour notre exemple : afin de simuler la perte de signal des marqueurs fluorescents avec la profondeur de tissus traversée et pour estimer le contraste entre les marqueurs et l'autofluorescence des tissus, l'approximation de la diffusion est considérée. Rappelons que pour le cas d'un milieu homogène (hypothèse envisageable pour le cas du sein) et sous illumination continue, la densité de photons ϕ (en $W.m^{-2}$) satisfait l'équation différentielle suivante :

$$\Delta\phi(r) - k(\lambda)^2\phi(r) = -\frac{S(r)}{D(\lambda)} \quad (2.1)$$

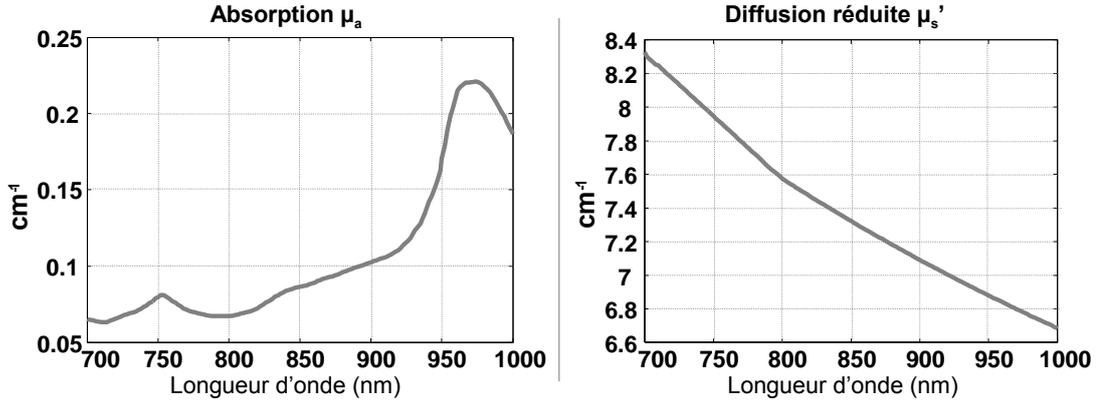


FIGURE 2.18: Coefficients d'absorption et de diffusion réduite simulées pour l'exemple du sein (d'après [Cerussi 01]).

où r est la position du groupe de marqueurs dans le milieu, D est le terme de diffusion $D = 1/(3(\mu_a + \mu_s'))$, et k est défini par $k = \sqrt{\frac{\mu_a}{D}}$; enfin S représente le terme source.

θ est solution de cette équation sous les hypothèses décrites. Même si l'hypothèse du milieu infini ne satisfait pas notre exemple, elle a l'avantage de conduire à une solution analytique connue de l'équation de diffusion. Cela nous permet de décrire le comportement de l'intensité de fluorescence ou des distorsions du spectre de fluorescence des marqueurs selon leur profondeur. Une telle hypothèse pourrait être gênante pour une étude plus précise, surtout concernant les effets de bord du milieu. Ici l'approximation est suffisante, et la solution θ pour un terme de source supposé impulsionnel (modélisé par un Dirac : $S(r) = \delta(r)$) est utilisée :

$$\theta = \frac{\exp(-k(\lambda)r)}{4\pi D(\lambda)r} \quad (2.2)$$

Les paramètres optiques des tissus du sein sont responsables de la modification du spectre de fluorescence des marqueurs : après avoir été excités, les marqueurs émettent des photons qui se propagent dans le sein en suivant l'équation de la diffusion rappelée ci-dessus pour finalement atteindre les détecteurs, comme schématisé figure 2.19.

Le spectre d'émission des marqueurs fluorescents détecté $S_d(\lambda)$ varie du spectre de fluorescence *in vitro* de référence des marqueurs $S(\lambda)$ après traversée des photons ré-émis dans le milieu :

$$S_d(\lambda) \propto \underbrace{\frac{\exp(-k^{exc}r_{sm})}{4\pi D_{exc}r_{sm}}}_{\text{constante}} S(\lambda) \times \frac{\exp(-k(\lambda)r_{md})}{4\pi D(\lambda)r_{md}} \quad (2.3)$$

où r_{sm} la distance entre la source et les marqueurs fluorescents, r_{md} est la distance entre les marqueurs fluorescents et les détecteurs, $k^{exc} = \sqrt{\frac{\mu_a(\lambda_{exc})}{D_{exc}}}$ et D_{exc} est le coefficient de diffusion à la longueur d'onde d'excitation λ_{exc} .

Nous pouvons maintenant simuler le comportement spectral des marqueurs et leur rapport au signal d'autofluorescence en fonction de leur profondeur dans les tissus. Dans

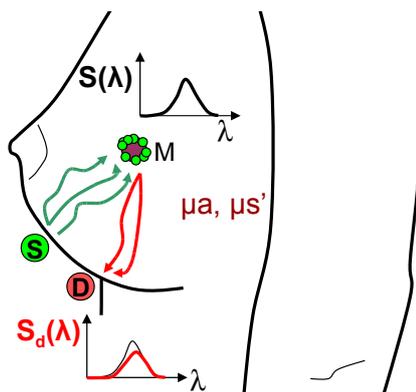


FIGURE 2.19: *Propagation dans le sein : distorsion du spectre reçu sur le détecteur après traversée dans les tissus absorbants et diffusants.*

le paragraphe suivant nous proposons un exemple de simulation d'un sein autofluorescent dans lequel une tumeur marquée est placée jusqu'à 10 cm de profondeur dans les tissus.

2.3.2 Exemple

La simulation que nous utilisons propose d'analyser un signal de fluorescence spécifique de marqueur, en comparaison au signal d'auto fluorescence du sein. Le ratio entre les tissus sains, et la tumeur marquée dépend du choix des biomarqueurs. Comme présenté dans le chapitre 1, la littérature propose un éventail de valeurs de ratios, de 3 pour des marqueurs non spécifiques aux cibles biologiques à 180 pour des marqueurs spécifiques activables [Jin 07, Urano 08, Weissleder 99, Razkin 06]. Pour notre simulation, une valeur raisonnable de ratio tumeur-tissu sain de 10 est choisie, pour une tumeur à 1 mm de profondeur dans les tissus.

Enfin, les distributions spatiales de l'auto fluorescence et de la fluorescence spécifique sont définies. En premier lieu, un milieu autofluorescent, avec un spectre d'émission propre, est considéré (voir figure 2.20-a : dans ce milieu, une tumeur supposée marquée par des marqueurs fluorescents qui émettent un spectre distinct de celui de l'auto fluorescence, est placée à différentes profondeurs dans l'organe. La figure 2.20-b présente la tumeur, sa distribution spatiale et le spectre d'émission de référence associé. Enfin, la figure 2.20-c représente les données une fois mélangées, soit la simulation de la tumeur marquée dans le milieu autofluorescent. La valeur de contraste $c_{T,N}$ entre la tumeur marquée (zone T) et les tissus sains (zone N) sera l'outil privilégié utilisé pour quantifier la détection et la localisation.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à présenter dans un cadre très général les simulations sur lesquelles nous avons travaillé. Les données présentées ci-dessus sont juste un exemple de simulation, et peuvent être adaptées pour des ratios tumeur-tissus sains différents, pour simuler plusieurs tumeurs, à différentes profondeurs (de tels cas sont présentés par la suite) et localisations. De plus, on pourrait également simuler un signal non spécifique (marqueurs qui ne se sont pas fixés à la cible biologique), ce

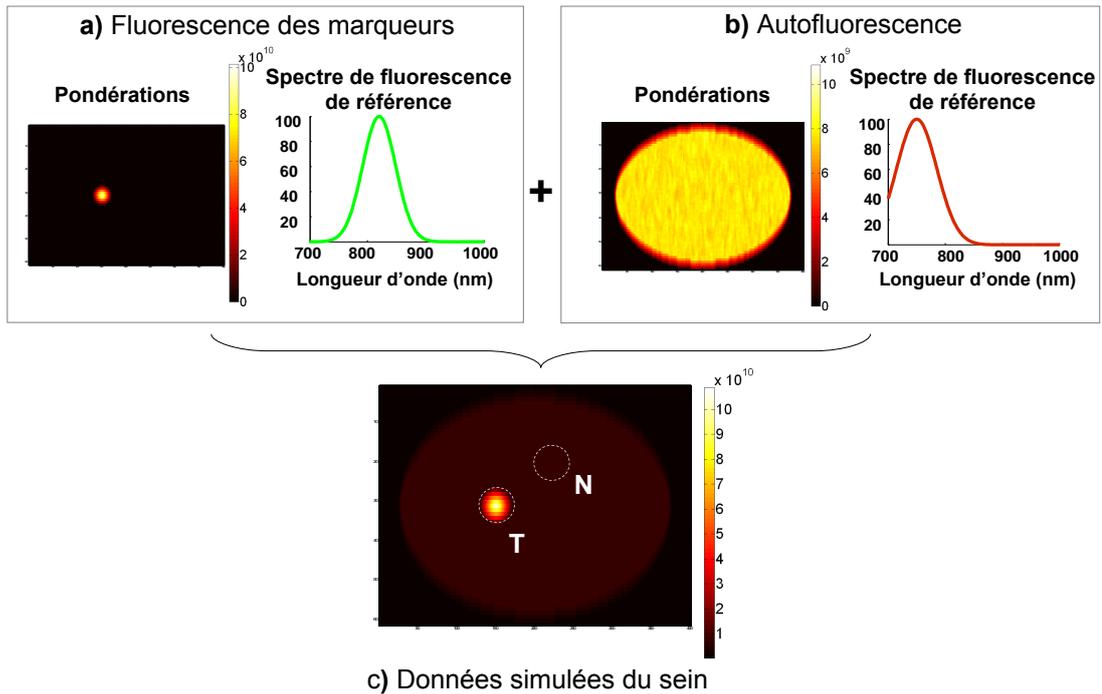


FIGURE 2.20: Données de sein simulées sous Matlab : nous analysons le comportement d'une tumeur marquée par des marqueurs dont le spectre de fluorescence de référence est connu (b) en fonction de sa profondeur dans un milieu autofluorescent qui émet un spectre de fluorescence de référence lui aussi connu (a). Les données mélangées (c) d'autofluorescence et de fluorescence serviront de support pour l'étude de l'algorithme de séparation de spectres.

qui n'a pas été fait pour cet exemple : les marqueurs sont supposés très spécifiques (ou activables) et donc localisés uniquement près de la tumeur pour simplifier la simulation.

Bilan du chapitre

Ce chapitre présente le dispositif expérimental mis en place au début de la thèse, détaille les différents éléments utilisés et justifié le choix de la longueur d'onde d'excitation choisie. Le spectromètre monté permet de mesurer les spectres de fluorescence en chaque point d'un objet scanné, du fantôme optique au petit animal.

Bien que l'étude du phénomène d'autofluorescence *in vivo* requière l'acquisition de données sur modèles vivants (ici des souris), d'autres outils ont quant à eux permis de tester l'algorithme de séparation de spectres. Des fantômes optiques, dont les propriétés optiques se rapprochent de celles des tissus biologiques (par exemple des propriétés du sein) ont été largement utilisés dans cette étude ; le détail des éléments constituants utilisés et un exemple de réalisation ont été proposés. Pour l'expérimentation *in vivo* sur souris, la rédaction de protocoles précis soumis à un comité d'éthique est obligatoire : les outils d'anesthésie pour le petit animal, ainsi que les modes opératoires ont été abordés. Nous présentons également dans ce chapitre les deux principaux fluorophores que nous avons été amenés à utiliser, à savoir les ICG-LNP et l'IR dye 800 couplé à des vecteurs

RAFT-(cRGD)₄.

En parallèle des expérimentations, des tests sur simulation Matlab ont également été menés pendant la thèse, notamment pour valider l'implémentation de notre méthode de séparation de spectres. Nous avons choisi de simuler la détection de cancers du sein en nous appuyant sur les données optiques de cet organe décrits dans plusieurs études cliniques sur le sujet. Nous reprenons la théorie de la propagation des photons pour en déduire l'allure des spectres de fluorescence mesurés en fonction de leur profondeur dans les tissus. Ces simulations nous permettront de tester les algorithmes de séparation de spectres sans passer systématiquement par la mise en place d'expérimentations animales ou sur fantômes, et de tester beaucoup plus de situations (différentes profondeurs des marqueurs, et différentes propriétés optiques du milieu) que sur données réelles.

Le chapitre suivant examine le comportement spectral de l'autofluorescence des tissus biologiques (cas de la souris) et des marqueurs fluorescents présentés dans ce chapitre, en fonction de leur milieu d'accueil, ou encore des conditions d'expérimentation.

CHAPITRE 3

Étude du comportement spectral de l'autofluorescence et des marqueurs : vers la séparation de source aveugle

Nous proposons dans ce chapitre d'étudier le comportement spectral de l'autofluorescence et des marqueurs fluorescents que nous utiliserons en expérimentation.

La détection d'un signal d'autofluorescence dans les gammes du rouge et proche infrarouge est encore un problème nouveau, et les fluorophores responsables du signal d'autofluorescence observé dans ces gammes de longueur d'onde ne sont pas clairement identifiés. Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer l'origine du signal mesuré *in vivo* sur notre système.

Enfin le chapitre examine l'évolution du signal de fluorescence des tissus et des marqueurs injectés suivant le temps d'exposition, l'intensité lumineuse, le milieu d'accueil ou encore la profondeur des marqueurs. La connaissance plus poussée des fluorophores et de leur comportement *in vivo* permettra de choisir une méthode de séparation de spectres appropriée pour l'étape d'élimination de l'autofluorescence.

Sommaire

3.1	Fluorescence naturelle des tissus	67
3.1.1	Autofluorescence dans le visible	67
3.1.2	Autofluorescence dans le proche infrarouge	68
3.2	Origine de l'autofluorescence dans le rouge	70
3.2.1	Origine exogène	71
3.2.2	Origine endogène	73
3.3	Comportement spectral de l'autofluorescence	77
3.3.1	Variation des spectres	77
3.3.2	Influence de l'illumination	79
3.4	Comportement spectral des marqueurs	81
3.4.1	Influence du milieu sur les marqueurs	81
3.4.2	Influence du système expérimental	85

3.1 Fluorescence naturelle des tissus

L'étude de la fluorescence naturelle des tissus biologiques, ce que nous appelons l'autofluorescence, dans les gammes du visible s'est développée depuis déjà une vingtaine d'années, notamment dans le diagnostic du cancer [Hung 91]. Cependant le problème de l'autofluorescence des tissus dans la gamme de longueur d'onde qui nous intéresse (700–1000 nm) n'a pas bénéficié du même intérêt : peu de recherches sur le sujet ont été menées, et l'origine de l'autofluorescence reste mal connue. Les avancées de l'imagerie optique de fluorescence vers le diagnostic clinique pose le problème de la détection de marqueurs en profondeurs et donc de l'élimination du signal d'autofluorescence. Nous proposons dans cette partie de revenir sur la détection d'autofluorescence dans le visible, pour ensuite nous pencher sur le problème de l'autofluorescence dans les gammes du rouge et proche infrarouge.

3.1.1 Autofluorescence dans le visible

La fluorescence naturelle des tissus, ou autofluorescence, n'est pas un phénomène nouveau : elle était déjà observée lors d'examen de tumeurs par Ghadially au début des années 60 [Ghadially 60]. Depuis une vingtaine d'années, l'autofluorescence des tissus est étudiée et plusieurs résultats l'ont pointée comme une mesure pertinente dans la détection de zones cancéreuses. L'étude de l'autofluorescence des tissus cancéreux a été étroitement liée à l'observation de l'autofluorescence des tissus sains [Harris 87, Onizawa 03]. Grâce aux nombreuses études sur le sujet, les principaux fluorophores endogènes des tissus biologiques sont identifiés (cf. figure 1.12 du chapitre 1) ; parmi eux figurent par exemple le NADH, la flavine, ou encore la chlorophylle. Dans les longueurs d'onde plus hautes, et plus particulièrement le rouge et le proche infrarouge, les fluorophores endogènes susceptibles d'émettre un signal de fluorescence sont beaucoup plus rares. En pratique, un signal de fluorescence naturelle dans ces gammes de longueurs d'onde est tout de même observé ; ce signal d'autofluorescence n'est cette fois plus source d'information, mais devient gênant pour la détection des marqueurs fluorescents injectés au patient.

3.1.2 Autofluorescence dans le proche infrarouge (700-1000 nm)

En imagerie optique, plusieurs équipes qui travaillent dans des longueurs d'ondes comparables à celles que nous avons choisies détectent systématiquement un signal d'autofluorescence des tissus biologiques sur leurs systèmes, que les tissus soient sains ou malades. Plusieurs hypothèses peuvent être amenées quant à l'origine de ce signal naturel. Parmi les fluorophores endogènes ou exogènes des tissus qui seraient susceptibles d'émettre un signal dans les longueurs d'onde qui nous intéressent, nous pouvons citer les porphyrines (parmi les molécules à cœur porphyrinique nous trouvons par exemple l'hémoglobine et ses dérivées ou la myeloperoxydase), les chlorines (par exemple la chlorophylle) ou encore les bactériochlorines (voir figure 3.1).

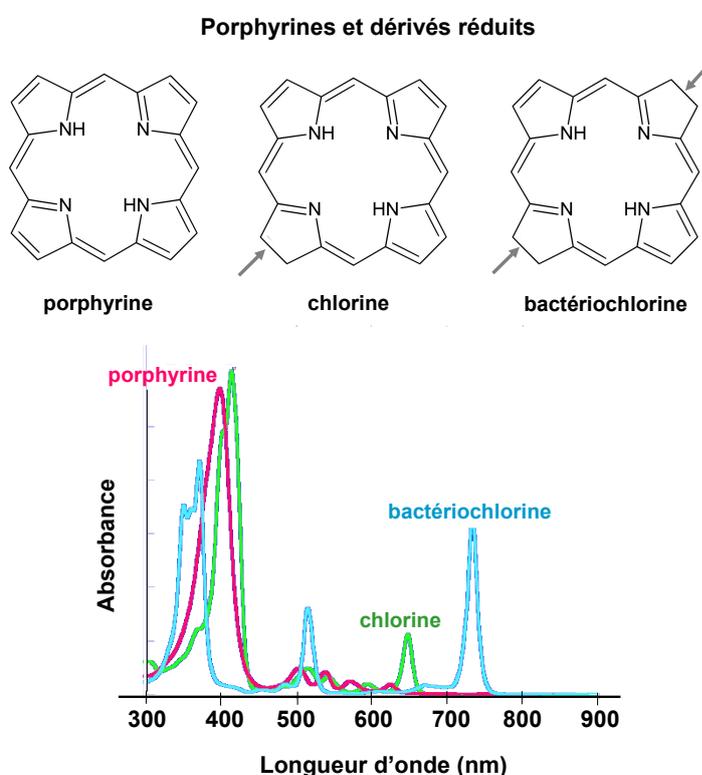


FIGURE 3.1: Formulations des porphyrines, chlorines et bactériochlorines, et leurs spectres d'absorbance (respectivement PP, mTHPC, et mTHPBC, tiré de http://www.genopole.fr/IMG/pdf/Brault_Atelier_Biophotonique_2010_3_diapos_par_page.pdf).

Bien que la faible absorbance des molécules porphyriniques dans le rouge ne semble pas appuyer notre hypothèse, divers dérivés de porphyrines et de chlorines présents dans les tissus ou dans l'alimentation sont susceptibles d'émettre un signal de fluorescence détecté par nos systèmes expérimentaux.

Les études cliniques en imagerie optique de fluorescence sont encore peu nombreuses et se penchent rarement sur le problème de l'autofluorescence ; l'imagerie du petit animal offre quant à elle plusieurs exemples d'acquisitions d'autofluorescence dans la gamme

700 – 1000 nm.

3.1.2.1 Exemples

Imagerie du petit animal La figure 3.2 présente une acquisition d'autofluorescence d'un rat sain acquise par l'équipe de Fournier *et al.*, à une longueur d'onde d'excitation égale à 670 nm [Fournier 06].

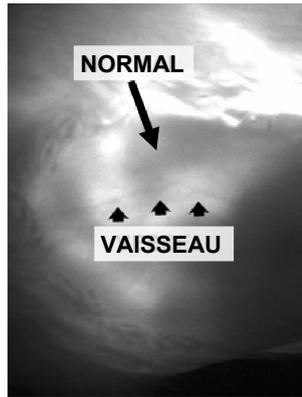


FIGURE 3.2: Image d'autofluorescence chez le rat, pour une excitation à 670 nm et une détection à 800 nm (tiré de [Fournier 06]).

Au sein de notre laboratoire (le Laboratoire d'Imagerie et de Systèmes d'Acquisition au LETI), il a été possible d'examiner des souris saines, non injectées, à l'aide d'une sonde peropératoire de longueur d'onde d'excitation à 785 nm (Fluobeam[®], Fluoptics). Nous distinguons sur la figure 3.3 qu'un signal de fluorescence est détecté sur tout l'animal, et plus particulièrement au niveau de l'estomac, et des intestins : la nourriture des souris est en effet connue pour fluorescer naturellement [Weagle 88, Bouchard 07] (Notons que les points fluorescents les plus intenses présents sur cette image correspondent à la présence de «points chauds» et ne correspondent pas à une mesure correcte de fluorescence¹).

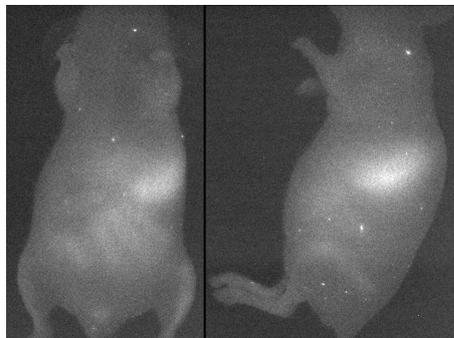


FIGURE 3.3: Autofluorescence d'une souris saine non injectée, acquise par sonde peropératoire (Fluobeam[®], Fluoptics) à une longueur d'onde d'excitation de 785 nm.

1. pixel défaillant, saturé, ou rayonnement cosmique.

Pour finir, les observations sur notre système expérimental confirment la détection de fluorescence naturelle des tissus sains au delà de 700 nm. La figure 3.4 présente l'acquisition de fluorescence obtenue sur notre dispositif sur une souris saine non injectée, pour une excitation à 690 nm. Une fois de plus, la zone de l'estomac émet un signal de fluorescence plus important, ainsi qu'un signal qui semble provenir du foie. Ce signal de fluorescence est certainement dû à des composants fluorescents dans la nourriture ingérée par l'animal, comme nous le détaillerons dans la partie suivante. Mise à part la zone abdominale, tous les tissus de l'animal émettent de la fluorescence détectée au delà de 700 nm, à une intensité moindre.

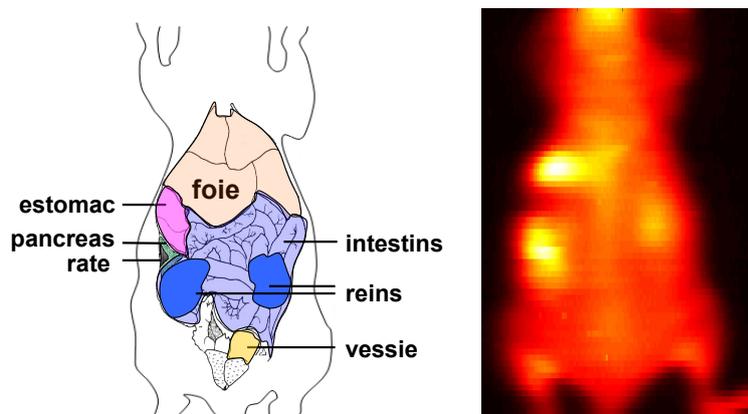


FIGURE 3.4: Anatomie de la souris et signal d'autofluorescence d'une souris saine (acquisitions sommées sur les longueurs d'onde), longueur d'onde d'excitation à 690 nm.

Imagerie du sein En clinique, Demos *et al.* proposent en 2005 [Demos 05] de mesurer l'autofluorescence d'échantillons de tissus post-chirurgie chez des patientes atteintes d'un cancer du sein. Ils comparent notamment dans ces travaux la fluorescence des tissus cancéreux, fibreux et adipeux. L'image 3.5 présente un exemple d'autofluorescence de tissus adipeux, pour une longueur d'onde d'excitation à 632,8 nm et une fenêtre d'émission entre 700 et 1000 nm.

Ces quelques exemples soutiennent l'hypothèse que les tissus biologiques émettent un signal d'autofluorescence même lorsque la longueur d'onde d'excitation se situe dans le rouge et le proche infrarouge. Si le phénomène d'autofluorescence a été observé au travers de divers exemples, son origine est quant à elle encore mal connue ; nous tenterons de mettre en avant quelques hypothèses pour y remédier.

3.2 Origine de l'autofluorescence dans le rouge : hypothèses

Bien que les fluorophores endogènes des tissus biologiques qui émettent de la fluorescence dans le visible soient globalement connus, il n'en est pas de même au delà de 700 nm.

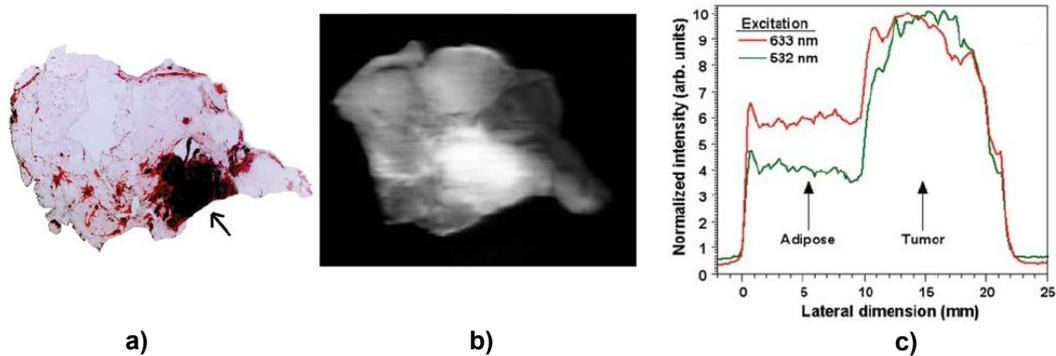


FIGURE 3.5: a) Échantillon de tissu mammaire, la flèche indique la tumeur (environ 4 cm par 3 cm, et 6 mm d'épaisseur) b) Image d'autofluorescence du tissu mammaire pour une excitation à 632,8 nm c) Profils d'intensité de l'image d'autofluorescence le long d'une ligne qui passe par le milieu de la tumeur (tiré de [Demos 05]).

L'imagerie optique de fluorescence s'est beaucoup intéressée à l'imagerie du petit animal où les épaisseurs de tissus à traverser sont de l'ordre de quelques centimètres seulement. L'autofluorescence est un phénomène observé pour ce type d'imagerie comme nous l'avons vu au travers de quelques exemples, mais le signal est souvent considéré comme négligeable face à la brillance suffisante des marqueurs injectés pour la détection des tumeurs.

Depuis peu, l'imagerie optique de fluorescence se dirige vers les applications cliniques, et les épaisseurs de tissus à traverser peuvent alors atteindre plusieurs centimètres. La forte absorption de certains organes (comme la prostate par exemple) complique encore la tâche. Ce sont dans ces cas problématiques que l'autofluorescence ne peut plus être considérée comme négligeable et perturbe la détection et la quantification de la fluorescence d'intérêt : alors que l'intensité des marqueurs fluorescents décroît exponentiellement avec la profondeur parcourue par la lumière, le signal constant d'autofluorescence devient rapidement un élément limitant à la détection des marqueurs. Une connaissance plus poussée de l'origine de l'autofluorescence permettrait de mieux gérer ce phénomène, et idéalement de supprimer le signal parasite qu'il engendre.

Nous proposons dans les paragraphes suivants quelques hypothèses sur son origine.

3.2.1 Origine exogène

3.2.1.1 Fluorescence des aliments

De nombreux travaux, et nos propres observations, ont pointé le problème de la fluorescence de la nourriture ingurgitée par les souris dans les examens *in vivo*. Weagle *et al.* observent dès 1988 un signal de fluorescence dans l'estomac de la souris, avec un pic d'émission à 674 nm, et l'attribuent à des chromophores présents dans la nourriture de l'animal, qui seraient la phéophorbide a et/ou la phéophytine a, des produits de dégradation de la chlorophylle a [Weagle 88].

Les recherches du groupe LI-COR sur l'alimentation des animaux de laboratoire

concluent également sur la présence non négligeable de chlorophylle dans plusieurs composants à base de végétaux dans la nourriture pour petit animal (cf. « Application Note, *in vivo* Animal Imaging Diet Considerations » sur le site <http://biosupport.lico.com/support>).

La chlorophylle présente dans l'alimentation serait alors une des premières causes d'autofluorescence des tissus dans le rouge et proche infrarouge. En effet, la chlorophylle possède plusieurs pics d'absorption dans le rouge, un pic d'émission vers 675 – 685 nm et fluoresce après 700 nm. Nous proposons en exemple sur la figure 3.6 les spectres d'absorption et de fluorescence de la chlorophylle *a*.

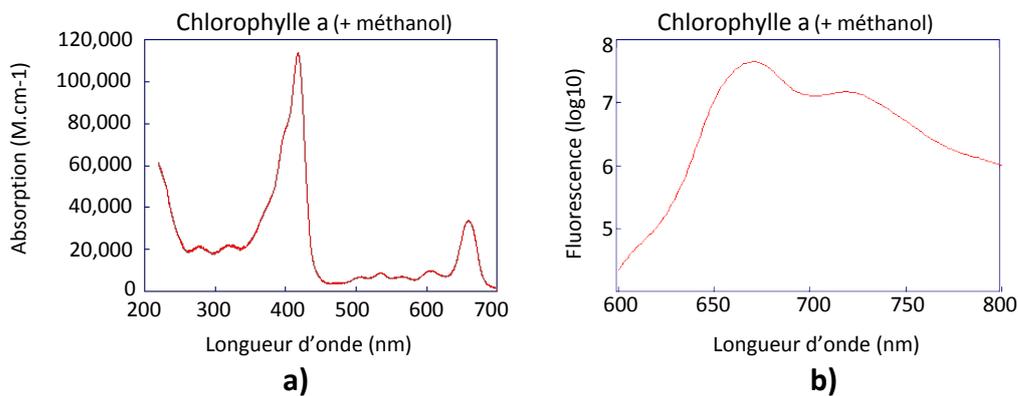


FIGURE 3.6: a) Spectre d'absorption, b) Spectre de fluorescence de la chlorophylle *a* (tiré de *omlc.orgi.edu*).

Mise à part la chlorophylle, d'autres composants présents dans l'alimentation sont susceptibles d'émettre un signal de fluorescence dans les longueurs d'onde qui nous intéressent. Le groupe LI-COR a étudié plusieurs régimes alimentaires pour animaux de laboratoire, provenant des groupes Harlan Teklad, Research Diets ou encore Purina LabDiet. Suivant le régime alimentaire testé, l'autofluorescence des tissus de l'animal s'est avérée plus ou moins intense. En faisant le lien avec les composants présents dans chaque régime, LI-COR met en avant les fluorophores potentiels suivants : la luzerne, le soja, le maïs, le blé, ou encore la farine de poisson.

Régimes alimentaires purifiés Pour éviter toute autofluorescence parasite provenant des intestins et de l'estomac de l'animal en imagerie optique *in vivo*, l'équipe de Funovics *et al.* prescrit un régime sans chlorophylle aux souris à imager, au moins 7 jours avant la campagne d'expérimentations [Funovics 04]. D'après leurs observations, cette étape permet naturellement de diminuer le signal d'autofluorescence dans la région abdominale de l'animal. Au cours d'expériences similaires pour le groupe CRI, MacLaurin *et al.* soulignent qu'un tel régime appauvri en chlorophylle atténuerait également l'autofluorescence des tissus sur toute la surface de l'animal [MacLaurin 06]. Ce dernier résultat est confirmé par les études de LI-COR : en plaçant une souris sous un régime appauvri en chlorophylle sur une semaine, leurs équipes ont vu l'autofluorescence des intestins de l'animal comme l'autofluorescence sur tout le corps de l'animal diminuer au cours de la semaine (voir l'exemple figure 3.7). Enfin des régimes appauvris en luzerne

(Harlan Teklad, TD97185 non-irradié et TD97184 irradié par exemple [Troy 04] pour des études du groupe Caliper/Xenogen) ont été testés de façon similaire, et ont permis de diminuer la contribution du signal d'autofluorescence sur les acquisitions *in vivo*.

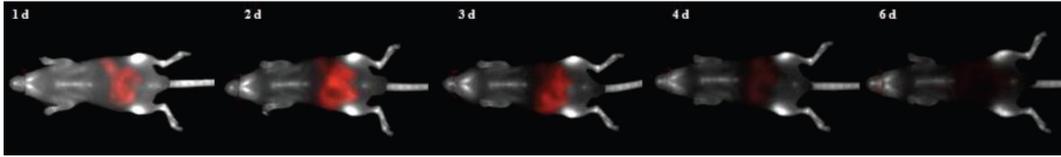


FIGURE 3.7: Exemple de souris passant d'un régime alimentaire classique à un régime alimentaire purifié : acquisitions journalières sur 6 jours (Pearl[®] Imager, LI-COR). La fluorescence de l'alimentation est marquée en rouge, et les os sont marqués en échelle de gris (IRDye[®] 800CW BoneTag, LI-COR). Tiré de <http://biosupport.lico.com/support>

Bilan Sur ces expérimentations, la contribution de la fluorescence des aliments est clairement mise en cause. En pratique, nous observons toujours sur nos données un signal de fluorescence plus fort au niveau de l'abdomen de l'animal, ce qui semble conforter les résultats précédents. En expérimentation *in vivo* sur souris, la mise en place de régimes purifiés permettant de limiter l'autofluorescence de l'alimentation a permis de fortement atténuer la détection d'un signal parasite sur tous les tissus de l'animal. Malgré ces progrès, la plupart des équipes (LI-COR, Funovics *et al.* [Funovics 04], MacLaurin *et al.* [MacLaurin 06]) qui ont mené ce type d'expériences relatent la présence d'un signal autofluorescent que le régime purifié n'a pu supprimer.

Aucune hypothèse n'est faite sur l'origine de cette autofluorescence résiduelle. L'autofluorescence des aliments n'est peut-être pas entièrement supprimée, ou nous pouvons également imaginer que d'autres fluorophores, exogènes ou endogènes qui ne proviennent pas de composants de l'alimentation peuvent contribuer à l'émission d'autofluorescence des tissus.

Toutefois, les fluorophores endogènes susceptibles d'émettre un signal de fluorescence dans les longueurs d'onde du rouge et du proche infrarouge sont peu nombreux, voire inexistantes (cf. principaux fluorophores endogènes de la figure 1.12 du chapitre 1). Nous proposons quelques hypothèses dans le prochain paragraphe quant à la mise en cause de tels fluorophores dans l'émission d'autofluorescence des tissus.

3.2.2 Origine endogène

Nous proposons dans cette partie une discussion sur la présence de fluorophores dans les tissus qui pourraient être responsables de la détection d'autofluorescence dans le rouge.

3.2.2.1 Fluorophores endogènes à émission dans le rouge

Parmi les grandes familles de fluorophores endogènes, la seule qui semble susceptible d'émettre de la fluorescence dans la gamme 700 – 1000 nm est la famille des porphyrines

(cf. figure 1.12 du chapitre 1). Le spectre d'absorption des porphyrines s'étend au-delà de 670 nm [Fournier 06] et les porphyrines peuvent émettre dans une large bande (600–800 nm) [Harris 87]. Mais l'absorption à 690 nm – longueur d'onde que nous utilisons sur notre système – est très faible, voire inexistante, ce qui handicape fortement cette hypothèse (voir figure 3.8).

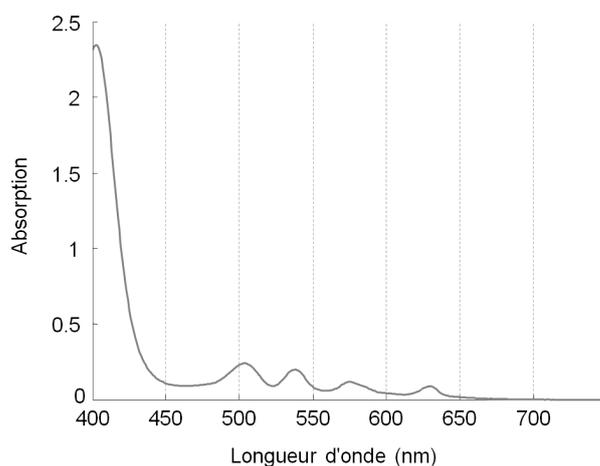


FIGURE 3.8: Spectre d'absorption de la PPIX (mesure spectrophotomètre Cary, Varian).

A part des enzymes défectueuses, plusieurs micro-organismes sont capables de produire des porphyrines endogènes [König 94]. Certaines bactéries ont notamment la capacité de synthétiser des porphyrines fluorescentes qui pourraient alors être détectées par des mesures sensibles d'autofluorescence dans le rouge et proche infrarouge [Dolphin 78, König 94]. Ainsi, les bactéries *Propionibacteria acnes*, contenues dans la flore normale de la peau humaine [Gillenwater 98], apparaissent aptes à produire des porphyrines fluorescentes [König 92, König 94]. L'équipe de König *et al.* reste tout de même prudente, et adoucit cette hypothèse en précisant que la concentration de porphyrines dans les cellules et tissus est alors très faible [König 94]. D'autres travaux rapportent la détection d'un signal de fluorescence dans le proche infrarouge sur bactéries, et mettent notamment en avant la présence de bactériochlorophylles [Albrecht-Buehler 7] de la famille des chlorines et bactériochlorines dont nous avons parlé précédemment (voir figure 3.1).

Dans les porphyrines des tissus susceptibles d'émettre de la fluorescence, certains travaux pointent plus particulièrement la protoporphyrine IX (PPIX). En 2001, Billinton *et al.* mesurent sur tissus sains un pic d'émission de fluorescence à 635 nm, longueur d'onde caractéristique de la PPIX [Billinton 01]. En 1999, Inaguma *et al.* affirmaient de leur côté qu'une petite quantité de PPIX est naturellement contenue dans le sang et les tissus biologiques [Inaguma 99].

Expérience En début de thèse, nous avons eu la possibilité d'utiliser sur notre dispositif expérimental un laser d'excitation à 532 nm. Afin de creuser l'hypothèse de la présence de PPIX dans les tissus biologiques, nous avons mesuré l'autofluorescence de deux souris saines et le spectre de fluorescence d'un échantillon de PPIX (Sigma

Aldrich) pour une même excitation à 532 nm. Les spectres qui ont été obtenus sont présentés figure 3.9 : le pic caractéristique de la PPIX à 635 nm se retrouve sur les spectres d'autofluorescence des souris.

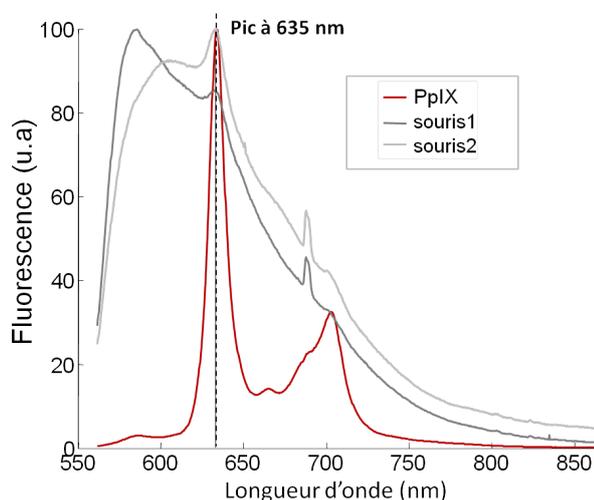


FIGURE 3.9: Comparaison du spectre d'émission de la PPIX (mesure sur notre dispositif expérimental) et des spectres d'autofluorescence de deux souris saines, pour une excitation à 532 nm.

Bien que cette expérience semble souligner les résultats de Billinton *et al.*, nous ne pouvons conclure quant à la contribution de porphyrines dans les spectres d'autofluorescence après 700 nm, et pour une excitation dans le rouge à 690 nm. En plus de ne pas pouvoir valider la présence de PPIX dans les tissus, l'absorption de cette porphyrine est également quasiment nulle à 690 nm (voir figure 3.8).

Aucune conclusion ne peut être proposée sur la présence de fluorophores endogènes fluorescents, en particulier de porphyrines capables d'émettre un signal de fluorescence dans le rouge et proche et infrarouge, les expérimentations menées ne nous ayant pas permis d'être fixés sur ce point.

Création de photoproduits fluorescents Enfin, nous pouvons également émettre l'hypothèse que l'illumination de l'échantillon analysé pourrait être responsable de la formation de photoproduits fluorescents dans notre gamme de longueur d'onde observée.

En 2001, sur une campagne d'expérimentation pour la photothérapie dynamique, Juzenas *et al.* ont observé la fluorescence de la PPIX injectées au souris pour une excitation à 635 nm. Ils ont plus particulièrement constaté le photoblanchiment de la PPIX et la formation de photoproduits fluorescents causée par l'illumination laser. D'après l'analyse des spectres des photoproduits, Juzenas avait alors supposé que le photoproduit principal créé était la chlorine photoprotoporphyne (PPP), qui présente un pic d'émission à 675 nm. La création de chlorines et bactériochlorines après illumination de porphyrines peut s'expliquer de la façon suivante : l'illumination laser serait responsable de la saturation successive d'une double liaison des porphyrines, générant alors des chlorines (voir schéma 3.10)[Brault 01].

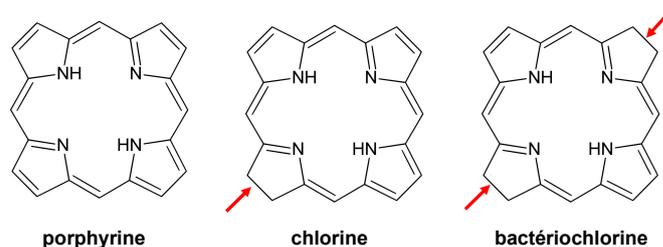


FIGURE 3.10: Les chlorines et bactérochlorines ne diffèrent des porphyrines que par la saturation de double liaisons. (tiré de http://www.genopole.fr/IMG/pdf/Brault_Atelier_Biophotonique_2010_3_diapos_par_page.pdf).

Cependant cet exemple n'est pas comparable à ce qui se passerait dans nos expérimentations. Dans ces expériences, Juzenas *et al.* se sont intéressés à la PPIX injectée pour la photothérapie dynamique, ce qui implique des concentrations du fluorophore beaucoup plus importantes que celles supposées présentes dans les tissus au naturel. De plus, la longueur d'onde d'excitation à 635 nm qu'ils utilisent se situe sur un pic d'absorption de la PPIX lorsque notre excitation à 690 nm correspond à un coefficient d'absorption de la PPIX quasiment nul. Enfin les intensités laser qu'ils utilisent sont plus importantes que les nôtres (environ 100 mW/cm² pour Juzenas *et al.* contre 30 mW/cm² au maximum pour nous), et les temps d'exposition testés sont plus longs (40 minutes au maximum pour eux, contre 15 minutes maximum pour une de nos acquisitions).

Bilan Au regard des expériences menées et de la bibliographie sur le sujet, l'excitation de fluorophores présents à l'état naturel dans les tissus qui émettraient de la fluorescence dans le rouge, comme la création de photoproduits fluorescents pour une excitation à 690 nm restent des hypothèses peu probables. En revanche l'hypothèse de la fluorescence de l'alimentation est appuyée par plusieurs publications et expérimentations plus convaincantes. Cette hypothèse reste aujourd'hui l'hypothèse privilégiée quant à l'origine d'un signal d'autofluorescence des tissus biologiques dans le rouge et proche infrarouge.

Suite à ces résultats, il paraît difficile à ce stade d'imaginer utiliser un modèle précis du spectre d'autofluorescence des tissus biologiques dans la méthode de séparation de spectres à cause du manque de connaissances des fluorophores responsables de son émission. Si l'autofluorescence s'attribue en grande partie à la fluorescence des aliments du patient, son comportement semble également difficile à prédire d'un cas à un autre. Pour confirmer cette idée, nous proposons dans les prochains paragraphes d'analyser le comportement spectral de l'autofluorescence des tissus ainsi que des marqueurs fluorescents que nous utiliserons en expérimentation.

3.3 Comportement spectral de l'autofluorescence

Dans cette partie nous nous intéressons au comportement de la fluorescence naturelle des tissus : nous observons l'évolution du signal d'autofluorescence en fonction de la puissance de l'illumination, du temps d'exposition, mais aussi les variations des spectres d'une localisation à l'autre des tissus.

3.3.1 Variation des spectres d'autofluorescence

La partie précédente a mis en exergue le manque de certitude quant à l'origine du signal d'autofluorescence des tissus biologiques. En pratique, nous n'observons seulement le spectre d'autofluorescence de 700 nm à environ 950 nm : sur cette gamme, nous ne mesurons sûrement que l'extrémité d'un spectre beaucoup plus large. Il est alors difficile de noter une différence remarquable sur le spectre de fluorescence d'un animal à un autre quand toutes les extrémités de spectres se ressemblent.

Nous trouvons cependant dans la bibliographie quelques résultats intéressants sur le comportement spectral de l'autofluorescence. Plusieurs publications indiquent qu'il existe des différences notables du signal d'autofluorescence à différentes localisations anatomiques qui peuvent se traduire par des variations de la forme et de l'intensité des spectres d'autofluorescence ([De Veld 03], *figure 5*). Certaines études soulignent que ces différences (intensité [Fournier 06] et spectres) s'accroissent d'autant plus d'un individu à l'autre. De Veld *et al.* mettent en évidence dans leurs travaux certains facteurs, comme le tabac, l'alcool ou la pigmentation de la peau susceptibles de faire varier le signal d'autofluorescence [De Veld 05]. Enfin, l'équipe de Juzenas a observé dans certaines études des changements spectraux de l'autofluorescence liés par exemple au pH du milieu observé [Juzenas 01].

3.3.1.1 Nos observations

Intensité de l'émission Au cours de nos différentes expériences sur petit animal, nous avons pu mesurer plusieurs spectres d'autofluorescence. La figure 3.11-a présente quelques exemples d'acquisitions *in vivo* d'autofluorescence sur souris obtenues sur notre système : sur un même animal, l'intensité du signal varie selon la localisation ou selon sa position (les tissus observés ne sont alors pas les mêmes), et peut être différente d'un animal à l'autre.

Forme des spectres En pratique, et contrairement à l'état de l'art sur le sujet, nous n'avons observé que de légères différences au niveau de la forme des spectres d'autofluorescence d'une localisation à l'autre, ou d'un animal à l'autre. La figure 3.11-b présente les spectres moyens normalisés d'autofluorescence acquis sur les différentes souris déjà présentée figure 3.11-a : sur ces exemples, le spectre d'autofluorescence reste quasiment constant quel que soit l'animal observé.

Enfin, au regard de ces derniers résultats, il semble logique que les variations de spectres sur un même animal doivent également être minimales. La figure 3.12 présente les spectres d'autofluorescence mesurés sur une même souris (voir 3.12-a) en différents

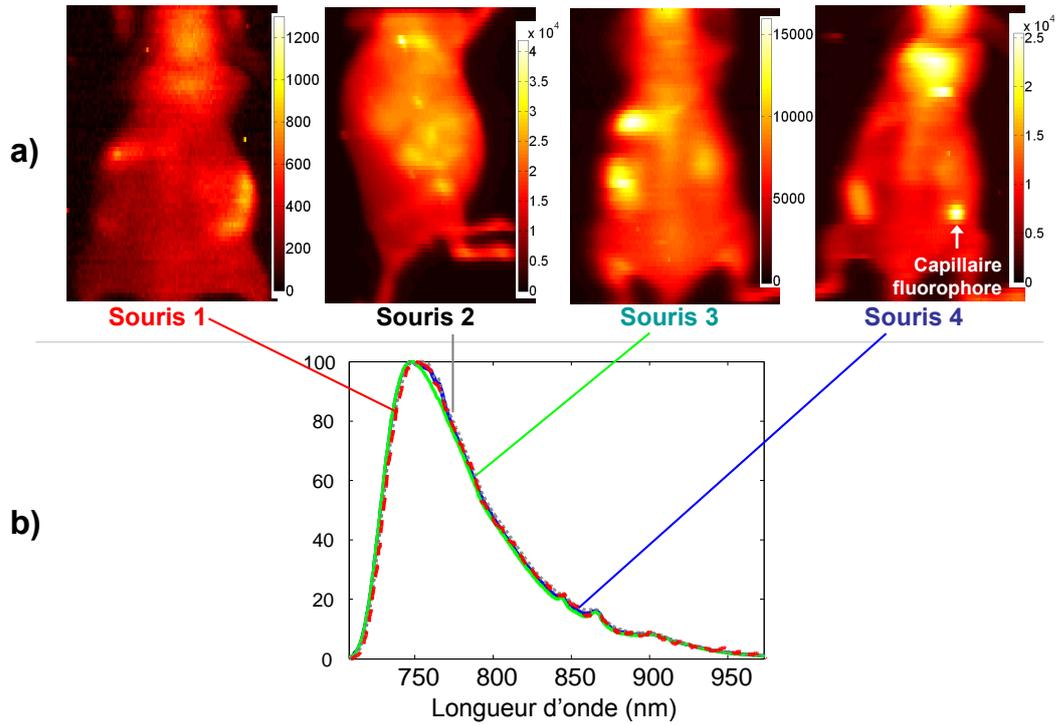


FIGURE 3.11: a) Acquisitions sur souris saines : cartes d'intensités, b) Spectres moyens d'auto-fluorescence des souris.

points des tissus de l'animal. Les spectres non normalisés sont présentés figure 3.12-b, tandis que les spectres normalisés sont proposés figure 3.12-c : bien que la forme des spectres d'auto-fluorescence varie très peu, nous remarquons une fois de plus que l'intensité est très variable d'un point à l'autre.

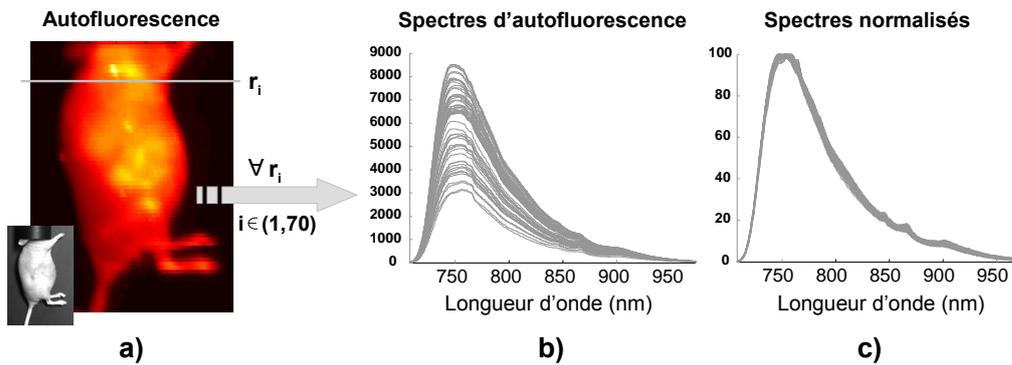


FIGURE 3.12: a) Acquisitions sur souris saines : cartes d'intensités, b) Spectres moyens d'auto-fluorescence des souris.

Pour conclure, le spectre de l'auto-fluorescence sur les exemples de souris présentés (4 pour cet expérience), et sur ce que nous avons globalement observé en expérimentation, reste quasiment constant d'un animal à l'autre. Sur un même animal, les différences

de spectres en diverses localisations sur les tissus sont donc également minimales. Bien qu'un spectre d'autofluorescence moyen peut être connu, l'intensité de l'autofluorescence varie de façon non négligeable d'une localisation à l'autre, et il paraît difficile de déterminer un modèle exact de cartographie des intensités de l'autofluorescence.

3.3.2 Influence de l'illumination

Nous avons eu également l'occasion de tester l'influence de notre dispositif expérimental, en particulier l'illumination sur les mesures d'autofluorescence. Nous présentons dans les paragraphes quelques résultats.

3.3.2.1 Photoblanchiment

Diverses études sur le photoblanchiment des tissus existent dans la littérature. Par exemple, Juzenas *et al.* tirent de leurs expériences *in vivo* que l'exposition à la lumière n'a pas causé de changements spectraux significatifs dans l'arrière plan autofluorescent de la peau de l'animal [Juzenas 01]. Nous proposons d'observer ce phénomène d'un peu plus près sur notre dispositif.

Influence du temps d'exposition sur l'intensité d'émission Nous avons étudié ce problème sur quelques expériences *in vivo*. Une souris est illuminée sur une ligne fixe à 690 nm, et des acquisitions régulières d'autofluorescence sont obtenues. La figure 3.13 propose les résultats obtenus sous illumination continue pendant 45 minutes (intensité laser d'environ 0.32 mW/mm^2 , et laser stable). Les résultats indiquent une baisse du signal d'autofluorescence après au minimum 10 minutes d'illumination de l'animal, ce qui semble indiquer que certains fluorophores responsables du signal d'autofluorescence sont candidats au photoblanchiment. Sur 45 minutes, l'intensité de l'émission des tissus de l'animal a diminué de près de 25%. Des résultats comparables ont été obtenus sur les autres animaux testés.

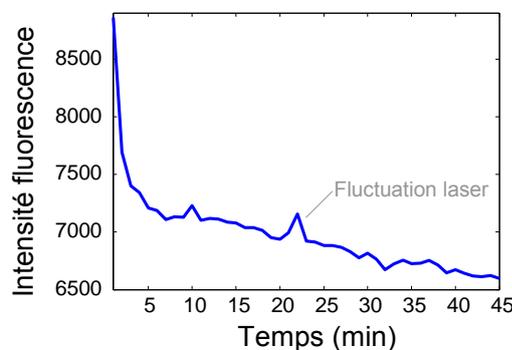


FIGURE 3.13: Illumination continue à 690 nm d'une souris pendant 50 minutes : acquisitions régulières de l'intensité moyenne sur une zone (abdomen) de l'animal.

Influence du temps d'exposition sur la forme spectrale Si le photoblanchiment des tissus de l'animal est validé par l'expérience précédente, il est intéressant d'observer en parallèle l'évolution des spectres d'autofluorescence sous illumination constante au cours du temps. Sur la figure 3.14 sont présentés les spectres moyens et normalisés d'autofluorescence d'une souris sous illumination constante (intensité laser d'environ 0.32 mW/mm^2) mesurés à intervalles réguliers (environ toutes les minutes) : les spectres de fluorescence ne sont pas modifiés au cours du temps sous l'effet du laser.

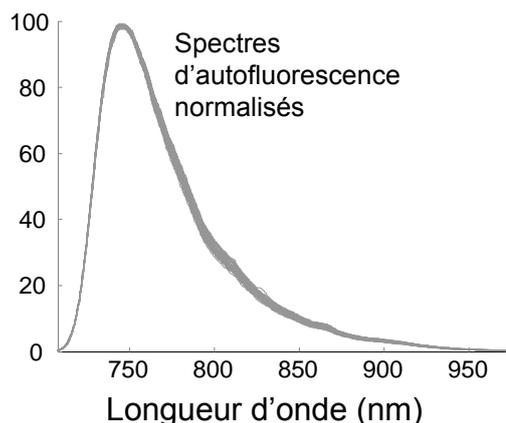


FIGURE 3.14: Spectre d'autofluorescence normalisés : acquisitions régulières (toutes les minutes) sur souris illuminée en continue pendant 45 min.

Influence de l'intensité laser Enfin nous avons voulu vérifier que l'intensité laser n'avait pas d'effet sur le signal d'autofluorescence (création de photoproduits à partir d'un certain seuil d'intensité). Sur une expérience comparable aux précédentes (acquisition sur une zone spécifique de la souris sous illumination constante), nous avons fait varier l'intensité du laser 690 nm de notre système de $0.0310 \times 10^{-3} \text{ mW/cm}^2$ à 0.32 mW/cm^2 . L'intensité moyenne de fluorescence sur la zone d'intérêt de l'animal est mesurée : les résultats sont présentés sur la courbe 3.15.

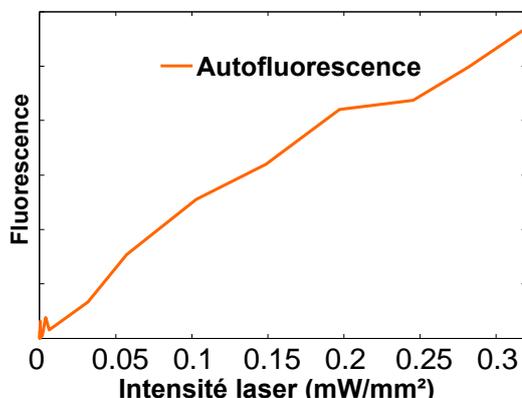


FIGURE 3.15: Influence de l'intensité laser sur le signal d'autofluorescence : acquisitions sur souris à différentes intensités.

L'intensité d'autofluorescence mesurée (en photons/pixels) varie de façon linéaire avec l'augmentation de l'intensité laser d'excitation. Des tests comparables seront effectués dans la partie suivante sur les fluorophores que nous utilisons en expérimentation.

3.4 Comportement spectral des marqueurs fluorescents *in vivo*

Les marqueurs fluorescents dont le spectre est parfaitement connu et mesurable *in vitro* subissent diverses modifications une fois injectés *in vivo*. Ces modifications peuvent se traduire par des pertes de fluorescence, ou encore un décalage des pics d'absorption et d'émission. Nous proposons dans les paragraphes suivants d'analyser plus en détails ces phénomènes en appuyant nos propos par des études sur les marqueurs spécifiques que nous utiliserons en expérimentation.

3.4.1 Influence du milieu sur les marqueurs

Nous nous intéressons en premier lieu aux effets du milieu d'accueil sur les marqueurs fluorescents qui s'y trouvent.

3.4.1.1 Facteurs physiologiques

Les temps de vie de fluorescence des marqueurs fluorescents sont connus pour être sensibles aux propriétés des milieux dans lesquels ils sont injectés. Des facteurs tels que le pH, le taux d'oxygène, la température, la polarité et les molécules auxquelles ils se fixent sont susceptibles de modifier la formulation des marqueurs fluorescents [Lakowicz 92, Lakowicz 93]. Typiquement, des modifications de l'environnement d'accueil des marqueurs impliquent une augmentation ou une baisse de l'intensité du signal de fluorescence. Mais des décalages ou distorsions de spectres peuvent aussi être observés.

Plusieurs processus physiologiques, tels que la digestion, le métabolisme ou encore l'excrétion sont basés sur des phénomènes de solvatation². L'équipe de Berezin s'est penchée sur ce sujet [Berezin 07] et a testé la dépendance des propriétés optiques de plusieurs marqueurs fluorescents au solvant dans lequel ils se trouvent. L'exemple de l'ICG est donné figure 3.16 : l'ICG est placé dans différents solvants comme l'eau, le méthanol, l'éthanol, l'acétone, ou encore le diméthylsulfoxyde (DMSO), et le spectre d'émission du fluorophore est mesuré dans chaque solution. La gamme de solvants a été choisie pour tester différentes polarités³ du milieu (polaire à 0.320 pour l'eau, à apolaire à 0.148 pour le chloroforme).

2. La solvatation est le phénomène physico-chimique observé lors de la dissolution d'un composé chimique dans un solvant.

3. La polarité d'une liaison ou d'une molécule est due à la différence d'électronégativité entre les éléments chimiques qui la composent, des différences de charge qu'elle induit, et à leur répartition dans l'espace. Plus les charges sont réparties de façon asymétrique, plus une liaison ou molécule sera polaire, et *a contrario*, si les charges sont réparties de façon totalement symétrique, elle sera apolaire.

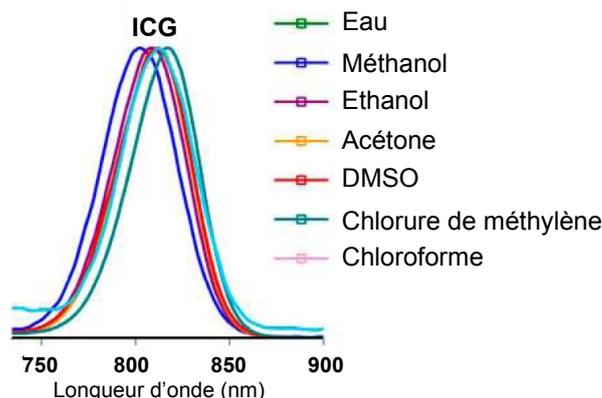


FIGURE 3.16: Spectres d'émission normalisés de l'ICG dans différents solvants, pour une excitation à 773 nm (adapté de [Berezin 07]).

D'après Berezin *et al.*, la polarité est une des causes principales à l'origine des décalage des spectres *in vivo*. Ses études ont mis en avant la caractéristique versatile de l'ICG, dont les propriétés spectrales varient selon le milieu d'accueil. Les travaux sur le comportement de l'ICG *in vivo* de Landsman, Desmettre, Mordon ou encore Alacam soulignent que la liaison du marqueur une fois injecté dans le milieu avec les protéines plasmatiques (lipoprotéines ou *Human Serum Albumine* qui est la protéine la plus abondante dans le plasma par exemple) est responsable du changements de ses caractéristiques spectrales, et notamment d'un décalage de son émission vers les longueurs d'onde rouges [Landsman 6, Desmettre 00, Mordon 8, Alacam 8].

D'autres facteurs peuvent être mis en cause, comme par exemple le pH, ou encore le taux de glucose [Lakowicz 93]. Certains fluorophores verront leur fluorescence diminuer si le pH du milieu est trop élevé, ou à l'inverse très bas. Un des avantages des nanoparticules, comme celles que nous utilisons qui encapsulent l'ICG (les ICG-LNP), est que la nouvelle formulation des marqueurs est plus robuste à ce type de problèmes [Navarro 09, Goutayer 10]. De plus dans le cas de l'ICG, il peut parfois sous sa forme libre se lier aux protéines du milieu, ce qui induit un décalage de son spectre d'absorption vers l'infrarouge. Ce résultat n'est pas spécifique à l'ICG puisque de façon générale, l'injection de marqueurs *in vivo* peut s'accompagner d'un décalage de leurs spectres d'émission [Desmettre 00].

Exemple Nous proposons un exemple obtenu en expérimentation : nous observons les modifications des pics d'émission de l'ICG et des ICG-LNP lors de leur passage à un milieu *in vivo*. L'expérience est faite sur souris : un capillaire rempli de fluorophore est placé en sous-cutané sur l'animal *in vivo* ($5 \mu\text{l}$ à $35,5 \mu\text{M}$, pour l'ICG et les ICG-LNP). Pour le cas *in vivo*, les fluorophores sont injectés en sous-cutané dans la patte de l'animal, et la fluorescence est mesurée quelques minutes après. Les résultats sont présentés figure 3.17 : nous observons un décalage du pic d'émission des fluorophores vers le rouge lorsque le fluorophore est injecté dans les tissus.

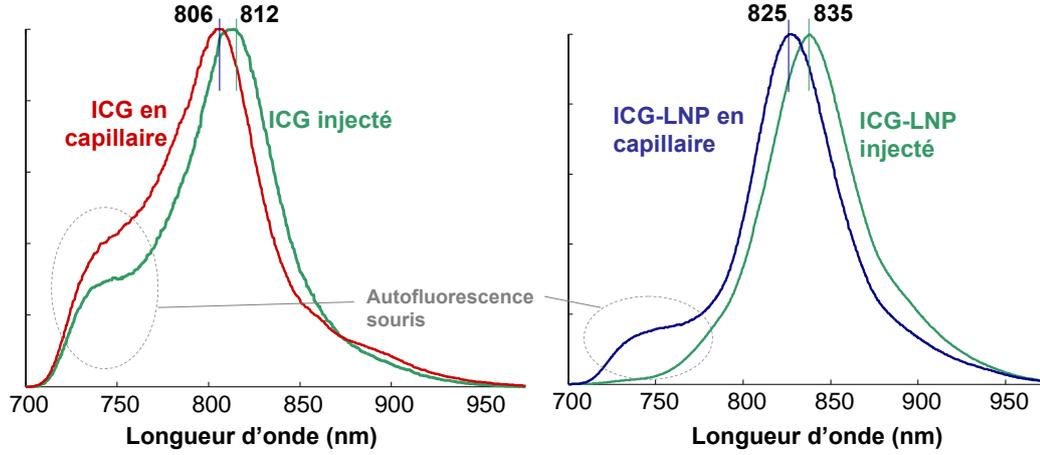


FIGURE 3.17: Modifications des spectres d'émission de l'ICG et des ICG-LNP in vivo : acquisitions avec notre dispositif sur souris avec capillaires sous-cutané remplis de fluorophore et après injection sous-cutané du fluorophore dans la patte de l'animal (acquisition quelques minutes après injection).

3.4.1.2 Absorption et diffusion : distorsion des spectres

Enfin, une des causes principales de distorsion des spectres de fluorescence et de décroissance de l'intensité du signal de fluorescence est liée à la propagation des photons réémis par les fluorophores dans les tissus. L'absorption et la diffusion des tissus dépend de la longueur d'onde d'émission λ , et le spectre de fluorescence détecté apparaît modifié par les propriétés des tissus traversés. Nous avons donné dans le second chapitre l'expression d'un spectre de fluorescence détecté S_d après traversée des tissus, en fonction de son spectre *in vitro* $S(\lambda)$; nous la rappelons ici :

$$S_d(\lambda) \propto S(\lambda) \times \frac{\exp(-k(\lambda)r_{md})}{4\pi D(\lambda)r_{md}} \quad (3.1)$$

où r_{md} est la distance entre les marqueurs fluorescents et les détecteurs, soit la distance parcourue par les photons réémis détectés. D est le terme de diffusion dépendant de la longueur d'onde λ et $k = \sqrt{\frac{\mu_a}{D}}$, avec μ_a le coefficient d'absorption et μ'_s le coefficient de diffusion réduit.

Exemple simulé Pour mieux comprendre l'effet des propriétés optiques des tissus sur les spectres de fluorescence détectés, nous proposons d'utiliser la simulation du sein présentée dans le chapitre précédent. Nous considérons dans ce cas uniquement le signal d'un marqueur fluorescent simulé proche de l'ICG. Les coefficients d'absorption et de diffusion réduits sont ceux détaillés dans le chapitre précédent, et inspirés des travaux de Cerussi sur le sein [Cerussi 01].

Nous étudions la déformation du spectre de fluorescence selon la profondeur des marqueurs fluorescents, ainsi que la perte d'intensité engendrée par la profondeur croissante des marqueurs. Les résultats sont présentés figure 3.18 pour des marqueurs simulés

d'1 mm à 10 cm de profondeur dans les tissus.

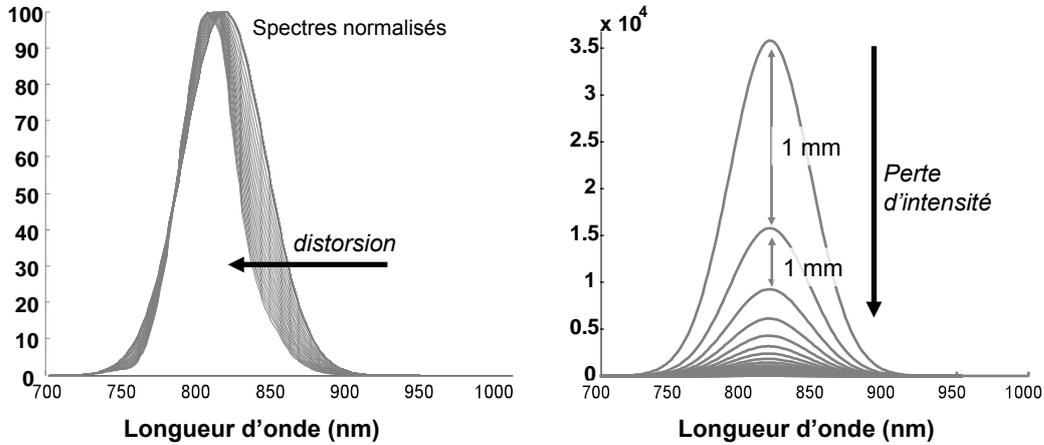


FIGURE 3.18: *Perte d'intensité et distorsion du spectre de fluorescence des marqueurs : simulation de marqueurs fluorescents déplacés en profondeur dans le sein, de 1 mm à 10 cm de profondeur.*

Une distorsion des spectres de fluorescence est observée plus les marqueurs sont simulés en profondeur dans les tissus.

Exemple sur données réelles Nous terminons cette partie sur un exemple obtenu en expérimentation : un capillaire en verre dans lequel est placé $5 \mu\text{l}$ d'ICG-LNP à $30 \mu\text{M}$ est déplacé de plus en plus profondément dans un fantôme liquide à base d'intralipide et d'encre.

Les propriétés optiques du fantôme ont été mesurées sur une chaîne d'acquisition TCSPC (voir annexe D du chapitre 2), et sont présentés sur la figure 3.19.

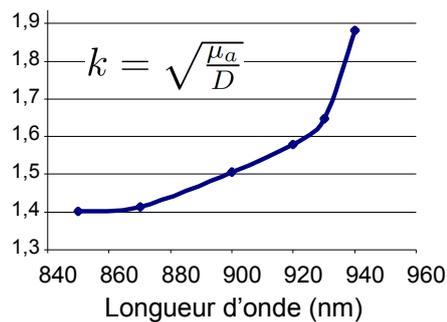


FIGURE 3.19: *Coefficient k déduit des mesures des coefficients d'absorption et de diffusion du fantôme (mesurés au TCSPC).*

Enfin, les spectres de fluorescence mesurés sur notre système sont présentés figure 3.20 : plus le capillaire est placé en profondeur dans le fantôme, plus les spectres sont modifiés.

La distorsion des spectres dépend des valeurs d'absorption et de diffusion du milieu comme expliqué précédemment : à moins de connaître précisément les propriétés

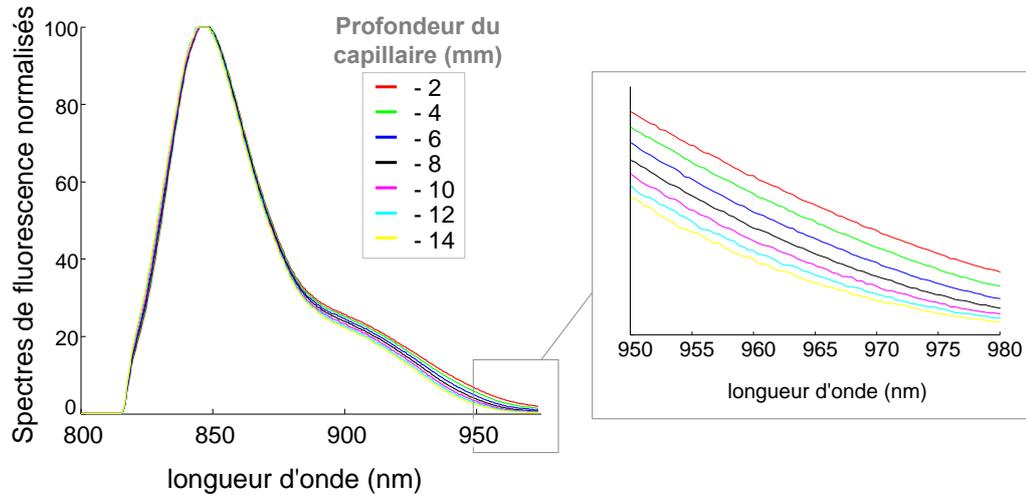


FIGURE 3.20: *Distorsion des spectres de fluorescence de l'ICG selon la profondeur du capillaire.*

optiques du milieu exploré, il est impossible de prévoir la distorsion des spectres de fluorescence. Dans notre cas, l'expérimentation sur petit animal ne prévoit pas de méthodes de mesure des paramètres optiques, et les distorsions subies par les spectres de fluorescence des marqueurs *in vivo* ne sont alors pas connues de façon précise. Pour de futurs dispositifs appliqués à l'homme, la mesure de ces propriétés optiques pourrait fournir une information supplémentaire utile pour la modélisation du comportement spectral des marqueurs.

Nous étudierons plus en détail le problème de la distorsion des spectres avec la profondeur dans le chapitre suivant sur la séparation de spectres.

3.4.2 Influence du système expérimental

Pour terminer, comme pour l'étude de l'autofluorescence, nous étudions dans cette partie les effets de l'illumination laser sur les spectres détectés.

3.4.2.1 Photoblanchiment des marqueurs

Nous avons déjà souligné précédemment l'intérêt de l'encapsulation des fluorophores ICG dans les nanoparticules lipidiques. Les nanoparticules confèrent aux fluorophores une plus grande stabilité dans le temps que lorsqu'ils sont utilisés sous leur forme hydrophile : la courbe 3.21 propose de comparer les taux de photoblanchiment de l'ICG encapsulé (ICG-LNP) et de l'ICG libre. La perte de fluorescence due au photoblanchiment de ces marqueurs est quasiment inexistante le temps d'une de nos expériences (le trait en pointillés sur la figure 3.21 indique l'équivalence en fluence d'une expérience moyenne sur notre dispositif expérimental). *A contrario*, l'ICG non encapsulé est fortement influencé par l'illumination, et perd rapidement de son efficacité.

De plus, les nanoparticules sont stables plus d'un an, conservées à température ambiante, dans un tampon HBS (HEPES 0,02 M, EDTA 0,01 M, pH 5,5) [Texier 09].

C'est notamment pour la stabilité améliorée des ICG-LNP comparé à l'ICG, et également pour le pic d'émission décalé dans le rouge (d'environ 800 nm pour l'ICG à 820 nm pour les ICG-LNP) qui facilite la séparation avec les spectres d'autofluorescence que nous avons choisi d'utiliser les ICG-LNP en expérimentation.

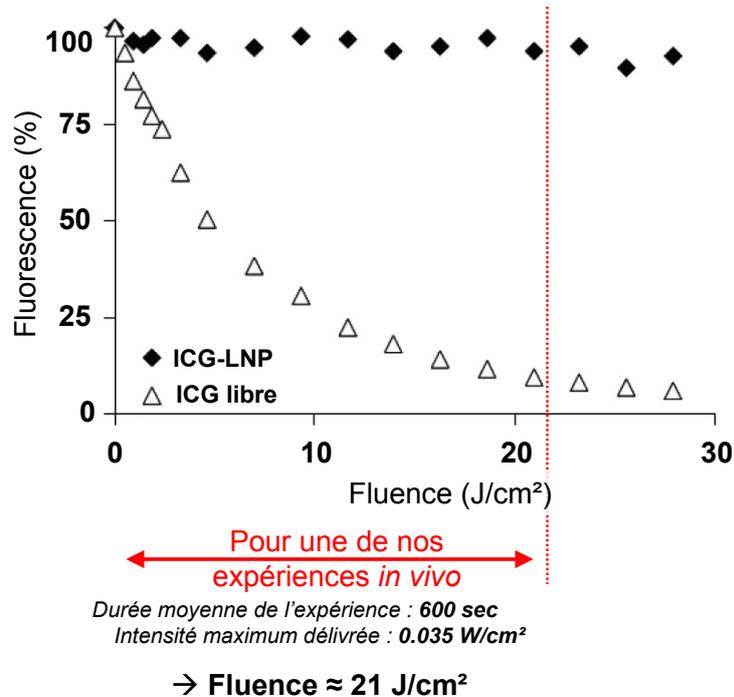


FIGURE 3.21: Comparaison des taux de photoblanchiment de l'ICG encapsulé (ICG-LNP) et de l'ICG libre [Navarro 09].

3.4.2.2 Influence de l'intensité de l'illumination

Nous avons mené une expérience comparable à celle effectuée pour l'autofluorescence, en exposant un échantillon d'ICG-LNP sur notre système à différentes valeurs de l'intensité laser, d'environ $0,0310 \times 10^{-3} \text{ mW/cm}^2$ à $0,32 \text{ mW/cm}^2$. L'intensité du signal de fluorescence obtenue est proposée sur la courbe 3.22 : la fluorescence mesurée varie de façon linéaire avec l'augmentation de l'intensité laser d'excitation. Nous avons trouvé un résultat comparable pour l'autofluorescence.

Exemple Afin de confirmer ce dernier résultat, nous proposons une brève expérience. Une souris sur laquelle un capillaire rempli d'ICG-LNP est placé est soumise à des acquisitions pour une excitation à 690 nm pour différentes valeurs de l'intensité laser. Nous mesurons sur les résultats obtenus le contraste entre la zone *T* du capillaire et une zone *N* des tissus de la souris. Les résultats obtenus sont présentés figure 3.23 pour quatre intensités laser différentes : le contraste reste quasiment constant quelle que soit l'intensité laser choisie, ce qui confirme les précédents résultats obtenus sur l'autofluorescence et les ICG-LNP. L'intensité des deux sources de fluorescence évolue de façon linéaire avec l'intensité du laser.

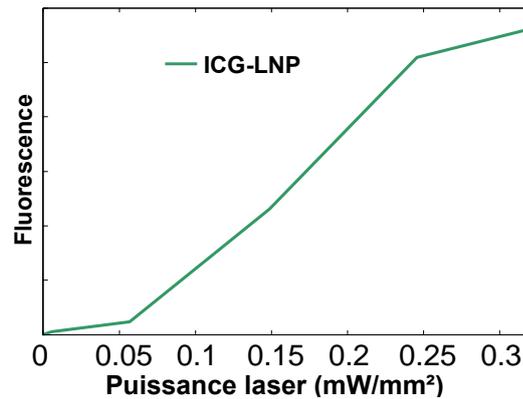


FIGURE 3.22: Influence de l'intensité laser sur le signal de fluorescence des ICG-LNP : acquisitions sur échantillon à différentes intensités.

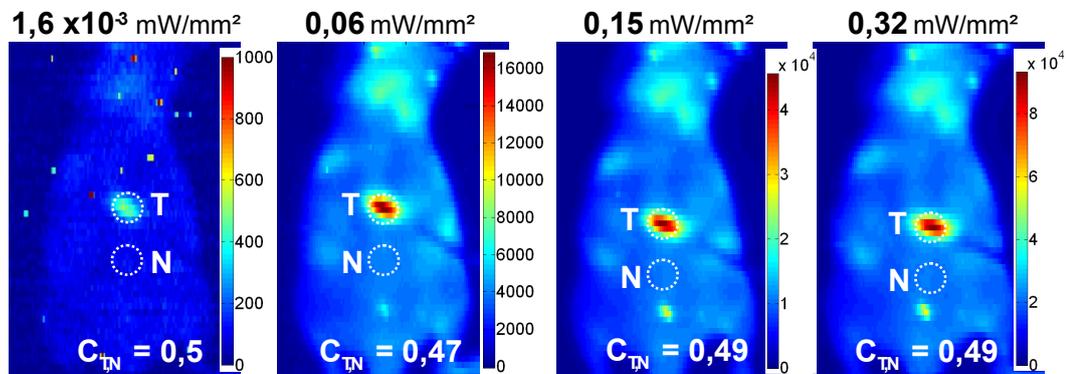


FIGURE 3.23: Exemple *in vivo* : un capillaire de fluorophore est placé sur une souris, quatre acquisitions sont obtenues pour quatre puissance du laser différentes. Le contraste tumeur-tissu sain $C_{T,N}$ obtenu reste environ constant d'une puissance à l'autre.

Quelle que soit donc l'intensité choisie pour l'excitation, le rapport entre l'auto-fluorescence des tissus et la fluorescence des marqueurs restera approximativement le même.

Bilan du chapitre

Ce chapitre étudie le comportement *in vivo* des fluorophores impliqués dans notre problématique, à savoir les marqueurs fluorescents d'intérêt et l'autofluorescence parasite.

Un bref état de l'art sur l'autofluorescence des tissus est proposé : l'autofluorescence des tissus est un phénomène connu dans les longueurs d'onde du visible, où sa mesure et son analyse sont pertinentes dans la détection de zones cancéreuses par exemple. En conséquence, l'origine de l'autofluorescence dans le visible a été largement étudiée, et les fluorophores endogènes impliqués ont été identifiés depuis plusieurs années.

En imagerie optique de fluorescence, pour des longueurs d'onde dans le rouge et le proche infrarouge, le signal d'autofluorescence n'est plus qu'un signal parasite limi-

tant la détection des fluorophores injectés. L'autofluorescence étant souvent considérée comme un signal négligeable en imagerie du petit animal, elle a donc été peu étudiée, et son origine reste inconnue : nous avons émis dans ce chapitre quelques hypothèses sur les fluorophores responsables de son émission.

La première hypothèse, et la plus plausible, attribue le signal d'autofluorescence des souris mesuré sur notre système à la fluorescence des aliments de l'animal. La chlorophylle, par exemple, est présente dans la plupart des composants de l'alimentation utilisée pour le petit animal, et son spectre d'émission s'étend au delà de 700 nm. De plus des études sur l'influence du régime alimentaire sur la fluorescence naturelle des tissus l'ont clairement mise en cause : des régimes appropriés sur plusieurs jours ont permis d'atténuer le phénomène d'autofluorescence, non seulement au niveau de l'abdomen, mais également sur tout l'animal.

Nous émettons également l'hypothèse de la présence de fluorophores endogènes dans les tissus susceptibles de fluorescer ou de générer des photoproduits fluorescents dans le rouge et le proche infrarouge. Parmi ces fluorophores, nous mettons en avant la famille des porphyrines, dont les spectres d'émission peuvent se prolonger dans le rouge, et principalement les éventuels photoproduits de porphyrines créés après illumination de la zone d'intérêt. Cette hypothèse reste cependant très fragile, et minoritaire face à la fluorescence certaine des aliments.

De l'étude de l'origine de l'autofluorescence est tirée une première conclusion : il est certain que l'origine de l'autofluorescence est trop complexe et mal connue pour supposer que l'on puisse avoir un modèle précis du spectre d'émission basé sur d'autres informations que celles obtenues empiriquement en expérimentation.

La seconde partie de ce chapitre étudie le comportement spectral de l'autofluorescence et des fluorophores spécifiques utilisés en expérimentation (les ICG-LNP).

Le photoblanchiment des différents fluorophores le temps de nos expérimentations est très faible : aucun changement (marquant) n'intervient sur les spectres.

Empiriquement, nous avons toujours observé un spectre d'autofluorescence globalement identique en tout point des tissus biologiques analysés. Seule l'intensité du signal reste variable d'un animal à l'autre, ou sur un même animal suivant les zones observées ; la fluorescence plus intense des zones abdominales ou encore du foie semble appuyer l'hypothèse de la fluorescence des aliments.

Enfin en ce qui concerne les marqueurs injectés, les spectres d'émission *in vivo* peuvent différer des spectres *in vitro* connus suivant les caractéristiques du milieu d'accueil (pH par exemple), la profondeur de la cible biologique à laquelle ils vont se fixer ou encore les propriétés optiques du milieu (absorption et diffusion).

De toute cette étude a émergé le besoin de mettre en place une méthode de séparation de spectres dite **aveugle**, capable de retrouver et de séparer les contributions de fluorescence qui composent le milieu avec peu d'information *a priori* sur leurs spectres, et surtout sur leur concentrations dans le milieu.

Le chapitre suivant étudie les différentes méthodes envisageables pour la séparation

de spectres de fluorescence. Une méthode particulièrement adaptée –la Factorisation en Matrices Non-négatives (FMN)– sera choisie, étudiée en détails, et modifiée pour mieux s’adapter à nos données résolues en longueurs d’onde.

Séparation de spectres aveugle : présentation et étude

Le chapitre précédent préconise l'utilisation d'une méthode de séparation de sources spectrales aveugle, où peu d'information *a priori* est exigée, pour éliminer la contribution de l'autofluorescence et améliorer la détection des marqueurs fluorescents dans les tissus.

Avant de s'intéresser en détails à des méthodes de séparation de sources aveugles, la première partie de ce chapitre revient sur quelques techniques que nous avons eu l'occasion de tester au début de la thèse. Avec l'étude en parallèle du comportement spectral de l'autofluorescence et de la fluorescence des marqueurs injectés, nous nous sommes par la suite orientés vers les méthodes dites aveugles qui nécessitent peu d'information sur les sources recherchées ; nous présentons ce concept et les méthodes de résolution associées.

Nous proposons dans la seconde partie de ce chapitre d'étudier en détails la méthode FMN que nous avons privilégiée pour l'élimination de l'autofluorescence sur nos données. Le problème de la non-unicité de la décomposition nécessite l'apport d'information *a priori* à la méthode ; nous proposons une analyse de l'influence de l'initialisation sur la séparation obtenue, ainsi que de la prise en compte de diverses contraintes. Enfin nous présentons quelques algorithmes régularisés découlant de cette étude ; ces méthodes prennent en compte l'information que nous possédons sur la nature des fluorophores et de leurs spectres de fluorescence, comme la non-négativité des mesures ou encore la distribution parcimonieuse des marqueurs dans le milieu.

Sommaire

4.1	Séparation de spectres et autofluorescence	93
4.1.1	Premières approches	93
4.1.2	Séparation de sources aveugle	100
4.2	Factorisation en Matrices Non-négatives	106
4.2.1	Algorithme classique	106
4.2.2	Non-unicité de la décomposition	108
4.2.3	Distorsion des spectres de fluorescence	111
4.3	Propositions de régularisations	115
4.3.1	Étude de l'influence de l'initialisation	115
4.3.2	Prise en compte de l'information <i>a priori</i> sur les spectres	121
4.3.3	Apport de contraintes de parcimonie spatiale	125

4.1 Séparation de spectres et élimination de l'auto-fluorescence

Plusieurs méthodes de séparation de sources, certaines déjà spécifiquement appliquées à la spectroscopie de fluorescence, peuvent être envisagées pour résoudre notre problématique d'élimination de l'auto-fluorescence. Nous pourrions citer parmi ces méthodes les Moindres Carrés Non-Linéaires [Wood 08], la soustraction de spectres [Vandelest 95], la Décomposition en Valeurs Singulières (SVD), l'Analyse en composantes principales (PCA), ou encore l'Analyse en Composantes Indépendantes (ICA) [Levenson 08, Hoyt 06, Cronin 05, De Lathauwer 94]. Le chapitre 3 propose plusieurs études sur le comportement spectral des sources de fluorescence, et conclut face aux changements auxquels sont exposés les spectres et concentrations des sources à la nécessité d'une méthode de séparation de sources aveugle.

Avant de nous focaliser sur ces méthodes particulières, nous avons testé en début de thèse diverses méthodes, inspirées de l'état de l'art en imagerie optique pour le petit animal. Le début de ce chapitre revient sur deux d'entre elles, la soustraction de modèle, et la SVD, et met en avant les désavantages de ces méthodes qui nous ont finalement poussés à les abandonner.

4.1.1 Premières approches

4.1.1.1 Soustraction de modèle

Cette méthode a notamment été utilisée initialement par le groupe Cambridge Research & Instrumentation (CRI). Elle repose sur la connaissance *a priori* soit du spectre de fluorescence spécifique, soit du spectre d'auto-fluorescence, et de calculer ainsi à partir de l'équation 1.21, après soustraction du maximum du signal connu, la quantité restante de signal inconnu. Cette démarche se formalise par :

$$a.F(\lambda) = V(\lambda) - b.G(\lambda) \quad (4.1)$$

où V est la mesure d'auto-fluorescence, F représente le spectre de fluorescence des marqueurs, G le spectre de l'auto-fluorescence, et a et b respectivement les coefficients de pondération des marqueurs et de l'auto-fluorescence. Le groupe Cambridge Research & Instrumentation (CRI) résout cette équation pour chaque pixel de leur image de départ, et le coefficient b est choisi de telle sorte que le résidu F soit non-négatif dans chaque canal spectral.

Exemple Afin de tester les différentes méthodes que nous proposons dans ce chapitre, nous proposons un jeu de données résolues en longueur d'onde simple. Les mesures ont été obtenues sur souris avec un capillaire d'ICG-LNP en sous-cutané (voir figure 4.1). L'animal est illuminé par une ligne, et la fluorescence est détectée sur la ligne de détecteur correspondante. Nous obtenons après acquisition une matrice V de N_s observations, soit N_s spectres de fluorescence de taille N_λ chacun. Chaque spectre est le mélange de deux sources, l'autofluorescence des tissus et la fluorescence des marqueurs ICG-LNP.

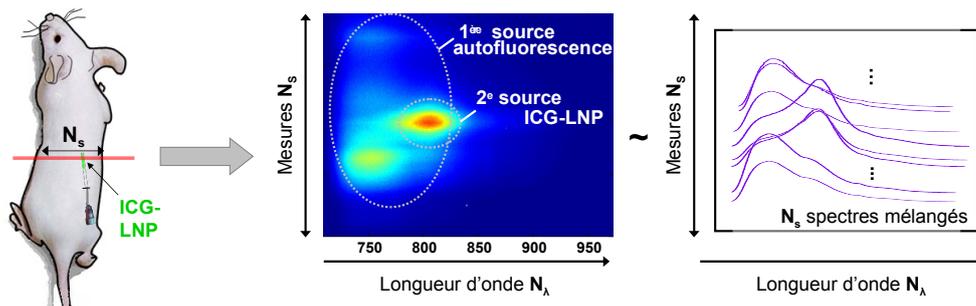


FIGURE 4.1: Un exemple simple d'acquisition sur souris avec capillaire fluorescent (ICG-LNP) est proposé pour tester différentes méthodes : nous utilisons ici les spectres de fluorescence acquis pour une position de la ligne d'excitation et de la ligne de détecteurs (gauche). Les N_s points de la ligne sont décomposés selon leur spectre en longueur d'onde (N_λ longueurs d'onde) (centre et droite).

La méthode de soustraction de modèle que nous proposons consiste à soustraire le maximum d'autofluorescence de nos données V , en traitant les N_s mesures les unes après les autres. Sur chaque spectre mélangé $V(\lambda)$, nous soustrayons b fois le modèle de spectre d'autofluorescence $G(\lambda)$ pour obtenir des données pondérées $F(\lambda)$ isolant la fluorescence des marqueurs d'intérêt :

$$a.F(\lambda) = V(\lambda) - b \times G(\lambda) \quad (4.2)$$

En pratique, nous suivons la méthode schématisée figure 4.2. Sur chacune des N_s mesures, nous soustrayons une certaine quantité b d'autofluorescence. Le coefficient b est obtenu en calant le spectre modèle de l'autofluorescence sur chaque mesure en nous référant à une longueur d'onde donnée, comme par exemple le pic d'autofluorescence vers 750 nm (voir figure 4.2). Une fois la valeur de b obtenue, nous soustrayons b fois le spectre modèle de la mesure mélangée pour obtenir un spectre avec une certaine pondération a sur lequel la contribution d'autofluorescence a été éliminée (voir figure 4.2).

Le résultat obtenu pour la contribution de fluorescence des ICG-LNP isolés de l'autofluorescence sur l'exemple des données V est proposé figure 4.3) : l'algorithme réussit à isoler la fluorescence spécifique, mais la méthode présente plusieurs inconvénients.

Inconvénients de la méthode Tout d'abord, cette méthode dépend du **choix d'un modèle unique d'autofluorescence** : nous avons vu dans le chapitre précédent que

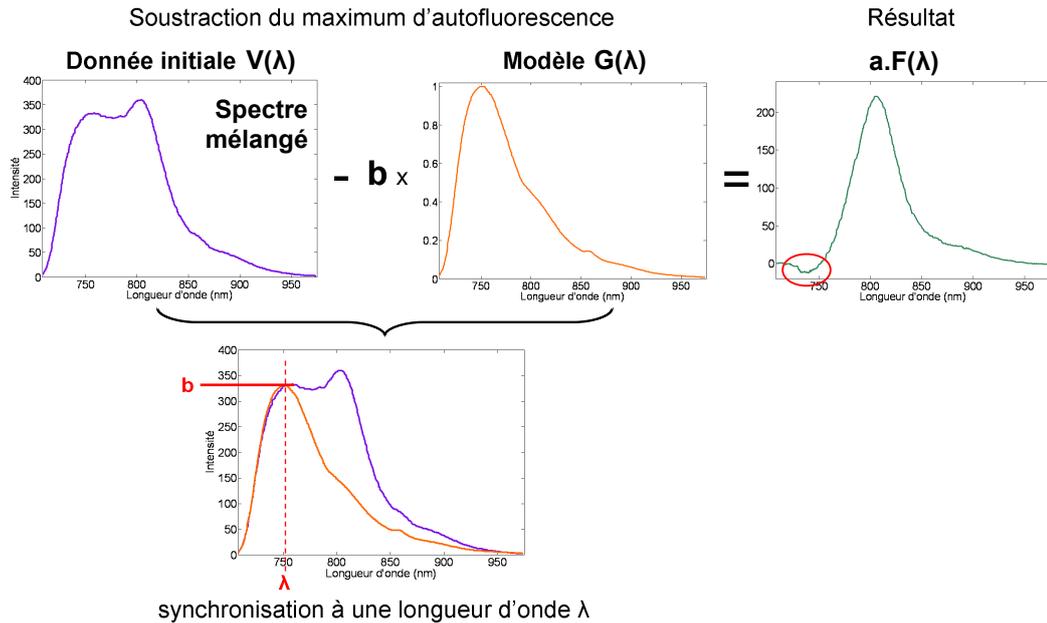


FIGURE 4.2: *Un spectre initial de mélange de nos données est traité par simple soustraction de modèle : le spectre d'autofluorescence pondéré est soustrait du spectre initial.*

bien que l'autofluorescence varie peu spectralement d'une mesure à l'autre, son origine n'est pas bien définie, et son comportement n'est pas assuré d'être stable. Il est préférable de ne pas baser la méthode de séparation de spectres sur un modèle d'autofluorescence empirique. Le résultat obtenu sur notre exemple conforte cette idée : bien que le modèle d'autofluorescence choisi ici soit très proche de celui recherché, nous obtenons plusieurs valeurs négatives en contradiction avec la réalité physique. Si un modèle d'autofluorescence différent du spectre d'autofluorescence recherché peut causer ces erreurs, un mauvais recalage et donc une mauvaise pondération permettant de déterminer la valeur du coefficient b est aussi à mettre en cause.

Enfin, l'intensité initiale des marqueurs dans le milieu n'est pas entièrement retrouvée après séparation. En effet, dans les **zones de recouvrement** des spectres d'autofluorescence et de fluorescence des ICG-LNP, la fluorescence à 750 nm (longueur d'onde choisie pour le recalage) n'est pas uniquement due à l'émission naturelle des tissus, mais également en partie à l'émission des marqueurs d'ICG-LNP. Le résultat après soustraction est donc faussé, puisqu'**une partie du signal de fluorescence d'intérêt des marqueurs a également été éliminée** car associée à l'autofluorescence.

Face à ces inconvénients et au manque de robustesse de la méthode sur les données similaires à celles de l'exemple sur lesquelles nous avons eu l'occasion de la tester, nous sommes penchés sur d'autres solutions que nous proposons d'examiner dans les parties suivantes.

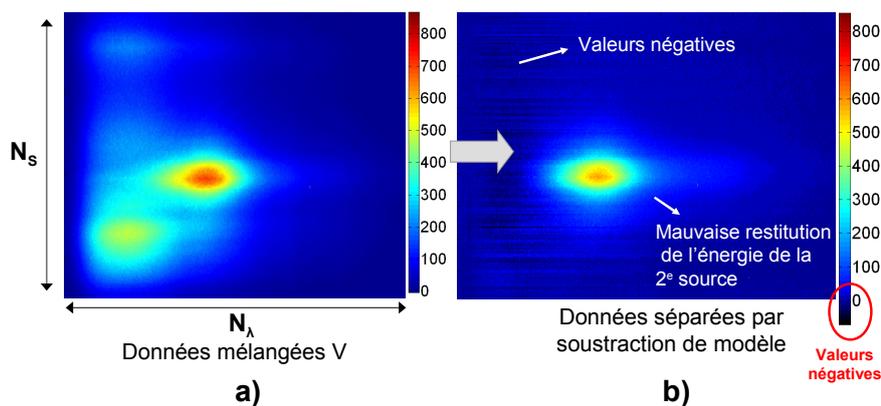


FIGURE 4.3: Soustraction du modèle d'autofluorescence ligne par ligne sur toute les données V : a) avant soustraction, b) après soustraction : les ICG-LNP sont séparés de l'autofluorescence mais avec une mauvaise restitution de l'intensité des marqueurs et le présence d'une ligne de base parfois négative.

4.1.1.2 Décomposition en Valeurs Singulières

La SVD (de l'anglais *Singular Value Decomposition*) est un outil de base en traitement du signal (en géophysique ou acoustique sous-marine par exemple)[Le Bihan 06, Vrabie 04, Mars 04, Mars 4, Le Bihan 4, Khan 8] et a souvent été utilisée en séparation de sources [De Lathauwer 94], seule, ou associée à d'autres méthodes telles l'Analyse en composantes principales (PCA) (de l'anglais *Principal Component Analysis*) ou l'Analyse en Composantes Indépendantes (ICA) (de l'anglais *Independent Component Analysis*)[Hyvärinen 00, Vrabie 04, Comon 10, Joliffe 02, Vrabie 06, Khan 08, Adali 09, Villa 09, Deville 10, Koldovsky 8].

Décomposition matricielle Soit une matrice V réelle de taille $m \times n$ avec $n \geq m$. La décomposition SVD de V retourne deux matrices orthogonales¹ U et W , et une matrice Σ – dont tous les éléments sont nuls mis à part ceux de la diagonale –, telles que :

$$V = U\Sigma W^T \quad (4.3)$$

U est de taille $m \times m$, et W de taille $n \times n$ de telle sorte que Σ soit rectangulaire et de même taille que V (soit de taille $m \times n$). Les éléments de la diagonale de Σ sont généralement arrangés par ordre décroissant. Ces valeurs sont positives et sont appelées *valeurs singulières* de V . Les colonnes de U et W sont respectivement appelées *vecteurs singuliers* gauche et droit de V .

Le signal de départ peut être interprété comme la somme de deux contributions souvent

1. Si une matrice W est rectangulaire, alors les conditions $W.W^t = I$ et $W^t.W = I$, où I est la matrice identité, ne sont pas équivalentes. La condition $W^t.W = I$ explicite que les colonnes de W sont orthonormales. Cela arrive seulement si W est une matrice $m \times n$, avec $n \leq m$. De façon similaire, $W.W^t = I$ explicite que les lignes de W sont orthonormales, ce qui implique $n \geq m$. Il n'y a pas de terminologie précise pour ces matrices.

appelées sous-espaces, une pour le « signal utile » et une pour le « bruit » tel que :

$$V = \underbrace{\sum_{i=1}^P u_i \cdot \sigma_i \cdot w_i^t}_{\text{Signal}} + \underbrace{\sum_{i=P+1}^n u_i \cdot \sigma_i \cdot w_i^t}_{\text{Bruit}} \quad (4.4)$$

P est le nombre de valeurs singulières de Σ prises en compte (soit non nulles ou non négligeables comme schématisé figure 4.4), qui définira la dimension du sous-espace « signal utile ».

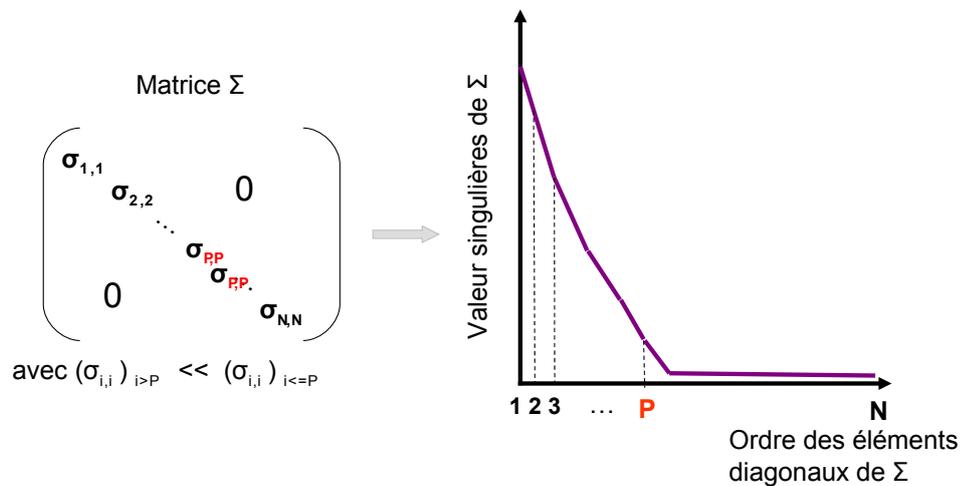


FIGURE 4.4: Valeurs de la diagonale de la matrice Σ . En sélectionnant uniquement les P premières valeurs non négligeables, on peut construire un modèle simplifié décrivant les données, et éliminant le bruit.

Notons qu'il existe une relation directe entre la SVD et la méthode de PCA [Gerbrands 1] dans le cas où les composantes principales sont calculées à partir de la matrice de covariance. La méthode PCA permet de sélectionner les vecteurs propres des données qui correspondent aux plus grandes valeurs propres de la matrice de covariance, pour ensuite projeter les données dans ces nouvelles directions. La méthode permet ainsi de réduire l'information en un nombre de composantes plus limité P que le nombre initial de variables n .

Dans le cadre de la séparation de sources, **la Décomposition en Valeurs Singulières (SVD) et surtout l'analyse de la décroissance des valeurs singulières peut être utilisée pour déterminer le nombre de sources du milieu à séparer**, si cette information est inconnue. Certains algorithmes [Rodet 09] effectuent une SVD initialement dans ce seul but, en utilisant la courbe des valeurs singulières comme présenté précédemment pour déterminer le nombre sources (cf. figure 4.4), puis utilisent d'autres méthodes de séparation de sources qui requièrent que le nombre de sources à séparer soit initialement connu.

La SVD appliquée à la spectroscopie Dans notre cas, la matrice traitée V est une image de taille $N_s \times N_\lambda$ ($m = N_s$ et $n = N_\lambda$), et chaque ligne de V représente un spectre de fluorescence mesuré en un point de l'échantillon analysé.

En appliquant la SVD sur nos données, nous analysons les P premières valeurs singulières de la diagonale de Σ qui donnent une information sur la contribution des P différentes sources spectrales prépondérantes issues de la matrice de départ.

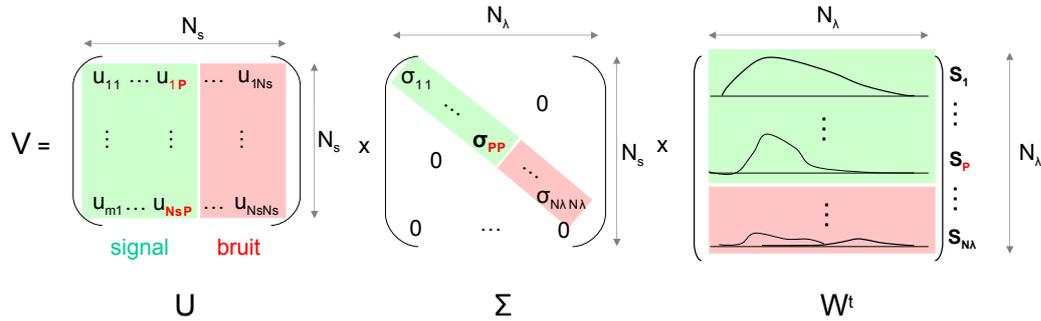
Ainsi si nous recherchons deux sources de fluorescence (par exemple l'auto fluorescence et la fluorescence spécifique des marqueurs) dans nos données V , P sera égal à 2, et la SVD donnera la solution (U, Σ, V) . Les colonnes de W forment une base de \mathbb{R}_λ^N , donc les deux premières colonnes de W donnent la forme spectrale des deux premières sources détectées s_1 et s_2 (associées aux deux valeurs singulières les plus fortes de Σ). Les colonnes de U forment quant à elles une base de \mathbb{R}_s^N , et les deux premières colonnes de U donnent la quantité de chaque spectre s_1 et s_2 dans V . La SVD implique que les sources recherchées sont supposées orthogonales entre elles, et nous verrons que cette contrainte forte ne convient pas forcément à nos données.

Nous proposons de schématiser matriciellement la SVD de la façon suivante (si $N_s > N_\lambda$) :

$$V = U \times \Sigma \times W^t$$

$$V = \begin{pmatrix} u_{11} & \dots & u_{1N_s} \\ \vdots & \dots & \vdots \\ u_{N_s 1} & \dots & u_{N_s N_s} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} \sigma_{11} & & 0 \\ & \ddots & \\ 0 & & \sigma_{N_\lambda N_\lambda} \\ & & & 0 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} w_{11} & \dots & w_{1N_\lambda} \\ \vdots & \dots & \vdots \\ w_{N_\lambda 1} & \dots & w_{N_\lambda N_\lambda} \end{pmatrix}^t \quad (4.5)$$

Cette équation matricielle peut également être schématisée comme suit, en mettant en valeur l'information spectrale contenue dans la matrice W :



En imaginant que seuls les P premières sources correspondent à la partie signal utile des données (les composantes suivantes étant attribuées au bruit), le signal d'intérêt de chaque ligne de nos données V peut être écrit comme une combinaison linéaire des P spectres s_1 à s_P :

$$\text{Signal Utile } v_i = \sigma_{1,1} \times u_{i,1} \times s_1 + \dots + \sigma_{P,P} \times u_{i,P} \times s_P \quad i \in (1, N_s) \quad (4.6)$$

Exemple Nous reprenons les données proposées en exemple dans la partie sur la méthode de soustraction de modèle, pour appliquer cette fois la SVD aux données. En

ne sélectionnant que les deux valeurs propres prépondérantes pour décrire le sous-espace « signal » comme expliqué précédemment, nous isolons la contribution des ICG-LNP, présentée figure 4.5 (L'ensemble des résultats sur cet exemple, les valeurs singulières obtenues, ainsi que la contribution d'autofluorescence sont présentés en annexe G).

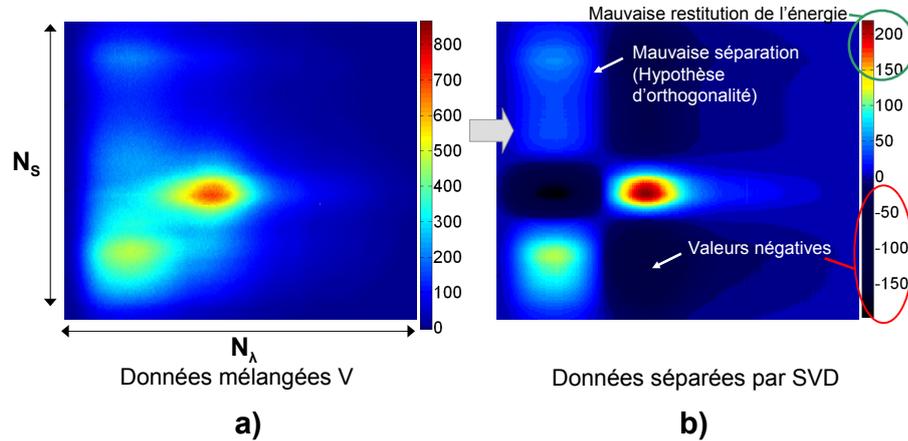


FIGURE 4.5: *Élimination de l'autofluorescence des données mélangées V par SVD : a) avant SVD, b) après SVD : l'isolement de la 2^e source d'intérêt n'est pas correct, avec notamment l'apparition de valeurs négatives et une mauvaise restitution de l'intensité des marqueurs.*

Inconvénients de la méthode Après séparation par la SVD, en raison de la contrainte d'orthogonalité, rien n'empêche les sources d'être à valeurs négatives ce qui représente le premier inconvénient de la méthode. La contrainte de non-négativité primordiale doit être une des contraintes de base de la méthode de séparation choisie. La SVD décomposant les données en une base orthonormée, implique une forte hypothèse sur les sources (ce qui ne correspond pas ici forcément à la réalité de nos mesures). Le résultat obtenu et présenté sur la figure 4.5 illustre cet inconvénient (voir aussi résultats complémentaires en annexe G). La décomposition SVD obtenue sur cet exemple particulier met en avant le manque d'adaptabilité de la méthode à nos données, et ne convient pas pour notre problème de séparation de sources positives.

4.1.1.3 Bilan

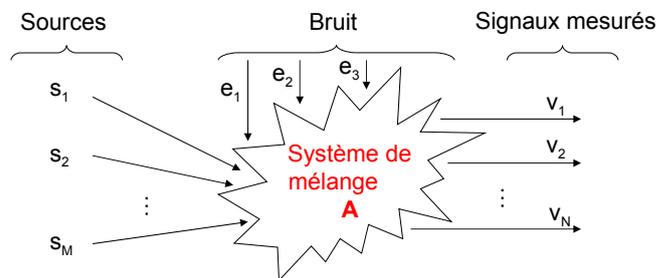
Que ce soit à travers la méthode de soustraction de modèle, ou de SVD, l'inconvénient le plus flagrant de ces deux méthodes est que la contrainte de non-négativité pourtant inhérente à notre problème n'est pas prise en compte de façon implicite. A cela s'ajoute le manque de degrés de liberté de ces méthodes quant au peu d'information sur les sources recherchées.

Parallèlement à notre étude sur l'algorithmie la plus adaptée à notre problème, nous avons pu progresser dans la connaissance du comportement spectral des sources de fluorescence (voir chapitre 3). Ce chapitre – face à la variabilité des spectres de fluorescence considérés – concluait sur la nécessité de choisir une méthode de séparation

de sources dite **aveugle**. Cette réflexion nous a poussé à nous intéresser à ces méthodes, qui semblaient mieux adaptées que celles que nous étudions alors. Nous revenons ici sur le concept de Séparation de Sources Aveugle (BSS pour *Blind Source Separation* avant de nous intéresser aux méthodes utilisées pour résoudre ce type de problème.

4.1.2 Séparation de sources aveugle

Le concept de BSS apparaît dans les années 1980 pour désigner un problème de séparation de sources basé uniquement sur les mesures en sorties d'un système où l'on cherche à caractériser le système lui-même. Une synthèse relativement complète sur ce sujet est présentée dans l'ouvrage édité par P. Comon et C. Jutten [Comon 10]. L'idée peut être décrite par le schéma suivant :



La plupart des problèmes de BSS sous leur forme la plus basique pourront s'exprimer de façon algébrique comme un problème de factorisation de matrices [Cichocki 09] ; connaissant le jeu de mesures $V = [v_1, v_2, \dots, v_N] \in \mathbb{R}^{N \times T}$, déterminer une factorisation en matrices telle que :

$$V = AS + E \quad (4.7)$$

où $A \in \mathbb{R}^{N \times M}$ représente la matrice de mélange, $E \in \mathbb{R}^{N \times T}$ est la matrice de bruit et $S = [s_1, \dots, s_M] \in \mathbb{R}^{M \times T}$ contient les différentes sources. En général le nombre de sources M est inconnu, et peut être plus petit, égal ou plus grand que le nombre de mesures.

La résolution d'un problème de factorisation en matrices tel que nous l'avons présenté précédemment est la forme sous laquelle la plupart des problèmes BSS sont posés aujourd'hui. A cette formulation s'ajoute la nécessité d'exploiter l'information *a priori* connue sur la nature, la morphologie ou la structure des sources recherchées (sous la forme par exemple de contraintes de non-négativité, de parcimonie, d'indépendance statistique ou encore de décorrélation spatio-temporelle [Cichocki 02, Comon 10]) sans quoi la résolution du problème de BSS propose une infinité de solution.

Parmi les méthodes de BSS les plus largement utilisées on trouve la méthode d'Analyse en Composantes Indépendantes (ICA) et ses extensions [Cichocki 09, Hyvärinen 00] – la Sparse Component Analysis (SCA) par exemple [Li 6a, Li 6b, Washizawa 6, He 07, He 8] – ou encore la FMN [Cichocki 06a, Lee 99, Sajda 03].

La méthode ICA de résolution de problèmes de BSS a été présentée à partir de 1987 ([Jutten 87]), puis formalisée pour l'analyse de mélanges linéaires par Pierre Comon en 1991 [Comon 92, Comon 4], et se base sur la contrainte d'indépendance statistique des sources recherchées.

Un large champ d'applications Le concept de BSS et les méthodes appliquées, en particulier à partir de l'ICA, ont engendré un grand nombre d'algorithmes qui touchent un large domaine d'applications [Deville 10, Adali 09, Hosseini 9, Deville 7, Puigt 5], des sciences de l'ingénieur aux sciences cognitives, dans le domaine biomédical (en spectrométrie [Ouedraogo 10], IRM ou encore en électrocardiographie), en séparation de sources audio avec des applications en musique et traitement de la parole [O'Grady 8, Smaragdis 7, Bertin 09], ou encore en géophysique et astronomie [Berne 7, Berne 9] pour analyser l'astrochimie des *Photo-Dissociation Regions* (PDRs). Un large nombre d'applications est répertorié dans l'ouvrage de référence de Cichocki sur la FMN [Cichocki 02].

Séparation de sources positives Beaucoup de problèmes de séparation de sources impliquent des données non-négatives, et dans de tels cas ne pas prendre en compte cette contrainte peut compromettre la séparation de sources et conduire à une mauvaise solution au problème. La contrainte de non-négativité est implicite à diverses méthodes de séparation de sources aveugles, comme par exemple la Factorisation en Matrices Positives (FMP) [Paatero 94, Lin 07] ou la Factorisation en Matrices Non-négatives (FMN) [Lee 99, Berry 07, Cichocki 7], et diverses combinaisons de méthodes comme la *non-negative* ICA [Oja 4, Plumbley 2, Plumbley 3, Plumbley 4, Merrih Bayat 10], ou encore la *sparse* FMN [Hoyer 04].

Parmi ces méthodes qui prennent en compte la contrainte de non-négativité – contrainte primordiale dans notre problème d'élimination de l'autofluorescence – nous présentons dans les parties suivantes deux méthodes de Séparation de Sources Aveugle positives qui ont été testées sur nos données et mettons en avant les défauts ou avantages de chacune.

4.1.2.1 Séparation Bayésienne de Sources Positives

Saïd Moussaoui s'est penché pendant sa thèse sur l'analyse physico-chimique de substances multicomposantes par des techniques spectroscopiques [Moussaoui 05b]. Les signaux mesurés sont des mélanges linéaires des spectres purs de différentes composantes de la substance. Afin d'identifier les composants de la substance et de déterminer leurs concentrations dans le milieu, Moussaoui *et al.* ont modélisé le problème sous forme de séparation de sources non-négatives [Moussaoui 04].

Ils ont développé une méthode de séparation de spectres originale, appelée BPSS (pour l'anglais *Bayesian Positive Source Separation*) [Moussaoui 05a] pour résoudre leur problème de séparation de sources aveugle. Nous proposons dans cette partie de présenter les grands axes de cette méthode.

Écriture du problème Nous cherchons à décrire des mesures mélangées comme des combinaisons linéaires de spectres que nous pourrions qualifier de *spectres purs*. Si nous considérons m signaux observés qui sont des combinaisons linéaires de n sources inconnues, pour chaque t (où t représente soit un temps, soit une fréquence, etc...), le modèle de mélange linéaire peut s'exprimer comme suit (en ne prenant pas en compte

de terme de bruit additif) :

$$v_t = As_t \quad (4.8)$$

où v_t est le $m \times 1$ vecteur de mesure, s_t est le $n \times 1$ vecteur source, et A est la matrice de mélange de taille $m \times n$. Le problème consiste à déterminer s et A .

Il y a une infinité de solutions à ce problème, ce qui impose d'ajouter de l'information *a priori* sur les sources et les coefficients de mélange.

En général, le premier *a priori* à mettre en place est l'indépendance statistique entre les sources (ce qui nous amène aux algorithmes ICA [Hyvärinen 00] où la contrainte principale à considérer est l'indépendance des sources).

Le second *a priori* porte sur la non-négativité des sources et des coefficients de mélange. Une approche bayésienne est adoptée par Moussaoui, qui apporte l'information *a priori* (notamment la non-négativité des données recherchées) sur les sources s et la matrice A .

Maximum a posteriori Les sources sont considérées indépendantes et identiquement distribuées (*i.i.d*) et de densités de probabilité $G(s_j(t), \alpha_j, \beta_j)$ pour les sources, et $G(a_{ij}(t), \delta_j, \gamma_j)$ pour les colonnes de A . Les paramètres des distributions Gamma $(\alpha_j, \beta_j, \delta_j, \gamma_j)_{j=1}^n$ constituent l'information *a priori* apporté au problème. En utilisant le théorème de Bayes, Moussaoui *et al.* expriment la loi comme :

$$\begin{aligned} \pi(s, A|v, \theta) &\propto \prod_{t=1}^N \mathcal{N}(v_t - As_t, \sigma^2 I_m) \\ &\times \prod_{t=1}^N \prod_{j=1}^n \mathcal{G}(s_j(t); \alpha_j, \beta_j) \times \prod_{i=1}^m \prod_{j=1}^n \mathcal{G}(a_{ij}(t); \delta_j, \gamma_j) \end{aligned} \quad (4.9)$$

L'algorithme cherche à maximiser la loi a posteriori définie précédemment, ou de façon équivalente, à minimiser la fonction $\Phi(s, A|\theta)$:

$$\begin{aligned} \Phi(s, A|\theta) &= -\log \pi(s, A|v, \theta) \\ &= \underbrace{\frac{1}{2\sigma^2} \sum_{t=1}^N \sum_{i=1}^m [v_i(t) - [As]_i(t)]^2}_{\text{attache aux données}} \\ &+ \underbrace{\sum_{t=1}^N \sum_{j=1}^n [(1 - \alpha_j) \log s_j(t) + \beta_j s_j(t)] + \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n [(1 - \delta_j) \log a_{ij} + \gamma_j a_{ij}]}_{\text{termes de régularisation}} \end{aligned} \quad (4.10)$$

La factorisation de v_t est obtenue par la résolution du problème d'optimisation suivant :

$$(\hat{s}, \hat{A}) = \underset{s, A}{\operatorname{argmin}} \Phi(s, A|\theta) \quad (4.11)$$

Nous ne rentrerons pas plus dans les détails en ce qui concerne cette méthode, et proposons de tester cet algorithme sur un exemple.

Exemple Afin de juger l'efficacité de cette méthode, nous reprenons une fois de plus l'exemple du mélange de sources V présenté dans la première partie de ce chapitre. Nous appliquons la routine BPSS sur le jeu de données. Le résultat d'élimination de la 1^{ère} source (assimilée à l'autofluorescence) est présenté figure 4.6 (l'ensemble des résultats sur cet exemple, spectres obtenus, ainsi que la contribution d'autofluorescence sont présentés en annexe G).

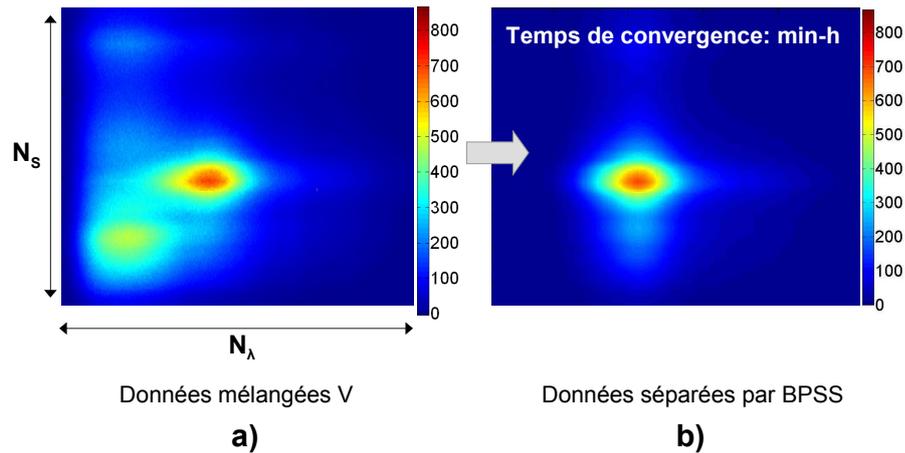


FIGURE 4.6: Élimination de l'autofluorescence des données mélangées V par BPSS : a) avant BPSS, b) après BPSS (isolement de la 2^e source d'intérêt).

Les résultats obtenus sont beaucoup plus proches de la réalité que ce qu'offraient les méthodes de soustraction de modèle ou basée sur la SVD. La contrainte de non-négativité est prise en compte dans le modèle, ainsi qu'un *a priori* sur la forme des spectres, comme expliqué dans la théorie. Ces caractéristiques permettent à la méthode, sur cet exemple, d'éliminer l'autofluorescence du mélange initial et d'obtenir les données non-négatives séparées de la seconde source d'intérêt très proches de celles attendues.

Cette méthode présente tout de même quelques inconvénients. Dans un contexte opérationnel qui est un des buts recherchés dans cette thèse, le temps de convergence est très long (de l'ordre de plusieurs minutes, voire heures avant convergence) et l'implémentation délicate. Nous ne retiendrons pas cette méthode pour cette raison. Notamment quand la régularisation demande de pouvoir modifier aisément l'algorithme, nous préférons une implémentation de base plus simple à manier, comme le propose la FMN que nous présentons maintenant.

4.1.2.2 Factorisation en Matrices Non-négatives

Après la méthode BPSS qui prend en compte la contrainte de non-négativité, il est naturel d'introduire la FMN, qui elle aussi permet de séparer des données positives.

Historique La FMN résulte des recherches en sciences de l'environnement. En effet, en 1987, Henry soulève le problème du manque d'interprétabilité physique, notamment dans les algorithmes d'analyse factorielle pour l'étude de données atmosphériques

[Henry 87]. Les chercheurs de l'époque prennent alors conscience de l'importance de la prise en compte de contraintes de positivité pour la création de modèles cohérents avec la physique.

Les prédécesseurs de la FMN Plusieurs algorithmes voient alors le jour, dont la Factorisation en Matrices Positives (FMP), prédécesseur de la Factorisation en Matrices Non-négatives. C'est au début des années 90 que Paatero et Tapper cherchent à mettre au point un algorithme d'analyses de données positives par leur factorisation en matrices elles-mêmes positives. Ces recherches aboutiront à la mise au point d'un algorithme de FMP en 1994 [Paatero 94]. Comme son nom l'indique, cet algorithme impose des contraintes de positivité sur les coefficients des matrices utilisées, et cherche à minimiser une *fonction de coût* (notion que nous retrouverons dans le paragraphe sur la Factorisation en Matrices Non-négatives à proprement parler). Cette méthode s'appuie sur une optimisation par moindres carrés alternés qui se révèle alors lourde à mettre en œuvre.

La FMN De nombreux travaux portent sur cette méthode qui a bénéficié des algorithmes récents publiés par Lee et Seung [Lee 01]. Parmi les domaines dans lesquels la méthode a été utilisée, nous pouvons citer la bioinformatique [Pascual-Montano 06] (création de l'outil *bioNMF* applicable aux données classiques de la bioinformatique), la séparation de sources audio ou le traitement de signaux de paroles [Smaragdis 7, Bertin 09, Bertin 9, Bertin 0, Abdallah 04], le *text mining* [Pauca 04] (identification automatique de caractéristiques sémantiques dans des textes) ou encore l'étude spectrale [Xu 08] (séparation de spectres purs d'auto fluorescence en imagerie du petit animal). Cette méthode n'est effectivement pas nouvelle dans les problématiques de séparation de spectres : des résultats en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire [Sajda 04], et en chimie [Gao 05] ont notamment déjà été publiés. A ma connaissance, Gobinet a été le premier à associer la FMN au domaine de la spectroscopie de fluorescence [Gobinet 04, Gobinet 06]. Tout d'abord Gobinet *et al.* appliquent cette méthode en 2004 pour séparer plusieurs spectres purs de fluorescence et obtenir une répartition spatiale des espèces chimiques des grains de blé [Gobinet 04], puis à partir de 2007 pour des spectres Raman de biopsie de peau [Gobinet 07, Gobinet 08].

Enoncé du problème L'énoncé mathématique de la FMN est le suivant :

Etant donné une matrice non-négative $V \in \mathbb{R}^{N_s \times N_\lambda}$, trouver des matrices non-négatives $A \in \mathbb{R}^{N_s \times P}$ et $S \in \mathbb{R}^{P \times N_\lambda}$ telles que :

$$V \simeq AS \tag{4.12}$$

Par matrice non-négative nous entendons une matrice dont tous les éléments sont non-négatifs, et P représente le nombre de sources fluorescentes à distinguer. Nous parlerons de coefficients **non-négatifs** lorsque les coefficients en question sont positifs ou nuls, afin de conserver le vocabulaire habituellement utilisé dans la bibliographie sur la FMN.

La FMN appliquée à la spectroscopie Les résultats de Gobinet *et al.* [Gobinet 04] en séparation de spectres par FMN se sont révélés particulièrement bien adaptés aux données spectrométriques, principalement grâce à la contrainte de non-négativité implicite à cette technique. Supposons que nous souhaitions traiter une acquisition de fluorescence V obtenue sur notre système (voir figure 2.1 du chapitre 1) ; V est nonnégative, de taille $N_s \times N_\lambda$. Si nous appliquons la FMN à la matrice V , celle-ci sera décomposée en deux matrices non-négatives A et S : A – de taille $N_s \times P$ – est considérée comme une matrice de *poids*, et S – de taille $P \times N_\lambda$ – comme la matrice de spectres, contenant le même nombre de lignes P que de sources de fluorescence à séparer. L'équation suivante illustre cette idée :

$$V \simeq \underbrace{\begin{pmatrix} a_{1,1} & \dots & a_{1,P} \\ \vdots & & \vdots \\ a_{N_s,1} & \dots & a_{N_s,P} \end{pmatrix}}_{\substack{\text{matrice de poids } A \\ P \text{ colonnes}}} \times \underbrace{\begin{pmatrix} s_{1,1} & \dots & s_{1,N_\lambda} \\ \vdots & & \vdots \\ s_{P,1} & \dots & s_{P,N_\lambda} \end{pmatrix}}_{\substack{\text{matrice de spectres } S \\ P \text{ lignes}}} \quad \left. \vphantom{\begin{pmatrix} a_{1,1} & \dots & a_{1,P} \\ \vdots & & \vdots \\ a_{N_s,1} & \dots & a_{N_s,P} \end{pmatrix}} \right\}$$

Chaque ligne de la matrice V est donc une combinaison linéaire des spectres de la matrice S , pondérés par les colonnes de A :

$$V_{\text{ligne}_i} = a_{i1} \times s_1 + \dots + a_{iP} \times s_P \quad i \in (1, N_x) \quad (4.13)$$

Exemple Nous utilisons une dernière fois notre exemple de mélange de deux sources V sur lequel nous avons testé les méthodes de séparation précédentes pour enfin lui appliquer l'algorithme de FMN classique itératif mis au point par Lee et Seung en 2001 [Lee 01] (nous reviendrons sur l'algorithmie en détails dans la partie suivante, nous proposons juste ici de donner le résultat obtenu pour justifier le choix de la méthode FMN). La contribution de la source d'intérêt isolée de la source d'auto fluorescence par l'algorithme est proposée figure 4.7 (L'ensemble des résultats sur cet exemple, spectres obtenus, ainsi que la contribution d'auto fluorescence sont présentés en annexe G).

Très comparable à ceux obtenus par la méthode BPSS et prenant en compte la contrainte de non-négativité indispensable des données, les résultats n'ont été obtenus qu'après seulement quelques secondes de traitement. Son implémentation très simple lui confère également une grande maniabilité, et nous le soumettrons facilement par la suite à plusieurs régularisations.

De plus une analyse plus poussée des spectres obtenus (voir G) montre une meilleure cohérence avec les spectres attendus sur cet exemple particulier, notamment au niveau de la forme spectrale et de la répartition des coefficients de mélange. Ce sont principalement ces diverses raisons (caractéristiques de non-négativité, simplicité d'implémentation, forme plus fidèle des spectres) qui nous ont poussés à tester cette méthode puis finalement à l'adopter définitivement. Nous ne rentrons pas dans les détails sur cette partie d'introduction, et détaillerons la méthode FMN dans les paragraphes suivants.

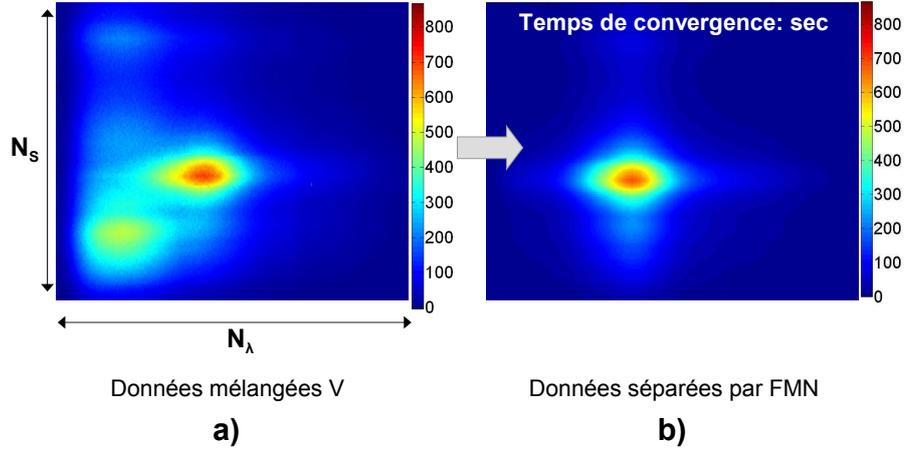


FIGURE 4.7: Élimination de l'autofluorescence des données mélangées V par FMN : a) avant FMN, b) après FMN (isolement de la 2^e source d'intérêt).

4.2 Factorisation en Matrices Non-négatives

4.2.1 Algorithme classique

Deux étapes principales sont nécessaires pour obtenir une décomposition FMN : le choix d'un critère ou *fonction de coût* qui relie les données V aux modèle AS , et la minimisation de ce critère pour obtenir le couple solution (A, S) dont le produit se rapproche au mieux des données V .

4.2.1.1 Choix de la fonction de coût

La décomposition est obtenue en minimisant une fonction de coût F . Diverses distances peuvent être utilisées. Plusieurs travaux utilisent une adaptation de la divergence de Kullback-Leibler, suite aux travaux de Lee et Seung [Lee 01]. Cichocki s'est penché sur la φ -divergence de Csiszár [Cichocki 06a] et diverses autres formulations des fonctions de coût peuvent être utilisées suivant les applications [Dhillon 06]. Nous avons eu l'occasion de tester la divergence de Kullback-Leibler entre V et AS et le carré de la distance euclidienne entre V et AS , pour finalement retenir la seconde solution. En effet, les résultats obtenus avec les différentes fonctions de coût et algorithmes associés étaient très similaires, et nous avons choisi la fonction de coût la plus simple. La simplicité de l'expression de cette distance nous permettra notamment de régulariser facilement l'algorithme de FMN. Notre fonction de coût F choisie, soit le carré de la distance euclidienne entre V et AS [Paatero 97], est définie comme suit :

$$\begin{aligned}
 F &= \|V - AS\|_2^2 \\
 &= \sum_{i=1}^{N_s} \sum_{j=1}^{N_\lambda} \left(v_{ij} - \sum_{p=1}^P a_{ip} s_{pj} \right)^2
 \end{aligned} \tag{4.14}$$

avec 0 pour borne inférieure.

4.2.1.2 Minimisation de la fonction de coût

Pour obtenir le couple (A, S) , il faut minimiser la fonction de coût F en respectant les contraintes du problème $A, S \geq 0$. Ceci s'exprime par :

Problème 1 : Trouver le couple (A, S) tel que $(A, S) = \underset{(A, S) \geq 0}{\operatorname{argmin}} \|V - AS\|_2^2$

Plusieurs méthodes de résolution peuvent être adoptées, comme une descente de gradient classique contrainte à respecter la non-négativité des matrices A et S . Xu *et al.* appliquent une descente de gradient alternativement sur les matrices A et S sur plusieurs itérations [Xu 08] pour Caliper Inc. ; cette méthode plus connue sous le nom de Alternating Least Squares (ou encore ALS pour l'anglais Alternative Least Squares).

En 2001, Lee et Seung – qui souhaitent trouver un compromis entre rapidité de convergence et facilité d'implémentation – proposent des lois de mise à jour multiplicatives itératives des matrices de poids A et de spectres S [Lee 01]. Depuis cette publication, plusieurs applications ont trouvé un intérêt à utiliser ces lois de mise à jour, comme en spectroscopie de fluorescence [Gobinet 04], ou de Raman appliquée à l'analyse de biopsies de peau [Gobinet 07]. D'autres applications en dehors du domaine de la spectroscopie ou du biomédical sont concernées, en classification de documents [Xu 03] ou pour l'analyse de données spectrales astronomiques [Pauca 06]. Nous avons choisi d'utiliser également ces lois de mises à jour, principalement pour deux raisons : leur forme multiplicative permet –pour une initialisation des matrices A et S avec des données non-négatives– de conserver la non-négativité des matrices au cours des itérations, et leur simplicité d'implémentation fait aussi d'elles de bons candidats à la régularisation, comme nous le verrons par la suite.

Lois de mise à jour multiplicatives de A et S Ces lois, inspirées des travaux sur la Factorisation en Matrices Positives [Paatero 94, Gobinet 06] et l'Espérance-Maximisation [Dempster 77], respectent les contraintes de positivité et minimisent la fonction de coût. Elles assurent en effet que la fonction F décroît au cours des itérations et converge vers un minimum local. Leur écriture est la suivante (entre parenthèses sont indiquées les itérations) :

$$a_{ip}^{(i+1)} = a_{ip}^{(i)} \frac{(VS^{t(i)})_{ip}}{(AS^{t(i)})_{ip}} \quad (4.15)$$

et

$$s_{pj}^{(i+1)} = s_{pj}^{(i)} \frac{(A^{t(i+1)}V)_{pj}}{(A^{t(i+1)}A^{(i+1)}S^{(i)})_{pj}} \quad (4.16)$$

Lee et Seung démontrent dans [Lee 01] que la fonction de coût converge vers un minimum local, et que les lois de mise à jour qui en découlent assurent sa décroissance au cours des itérations.

Dorénavant, lorsque nous parlerons de méthode FMN, il sera sous-entendu – par abus de langage – que la fonction de coût est le carré de la distance euclidienne entre V et AS ; la méthode de résolution du problème d'optimisation si elle n'est pas précisée utilise les lois de mises à jour multiplicatives que nous venons de présenter.

Nous présentons ici l'algorithme de FMN tel que nous l'avons initialement utilisé sur nos données. L'algorithme débute par l'initialisation des matrices A et S avec des coefficients tous non-négatifs et se décompose de la façon suivante :

Algorithme : FMN

1. Initialisation de A et S avec des coefficients non-négatifs
 2. Mise à jour de S : $S \leftarrow S \frac{(A^t V)}{(A^t A S)}$
 3. Mise à jour de A : $A \leftarrow A \frac{(V S^t)}{(A S S^t)}$
 4. Reprendre les étapes 2 et 3 jusqu'à ce que le critère d'arrêt soit atteint (par exemple lorsque $F = \epsilon$ pour une valeur d' ϵ choisie, ou pour un nombre d'itérations empiriquement déterminé).
-

4.2.2 Non-unicité de la décomposition

La fonction de coût F choisie n'est pas convexe pour A et S : il existe plusieurs minima locaux de la fonction, et il y a donc non-unicité de la décomposition FMN. Considérons qu'il existe une factorisation de nos données V par le produit de matrices A et S . Il suffit de trouver n'importe quelle matrice T de taille $P \times P$, alors un nouveau couple (\tilde{A}, \tilde{S}) est facilement obtenu :

$$V = \underbrace{(AT^{-1})}_{\tilde{A}} \underbrace{(TS)}_{\tilde{S}} \quad (4.17)$$

Exemple : cas de deux sources Moussaoui a fait l'étude numérique de deux sources à séparer [Moussaoui 05b], nous reprenons ici la théorie avant de l'illustrer sur nos données de spectroscopie de fluorescence. Soit une matrice initiale V de taille $N_s \times N_\lambda$, les matrices A et S sont respectivement de taille $N_s \times 2$ et $2 \times N_\lambda$:

$$A = (a_1 \quad a_2) \quad \text{et} \quad S = \begin{pmatrix} s_1 \\ s_2 \end{pmatrix} \quad (4.18)$$

Nous considérons une matrice T inversible, introduite afin de définir l'ensemble des solutions admissibles (\tilde{A}, \tilde{S}) au problème. T est alors – dans le cas de la séparation de deux sources – de taille 2×2 :

$$T = \begin{pmatrix} 1 - \alpha & \alpha \\ \beta & 1 - \beta \end{pmatrix} \quad (4.19)$$

Afin d'éviter des problèmes d'ordres indéterminés, les paramètres α et β sont contraints pour satisfaire l'inéquation $\alpha + \beta < 1$. La matrice inverse de T s'exprime alors :

$$T^{-1} = \frac{1}{1 - \alpha - \beta} \begin{pmatrix} 1 - \beta & -\alpha \\ -\beta & 1 - \alpha \end{pmatrix} \quad (4.20)$$

Nous obtenons alors les matrices $\tilde{A} = A \times T^{-1}$ et $\tilde{S} = T \times S$, dont les coefficients doivent respecter les contraintes de non-négativité :

$$\forall \lambda, \tilde{S} = \begin{pmatrix} (1 - \alpha) \times s_{1\lambda} + \alpha \times s_{2\lambda} \\ \beta \times s_{1\lambda} + (1 - \beta) \times s_{2\lambda} \end{pmatrix} \geq 0 \quad (4.21)$$

$\forall n_s,$

$$\tilde{A} = \frac{1}{1 - \alpha - \beta} \times ((1 - \beta) \times a_{n_s1} - \beta \times a_{n_s2} \quad - \alpha \times a_{n_s1} + (1 - \alpha) \times a_{n_s2}) \geq 0 \quad (4.22)$$

Gamme de solutions admissibles La résolution des inéquations précédentes pour chaque terme des matrices \tilde{A} et \tilde{S} permet de déterminer des intervalles de solutions pour les paramètres α et β [Moussaoui 05b], avec $\mathbb{k}_1 = \{\lambda; s_{1\lambda} < s_{2\lambda}\}$ et $\mathbb{k}_2 = \{\lambda; s_{1\lambda} > s_{2\lambda}\}$:

$$\max_{\lambda \in \mathbb{k}_1} \left\{ \frac{s_{1\lambda}}{s_{1\lambda} - s_{2\lambda}} \right\} \leq \alpha \leq \min \left\{ \frac{a_{n_s2}}{a_{n_s1} + a_{n_s2}} \right\} \quad (4.23)$$

$$\max_{\lambda \in \mathbb{k}_2} \left\{ \frac{-s_{2\lambda}}{s_{1\lambda} - s_{2\lambda}} \right\} \leq \beta \leq \min \left\{ \frac{a_{n_s1}}{a_{n_s1} + a_{n_s2}} \right\} \quad (4.24)$$

Pour ces valeurs de α et β sont définies des gammes de solutions admissibles à l'équation de la Factorisation en Matrices Non-négatives (FMN) développée en 4.12.

Illustration Nous proposons une brève simulation du cas de deux sources qui vient d'être exposé. Une fois l'algorithme de Factorisation en Matrices Non-négatives (FMN) appliqué à des données mélangées, un couple solution (A, S) est trouvé. Nous choisissons pour notre exemple une telle solution (obtenue sur données réelles), pour deux sources de fluorescence (l'autofluorescence et la fluorescence de type ICG-LNP des marqueurs) (voir figure 4.8, courbes en noir) .

Comme présenté dans l'exemple théorique précédent de deux sources, nous déterminons les intervalles acceptables des paramètres α et β de la matrice T inversible. Nous obtenons $\alpha_{min} = -0.1076$, $\alpha_{max} = 0.2338$, $\beta_{min} = -0.0568$ et enfin $\beta_{max} = 1.2001e - 072$. Nous calculons les matrices T correspondant à ces paramètres, et traçons l'ensemble des solutions admissibles qui retournent la même valeur du critère que la solution initiale. Le résultat est présenté figure 4.8.

Nous constatons que des écarts non négligeables existent entre les différentes solutions. Cela dit, par exemple dans l'étude des solutions de la matrice S , nous ne nous intéressons pas ici en détail à la forme du spectre, mais recherchons surtout à localiser puis isoler la fluorescence d'intérêt des marqueurs de l'autofluorescence. Quelle que soit la solution choisie dans la gamme précédente, la localisation de la fluorescence des marqueurs reste possible.

En pratique, la gamme de solution admissible ne paraît pas aussi étendue : la figure 4.9 présente les résultats obtenus lorsque l'algorithme de FMN est testé successivement 500 fois, avec à chaque lancement une initialisation aléatoire des matrices A et S .

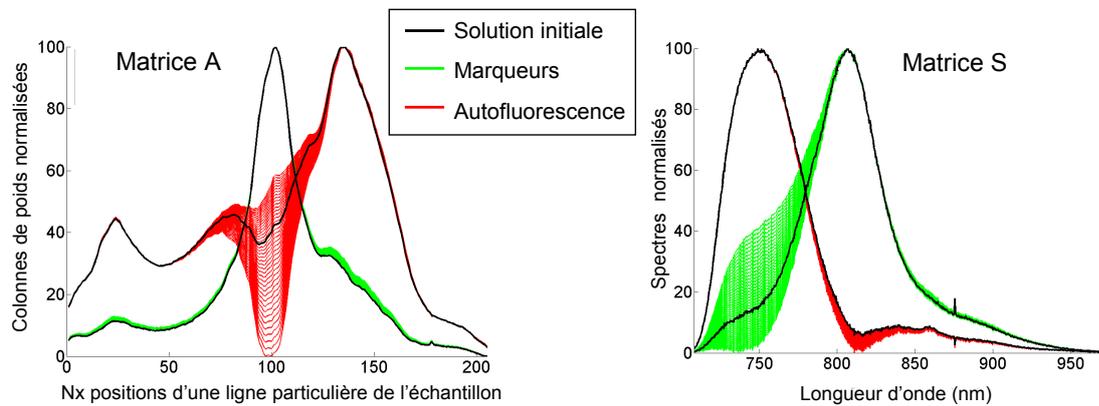


FIGURE 4.8: Gamme de solutions des matrices A et S d'après la théorie [Moussaoui 05b].

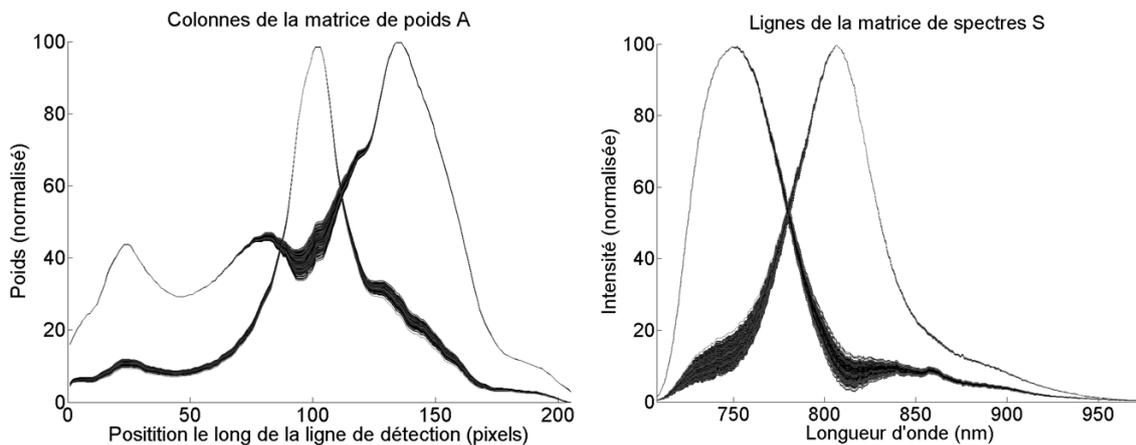


FIGURE 4.9: Solutions obtenues pour A et S après répétition de l'algorithme FMN 500 fois

En comparaison avec la théorie, la variation des spectres apparaît cette fois minimisée, pour cet exemple en particulier. Bien que la détection ne soit pas forcément compromise par l'écart des spectres d'un résultat à l'autre, nous nous intéressons par la suite à restreindre au mieux la gamme de solutions, et à nous rapprocher de l'unicité. Ceci sera développé dans la partie suivante.

Bilan Sans aucune contrainte sur la fonction de coût F ou d'information *a priori* apportée lors de l'étape d'optimisation, il existe une infinité de factorisations de la matrice de départ V . Une des premières contraintes imposée par la physique est ici la contrainte de non-négativité, que nous prenons en compte implicitement en utilisant l'algorithme de FMN décrit ci dessus.

Des techniques supplémentaires sont nécessaires pour réduire l'ambiguïté de la factorisation non-unique FMN. L'ajout de contraintes à la fonction de coût, et d'information *a priori* restreint la gamme de solutions, et peut permettre de résoudre le problème de façon unique [Cichocki 09].

4.2.3 Distorsion des spectres de fluorescence et indétermination du nombre de sources

Nous nous penchons maintenant sur le problème pratique qu'est la distorsion des spectres et l'indétermination du nombre de sources qui en résulte. En effet, la décomposition FMN retourne un spectre moyen par source fluorescente recherchée dans le milieu. Nous avons vu dans les chapitres précédents que le spectre d'autofluorescence varie peu d'une localisation à l'autre d'une zone d'intérêt analysée. Le spectre de fluorescence des marqueurs peut quant à lui connaître des distorsions suivant la profondeur à laquelle les marqueurs sont détectés. Si la distorsion des spectres est trop importante, le modèle et le nombre de sources à rechercher doit être adapté en conséquence.

4.2.3.1 Principe

Nous avons présenté les simulations sur données du sein dans le chapitre 2, et un exemple de distorsion des spectres dans le chapitre 3 sur ce type de simulations. Dans cette partie nous proposons comme exemple un ensemble de simulations où des marqueurs fluorescents sont situés à différentes profondeurs (de 0,1 à 10 cm dans les tissus autofluorescents). Le contraste initial (marqueurs à 1 mm de profondeur) entre la zone tumorale et les tissus sains est égal à 0,8, ce qui correspond à un rapport tumeur/tissus sain de 14 (cf résultats de [Jin 07]). La figure 4.10 présente l'évolution de l'intensité du signal de la tumeur en fonction du fond fluorescent, suivant la profondeur à laquelle la tumeur est simulée. Ici nous proposons les acquisitions qui simulent le signal émis par les marqueurs jusqu'à 2,5 cm ; les acquisitions suivantes seraient similaires. Comme présenté dans le chapitre 2, les calculs se basent sur les données optiques du sein tirées de la bibliographie [Cerussi 01].

La figure 4.11-a donne l'allure des spectres des marqueurs mesurés, également selon la profondeur de la tumeur dans les tissus.

La distorsion des spectres s'accompagne également d'une perte d'intensité du signal d'intérêt des marqueurs avec la profondeur : nous proposons une illustration de ce phénomène sur la figure 4.11-b, toujours sur les mêmes données simulées du sein, pour des marqueurs de 0.1 cm (intensité à $3,5 \times 10^4$) à 10 cm (intensité à $1,5 \times 10^{-3}$) de profondeur dans les tissus.

4.2.3.2 Indétermination du nombre de sources

Jusqu'à présent nous avons raisonné en considérant que le nombre de sources à séparer serait toujours connu : l'autofluorescence, plus une source par type de marqueur fluorescent injecté dans le milieu.

Mais lorsque plusieurs tumeurs sont présentes dans le milieu et marquées par un même fluorophore, et qu'elles se trouvent à des profondeurs différentes les unes des autres, les spectres d'émission des marqueurs peuvent s'avérer relativement différents suivant leur localisation (voir exemple précédent, figure 4.11). Dans de tel cas, **la question se pose de savoir si un spectre moyen suffira à décrire les spectres de tumeurs marquées par un même fluorophore à différentes profondeurs dans**

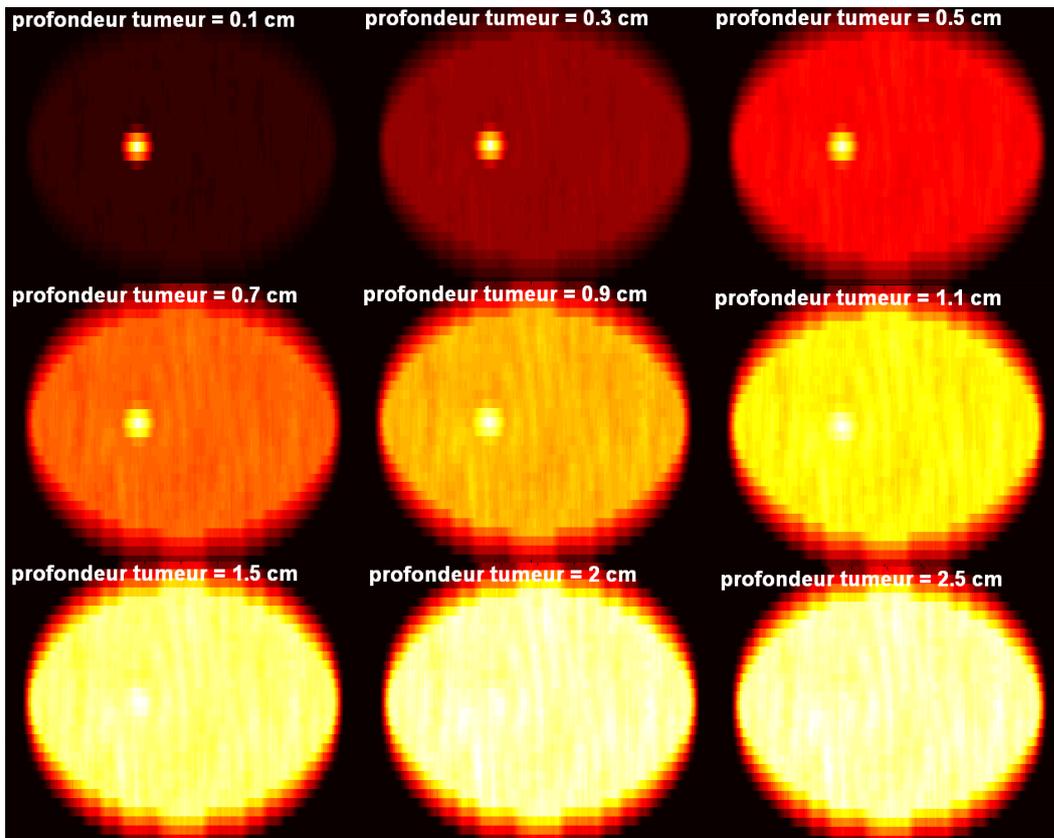


FIGURE 4.10: Simulation d'une tumeur dans un sein autofluorescent : intensité obtenue pour différentes profondeurs simulées (de 1 mm à 2,5 cm). La contribution d'autofluorescence reste constante, seule l'intensité des marqueurs diminue exponentiellement avec la profondeur.

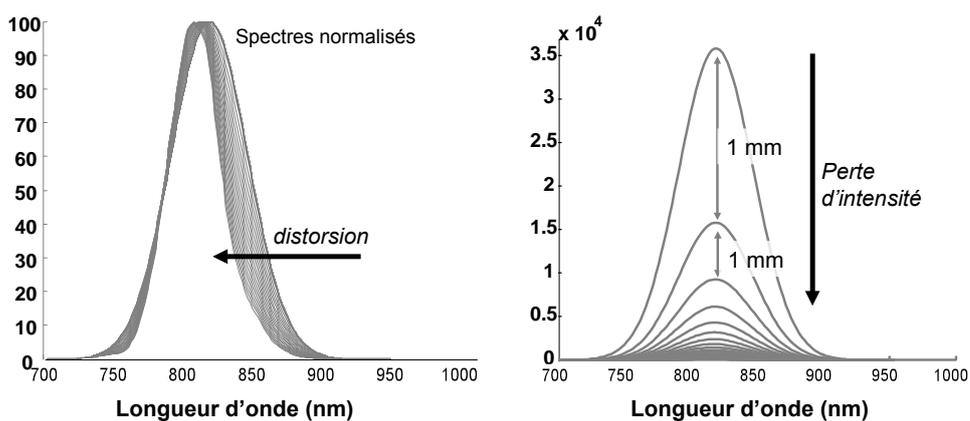


FIGURE 4.11: Cas simulé du sein, pour des marqueurs déplacés dans les tissus de 0,1 à 10 cm de profondeur : a) Distorsion des spectres, b) Décroissance de l'intensité du signal.

la décomposition FMN, ou si le nombre de sources à séparer doit être incrémentée.

Lorsque nous avons présenté la SVD dans les paragraphes précédents, nous avons précisé que l'analyse de cette décomposition pouvait nous donner une information sur le nombre de sources dans le milieu. Nous avons vu que la décomposition d'un signal V en valeurs singulières retourne trois matrices U , Σ et W telles que $V = U\Sigma W^T$. L'analyse des valeurs singulières de la matrice diagonale Σ permet de déterminer le nombre de sources prédominantes du milieu (cf. figure 4.4).

Exemple Nous allons utiliser cet outil dans l'étude de la simulation du sein : nous plaçons une tumeur marquée à une profondeur fixée de 0,1 cm, et une autre tumeur marquée à des profondeurs variables, de 0,1 cm à 10 cm dans le milieu autofluorescent. Les deux tumeurs simulées se trouvent à des localisations différentes (voir figure 4.12).

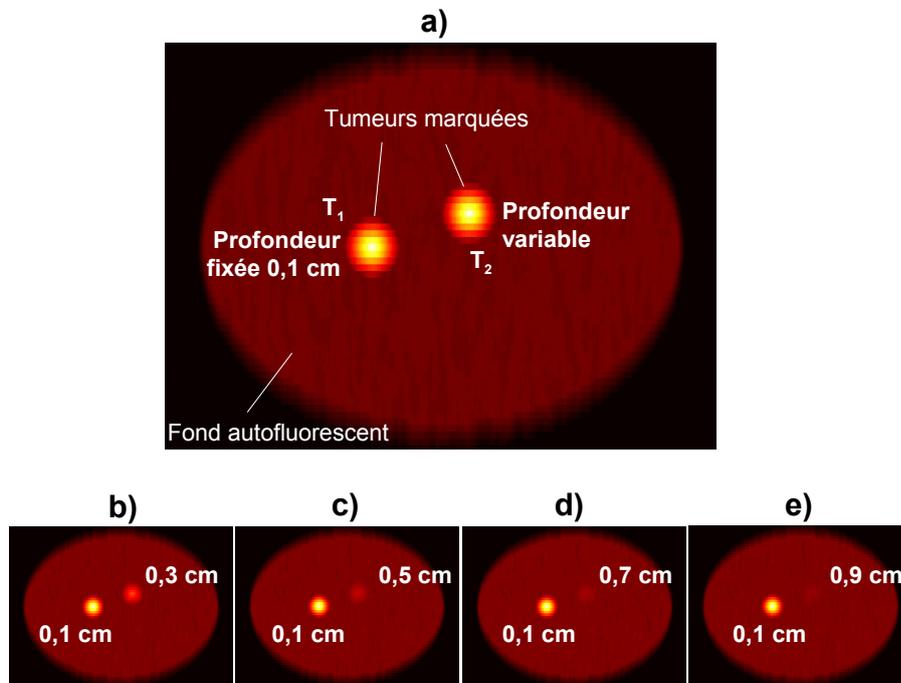


FIGURE 4.12: Simulation avec deux tumeurs. a) Modèle simulé : deux tumeurs marquées par un même marqueur dans un milieu autofluorescent. La profondeur d'une des tumeur est fixée à 0,1 cm tandis que l'autre varie de 0,1 cm à 10 cm. b), c), d) et e) Exemples de simulations obtenues lorsque la profondeur de la seconde tumeur est modifiée.

Dans un premier temps, nous considérons uniquement que le déplacement des marqueurs dans les tissus a un effet sur la forme des spectres (nous laissons de côté la perte d'intensité qui sera évaluée après, et ne considérons que l'effet de distorsion ; voir figure 4.11-a). Pour chaque profondeur des marqueurs, nous effectuons une SVD des données simulées, et traçons les valeurs singulières. Le résultat est présenté figure 4.13 : Plus l'écart entre les deux tumeurs marquée est important, donc plus la distorsion entre les deux spectres des tumeurs mesurés est importante, plus la valeur de la troisième valeur

singulière sera non négligeable. Pour des distorsions importantes (à partir de 5 cm par exemple sur cet exemple), la séparation de sources demanderait donc d'incrémenter le nombre de sources à séparer.

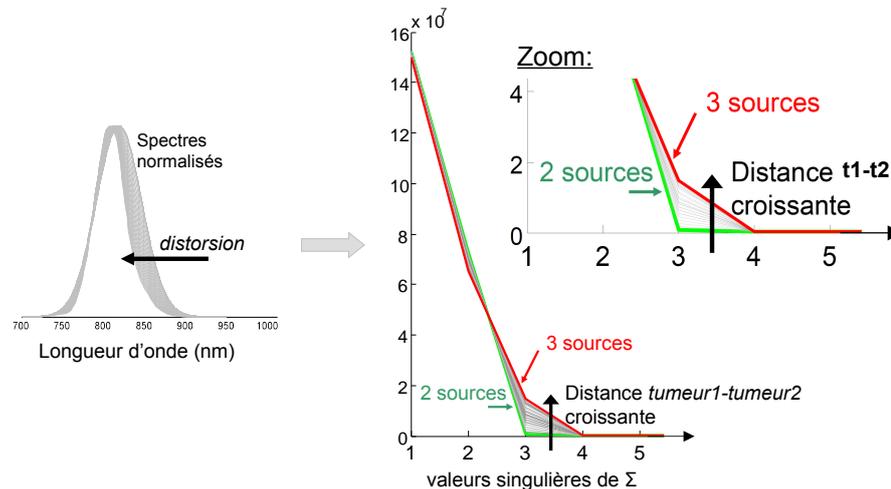


FIGURE 4.13: Valeurs singulières obtenues après SVD sur les données de simulation issues de la figure 4.10. En ne considérant que la distorsion des spectres des marqueurs avec la profondeur, la distance croissante entre les deux tumeurs marquées est responsable de l'apparition d'une troisième source dans le milieu.

L'influence de la décroissance de l'intensité des marqueurs avec la profondeur est maintenant analysée. Comme nous l'avons présenté pour l'exemple du sein, l'intensité du signal des marqueurs décroît exponentiellement. Nous prenons en compte cette fois cette perte d'intensité en plus de la distorsion des spectres et calculons les valeurs singulières issues de Σ après SVD, pour chaque profondeur des marqueurs. Le résultat est présenté figure 4.14

La SVD ne distingue seulement que deux sources de fluorescence à séparer (l'auto-fluorescence et seul un marqueur fluorescent) : **l'intensité du signal de la seconde tumeur marquée décroît trop vite avec la profondeur pour que la distorsion de son spectre fasse apparaître une troisième source dans le milieu. La distorsion des spectres est un phénomène négligeable face à la décroissance du signal des marqueurs avec la profondeur.**

Bilan Sur un cas réel, proche de celui simulé sur le sein, la distorsion des spectres n'aura a priori pas d'effet sur le nombre de sources du milieu à considérer. En effet, **la décroissance exponentielle du signal des marqueurs fluorescents avec la profondeur de tissus parcourue fait perdre le signal d'une tumeur avant que la distorsion de son spectre n'ait pu avoir d'effet sur le nombre de sources du milieu.** Dans le cas de plusieurs tumeurs marquées par un même fluorophore dans le milieu, la recherche d'un spectre moyen pour toutes ces tumeurs par l'algorithme de FMN est suffisante et le nombre de source pourra être fixé en considérant qu'une source décrit le signal d'autofluorescence, puis que chaque type de marqueurs injecté dans le

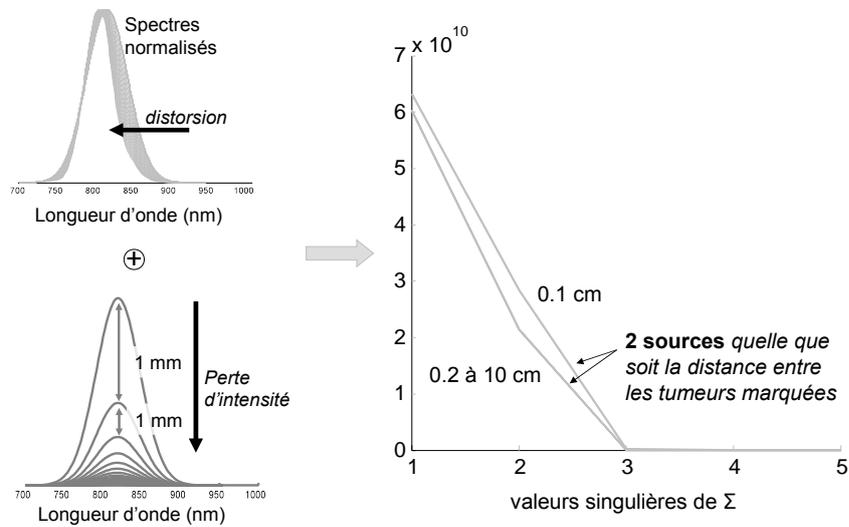


FIGURE 4.14: Valeurs singulières obtenues après SVD sur les données. En la décroissance de l'intensité du signal des marqueurs et la distorsion des spectres avec la profondeur, la distance croissante entre les deux tumeurs marquées n'a pas d'effet sur le nombre de sources dans le milieu.

milieu ajoute une source de fluorescence. Nous en verrons un exemple dans le chapitre suivant.

Après avoir présenté la FMN classique et décrit l'influence de la profondeur des marqueurs sur les résultats, nous proposons une étude sur la régularisation (sur l'initialisation et la parcimonie) qui nous permettra de proposer des variantes originales de FMN pour l'étude.

4.3 Propositions de régularisations de la FMN et prise en compte de l'information *a priori*

Bien que la distorsion des spectres ne soit pas considérée comme un problème dans l'utilisation de la FMN sur nos données, la non-unicité reste quant à elle un point important à prendre en compte. Dans le but de restreindre la gamme de solutions admissibles, nous proposons dans cette partie plusieurs variantes d'algorithmes de FMN qui tiennent compte de l'initialisation et de l'information *a priori* sur les fluorophores du mélange.

4.3.1 Étude de l'influence de l'initialisation

L'initialisation des matrices A et S est fondamental, et la décomposition FMN obtenue dépend directement des estimations de A et S proposées au départ. Ici nous proposons sur un exemple simulé de juger de l'influence de l'initialisation sur le résul-

tat de la décomposition. Pour cela nous reprenons la simulation du sein introduite au second paragraphe ; nous simulons une tumeur ciblée par des marqueurs fluorescents, dont le spectre d'émission se rapproche de l'ICG-LNP dans un environnement auto-fluorescent (voir chapitre 2, partie 2.3, et figure 4.15). Nous faisons varier la profondeur des marqueurs de 0,1 à 4 cm pour être certains que les résultats observés sur l'effet de l'initialisation s'appliquent à tous les problèmes de détection posés.

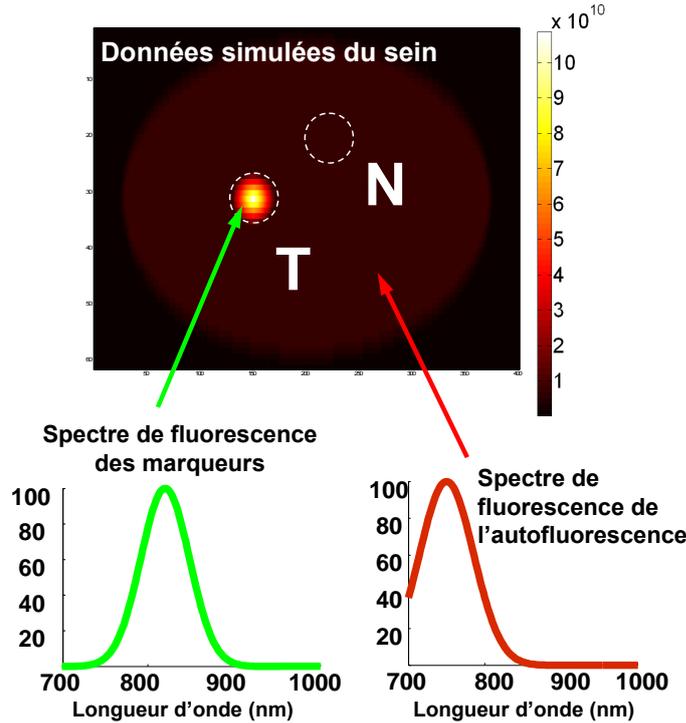


FIGURE 4.15: Simulation de spectres de fluorescence de marqueurs et d'autofluorescence (en bas), et répartition spatiale des différents fluorophores (en haut).

Ici nous nous intéressons à obtenir le meilleur contraste possible entre la tumeur marquée (zone T) et les tissus environnants (zone N).

Nous rappelons la définition du contraste. L'intensité moyenne de fluorescence (en photons par pixel) est mesurée sur les deux zones d'intérêt, \bar{T} pour la zone T de la tumeur, et \bar{N} pour la zone N des tissus sains, et le contraste $C_{T,N}$ se définit alors comme :

$$c_{T,N} = \frac{\bar{T} - \bar{N}}{\bar{T} + \bar{N}} \quad (4.25)$$

$C_{T,N}$ varie entre 0 et 1 : plus sa valeur est proche de 1, meilleure sera la détection.

4.3.1.1 Intérêt de l'utilisation de modèles de spectres pour initialiser la matrice S

Nous allons tester plusieurs initialisations, et calculer le contraste obtenu sur la contribution séparée des marqueurs fluorescents. Dans un premier temps pour avoir

une référence, nous calculons le contraste obtenu sans qu'aucune méthode FMN de séparation de spectres ne soit appliqué aux données, suivant la profondeur à laquelle se trouvent les marqueurs fluorescents. Le contraste et la détection se dégradent naturellement avec la profondeur des marqueurs dans le milieu (dès 5 mm, voir figure 4.16) face à la présence de plus en plus gênante et non traitée de l'autofluorescence (contraste égal à 0,8 à 2 mm de profondeur).

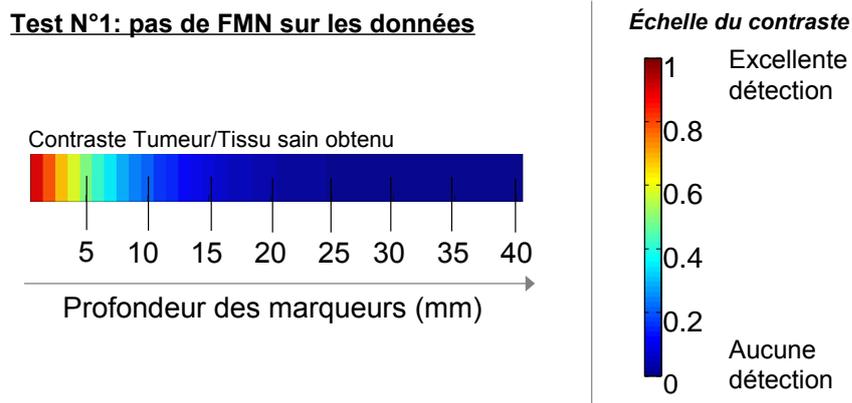


FIGURE 4.16: *Aucune séparation par FMN n'est appliquée aux données : contraste obtenu selon la profondeur des marqueurs simulés dans le milieu autofluorescent (gauche). Échelle de couleurs à droite.*

Nous mesurons maintenant le contraste obtenu sur les mêmes données simulées, mais en appliquant cette fois-ci l'algorithme FMN, avec une **initialisation des matrices A et S aléatoire** (fonction *random* de Matlab) en faisant une moyenne du contraste pour 30 tirs à chaque profondeur : le résultat est présenté figure 4.17.

Nous observons que le contraste est meilleur (contraste égal à 0,8 à 8 mm de profondeur), et donc la détection des marqueurs est améliorée pour des faibles profondeurs des marqueurs. Mais la détection reste compromise dès que la profondeur atteint et dépasse 1 cm. L'utilisation de la FMN pour l'élimination de l'autofluorescence a quand même été bénéfique, comparé aux résultats sans séparation de sources.

Enfin, nous proposons de nous placer dans le cas idéal, où l'on suppose que l'on connaît parfaitement la forme des spectres de fluorescence à détecter : nous initialisons la matrice S non plus avec des fonctions aléatoires mais avec des spectres de fluorescence, ici égaux aux spectres simulés, et une fois de plus, nous mesurons le contraste obtenu selon la profondeur des marqueurs (voir figure 4.18). Le contraste et la détection sont améliorés : nous gagnons environ 1 cm de profondeur en utilisant une initialisation plus précise, et non plus aléatoire (contraste égal à 0,8 à 12 mm de profondeur).

L'utilisation de modèles de spectres pour l'initialisation de S permet de restreindre l'ensemble des solutions de la décomposition FMN, et d'obtenir des séparations plus efficaces : le contraste et donc la détection et localisation des marqueurs sont donc eux aussi considérablement améliorés. La détection est perfectionnée pour les marqueurs à

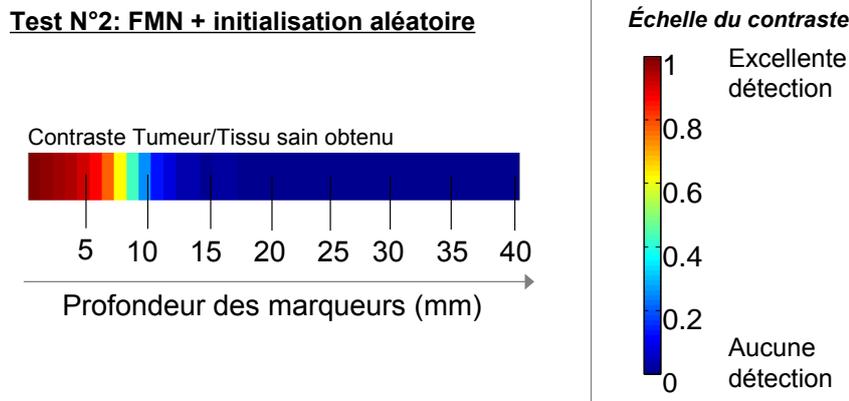


FIGURE 4.17: On sépare les sources de fluorescence, avec l'algorithme de FMN classique, et pour des *initialisations aléatoires* des matrices A et S . Contraste obtenu selon la profondeur des marqueurs simulés dans le milieu autofluorescent (gauche).

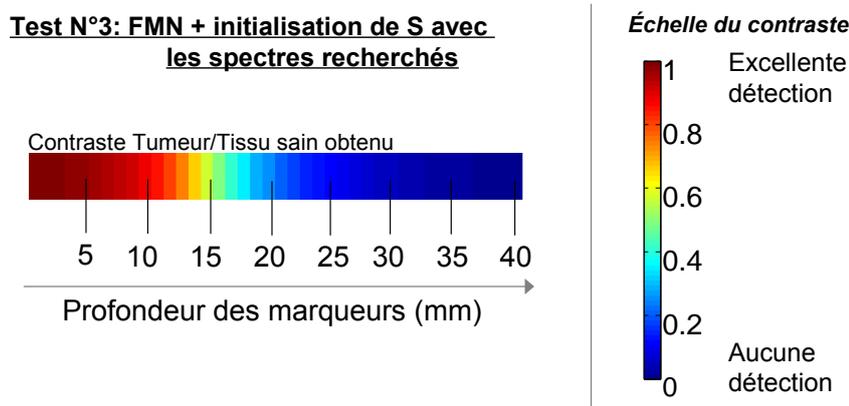


FIGURE 4.18: On sépare les sources de fluorescence, avec l'algorithme de FMN classique, et pour une *initialisation de la matrice S identique au spectre attendu* : contraste obtenu selon la profondeur des marqueurs simulés dans le milieu autofluorescent.

de faibles profondeurs, et la limite de détection est doublée. Nous pouvons conclure que **le traitement des données par FMN, sans aucun *a priori* sur les fluorophores améliore la détection. L'ajout d'information *a priori* sur l'initialisation, et notamment sur la forme des spectres de fluorescence, permet d'affiner encore la détection.**

Nous proposons maintenant une étude sur l'effet du décalage en longueur d'onde des initialisations sur le résultat de séparation obtenu.

4.3.1.2 Étude de l'influence du décalage de l'initialisation : vers une initialisation à départs multiples.

La partie précédente met en avant l'intérêt de l'utilisation de modèles de spectres dans l'initialisation de la matrice S . Dans cette partie, nous analysons l'influence de la position en longueur d'onde des spectres d'initialisation. Pour cela, nous choisissons un spectre de forme fixée (celle des spectres simulés) et nous translatons les spectres d'initialisation en longueur d'onde pour observer l'influence sur la décomposition FMN obtenue. Nous testons ici 10 initialisations distinctes de la matrice S correspondant à la translation simultanée des spectres d'autofluorescence et de fluorescence des marqueurs, de -50 nm à $+50$ nm par pas de 10 nm autour des spectres simulés, comme expliqué figure 4.19.

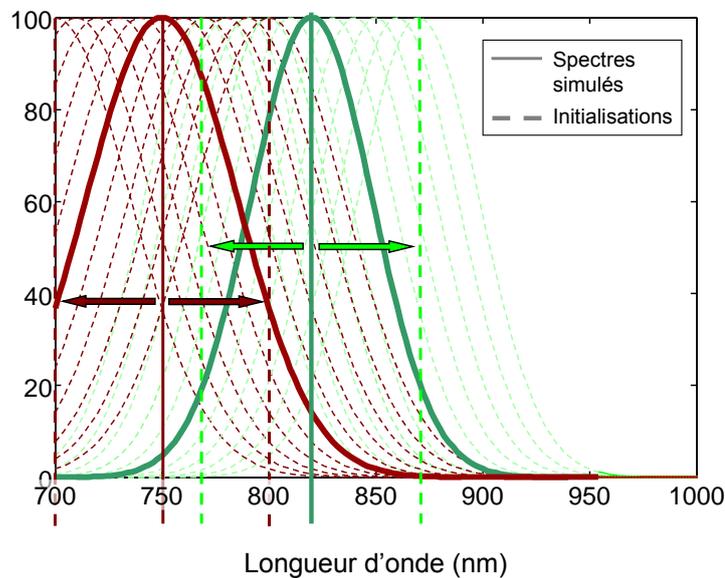


FIGURE 4.19: Translation des spectres simulés de -50 nm à $+50$ nm autour de la position en longueur d'onde choisie pour la simulation : définition d'une gamme d'initialisations à tester pour S .

Pour chaque translation des spectres simulés, nous lançons l'algorithme de FMN, et une fois de plus nous mesurons la valeur du contraste tumeur/tissu sain sur les données séparées. Les résultats obtenus sont présentés figure 4.20 : la translation de l'initialisation vers le rouge permet d'obtenir une meilleure séparation des spectres de fluorescence, et améliore considérablement le contraste. Choisir une initialisation dont l'émission est proche du spectre recherché n'est pas forcément la meilleure solution.

Ici, nous expliquons les résultats de la façon suivante : il est plus difficile de déterminer le spectre de fluorescence des marqueurs à partir des données initiales où l'autofluorescence est majoritaire. En décalant l'initialisation vers les longueurs d'onde rouges, on s'éloigne de la zone de chevauchement entre les spectres de l'autofluorescence et des marqueurs, ce qui permet de donner plus de liberté à la recherche du spectre des

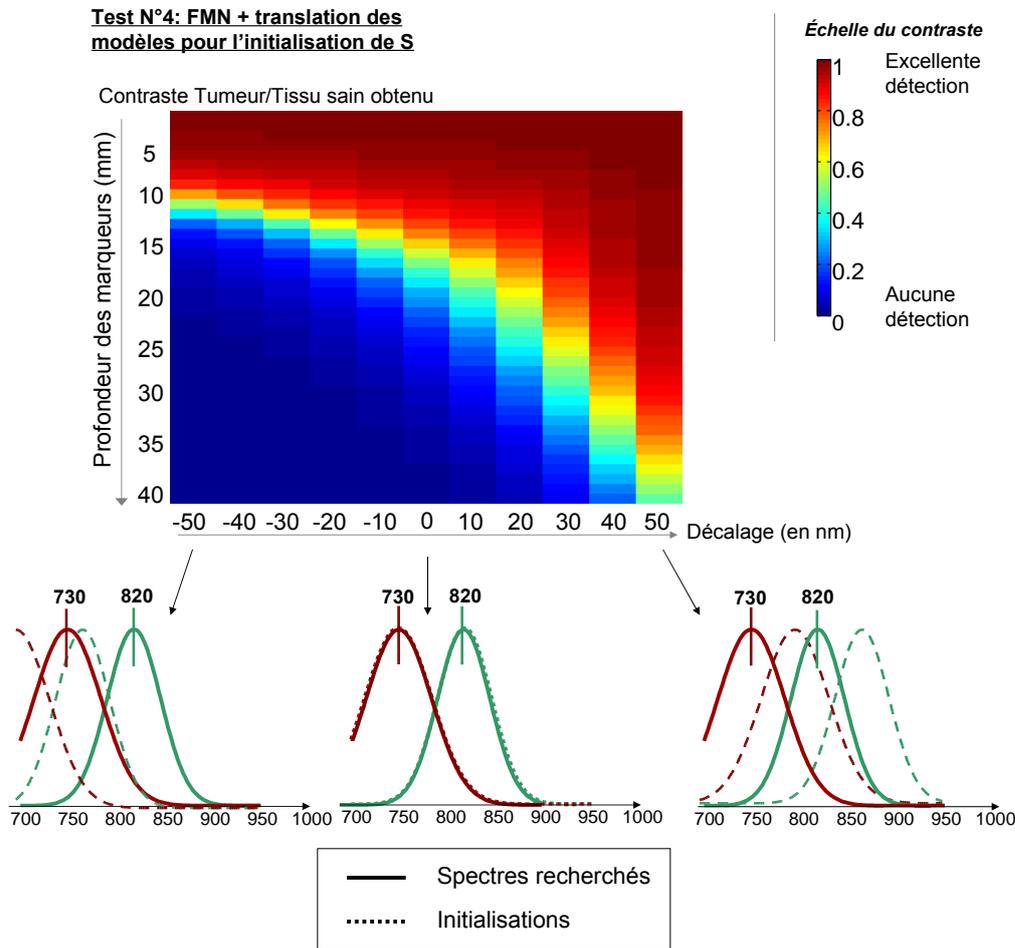


FIGURE 4.20: On sépare les sources de fluorescence, avec l'algorithme de FMN après l'initialisation de la matrice S avec des gaussiennes à différents pics d'émission : contraste obtenu selon la profondeur des marqueurs simulés dans le milieu autofluorescent, et selon le décalage spectres simulés - spectres d'initialisation.

marqueurs. De plus, en décalant l'initialisation vers les longueurs d'onde plus basses, on choisit des initialisations (notamment pour l'autofluorescence) de plus en plus éloignées d'un spectre complet, ce qui pénalisera la décomposition.

Enfin nous pouvons noter que même dans le cas où l'initialisation est la moins adaptée (décalage à -50 nm), le contraste obtenu est toujours meilleur que pour une initialisation aléatoire des matrices A et S .

Cet exemple souligne la difficulté du choix de l'initialisation qui est un problème connu avec la FMN. Pour faire face à cette situation, nous adaptons l'algorithme de FMN selon l'idée de Cichocki [Cichocki 09], en proposant une étape supplémentaire permettant d'optimiser l'initialisation.

4.3.1.3 Nouvel algorithme avec initialisation à départs multiples

Cette étape supplémentaire dans l'algorithme consiste à tester plusieurs initialisations (par exemple en testant plusieurs spectres translatés pour S , ou en modifiant la forme du spectre modèle) sur très peu d'itérations, et de calculer la valeur de la fonction de coût obtenu (Cichocki *et al.* parlent de *multi-start initialization step* [Cichocki 09]). L'idée principale est que les initialisations qui permettent d'obtenir le meilleur contraste $C_{T,N}$ sont considérées comme les mieux adaptées pour poursuivre l'étape de minimisation de F . Ici la zone T recherchée pourra être initialement localisée en faisant tourner quelques itérations de l'algorithme de FMN classique, et en sélectionnant l'intensité maximale sur les données séparées des marqueurs. En pratique, nous avons déterminé qu'une dizaine d'itérations (soit quatre à cinq secondes maximum pour une vingtaine d'initialisation testées) permettait d'avoir une bonne information de l'initialisation à sélectionner. L'algorithme de FMN ainsi modifié est le suivant (les nouveautés sont en bleu) :

Algorithme : FMN avec initialisation à départs multiples \mathbf{FMN}_{dm}

1. Détermination de la zone T de la tumeur après quelques itérations (environ une dizaine).
 2. Test de plusieurs initialisations (pour A et/ou S) et calcul du contraste $C_{T,N}$ après quelques itérations (environ une dizaine) sur les données séparées des marqueurs.
 3. Choix de l'initialisation de A et S retournant le meilleur contraste $C_{T,N}$.
 4. Mise à jour de S : $S \leftarrow S \frac{(A^t V)}{(A^t A S)}$
 5. Mise à jour de A : $A \leftarrow A \frac{(V S^t)}{(A S S^t)}$
 6. Reprendre les étapes 4 et 5 jusqu'à ce que le critère d'arrêt soit atteint (par exemple lorsque $F = \epsilon$ pour une valeur d' ϵ choisie, ou pour un nombre d'itérations empiriquement déterminé).
-

4.3.2 Prise en compte de l'information *a priori* sur les spectres : nouvelle régularisation liée à l'initialisation

Diverses méthodes FMN hybrides, avec de nouvelles lois de mise à jour multiplicatives des matrices A et S ont d'ores et déjà été proposées. La plupart repartent des lois de mise à jour multiplicatives classiques proposées Lee et Seung [Lee 01], et s'intéressent à des contraintes de parcimonie ou de lissage [Cichocki 06b, Berry 07, Chen 05]. Kim et Park [Kim 08] se sont intéressés aux algorithmes de FMN parcimonieux par l'introduction d'un terme de contrainte en norme L_1 , Cichocki *et al.* ont présentés des lois de mise à jour non plus basées sur la minimisation de la divergence de Kullback-Leibler, mais sur la φ -divergence de Csiszár [Cichocki 06a] tandis que d'autres approches s'intéressent à d'autres formulations des fonctions de coût [Hamza 06, Dhillon 06].

Dans le même état d'esprit, nous nous sommes intéressés aux lois de mise à jour multiplicatives de Lee et Seung, et avons voulu en déterminer de nouvelles adaptées à notre étude.

À la suite de l'étude de la partie précédente sur l'initialisation, nous avons donc choisi d'initialiser notre matrice de spectres S avec des modèles de spectres de fluorescence, ou des formes proches (gaussiennes). Mais nous souhaitons pouvoir contrôler la distance entre les spectres initiaux et ceux obtenus par l'algorithme. En effet, nous pouvons imaginer que dans certains cas, bien que la séparation soit aveugle, nous possédions des informations sur le spectre recherché, ou sur la matrice de mélange des fluorophores. Cette information peut donc être directement utilisée, en modifiant la fonction de coût à minimiser.

Si l'on souhaite contrôler la forme des spectres obtenus par l'algorithme, la nouvelle fonction de coût F_2 à minimiser peut s'écrire ainsi :

$$F_2 = \sum_{n=1}^{N_s} \sum_{\lambda=1}^{N_\lambda} \left(v_{n\lambda} - \sum_{p=1}^P a_{np} s_{p\lambda} \right)^2 + \sum_{p=1}^P \alpha_p \times \sum_{\lambda=1}^{N_\lambda} (s_{p\lambda} - s_{0p\lambda})^2 \quad (4.26)$$

ou encore sous la forme matricielle suivante :

$$F_2 = (V - AS)^t (V - AS) + (S - S_0)^t D_\alpha (S - S_0) \quad (4.27)$$

où S_0 est l'initialisation de la matrice S , et $D_\alpha = \text{diag}[\alpha_1 \ \alpha_2 \ \dots \ \alpha_p]$ est une matrice diagonale qui contient les P paramètres α_p de régularisation associés aux P spectres de la matrice $(S - S_0)$. La minimisation de la fonction F_2 par des lois inspirées de Lee et Seung peut être réalisée par l'algorithme de FMN mis au point par Berry *et al.* en 2007 [Berry 07]. Mais nous proposons ici de nouvelles lois de mises à jour différentes par leur formulation et leurs performances (nous proposerons un exemple après) de celles de Berry *et al.* :

Théorème 1 *La fonction F_2 est non-croissante, sous les lois de mise à jour suivantes :*

$$S_{p\lambda} \leftarrow S_{p\lambda} \frac{(A^t V + D_\alpha S_0)_{p\lambda}}{(A^t AS + D_\alpha S)_{p\lambda}} \quad A_{np} \leftarrow A_{np} \frac{(V S^t)_{np}}{(A S S^t)_{np}} \quad (4.28)$$

Après avoir démontré la convergence de ces nouvelles lois de mise à jour, nous proposons une nouvelle écriture de l'algorithme de FMN (la démonstration est proposée en annexe H : notons qu'en inversant les rôles de S et A dans la démonstration, nous pouvons démontrer de la même façon que la fonction $(V - AS)^t (V - AS) + (A - A_0)^t D_\alpha (A - A_0)$ ne croît pas sous des lois de mise à jour équivalentes pour A).

4.3.2.1 Nouvel algorithme

Ces lois de mise à jour ont l'avantage de conserver la positivité des initialisations de A et S au cours des itérations, tandis que les lois de mise à jour de Berry *et al.* qui

minimisent la même fonction de coût ne présentent pas cet avantage. Ces mêmes lois de mise à jour de Berry *et al* nécessitent que la valeur du paramètre de régularisation α soit suffisamment petit [Berry 07], tandis que nos lois de mise à jour ont l'intérêt de ne pas présenter de condition comparable et ainsi sont plus robustes pour des valeurs de α élevées.

Nous proposons donc une nouvelle écriture de l'algorithme de FMN pour les problématiques qui nécessiteraient l'utilisation de cette régularisation particulière :

Algorithme : FMN avec régularisation sur l'initialisation \mathbf{FMN}_{ri}

1. Initialisation de A avec des coefficients non-négatifs et de S avec des modèles de spectres proches des spectres attendus
 2. Mise à jour de S : $S \leftarrow S \frac{(A^t V + \alpha S_0)}{(A^t A S + \alpha S)}$
 3. Mise à jour de A : $A \leftarrow A \frac{(V S^t)}{(A S S^t)}$
 4. reprendre les étapes 2 et 3 jusqu'à ce que le critère d'arrêt soit atteint (par exemple lorsque $\|V - AS\|^2 = \epsilon$ pour une valeur d' ϵ choisie, ou pour un nombre d'itérations empiriquement déterminé).
-

Exemple Nous proposons maintenant un exemple de solution obtenue par ce nouvel algorithme. Nous considérons un mélange de deux fluorophores, dont les spectres de fluorescence sont proches de ceux de l'autofluorescence et de la fluorescence de l'ICG-LNP.

Nous considérons le vecteur de régularisation $\alpha = [\alpha_{ICG-LNP} \ \alpha_{autofluo}]$. Suivant les valeurs imposées au vecteur, nous pouvons soit contraindre le spectre d'ICG-LNP, soit le spectre d'autofluorescence à rester proche de son spectre initial. Pour l'exemple présenté sur la figure 4.21, nous avons laissé la valeur $\alpha_{ICG-LNP}$ à 0 tandis que nous faisons varier la valeur d' $\alpha_{autofluo}$ de 0 à 10^{12} pour contraindre le spectre de l'autofluorescence à se rapprocher de son initialisation.

Plus la valeur du paramètre de régularisation augmente, plus le spectre d'autofluorescence obtenu par l'algorithme de FMN est proche de l'initialisation que nous avons imposée.

Le schéma inverse peut être envisagé, pour contraindre le spectre des marqueurs ICG-LNP à rester proche de son initialisation ; enfin nous pouvons également contraindre les deux spectres à la fois par le réglage du vecteur α .

Notons qu'ici nous imposons à l'algorithme d'être plus ou moins proche des spectres initiaux, jusqu'à un point extrême qui n'est pas forcément réaliste : les spectres initiaux ne sont pas forcément les spectres de fluorescence réels que nous recherchons, mais seulement des modèles approchés. À l'avenir, cette régularisation s'appliquera à des cas où nous aurons une certaine connaissance d'au moins un des spectres de fluorescence recherchés, et le paramètre α sera un indicateur de la confiance que nous avons dans

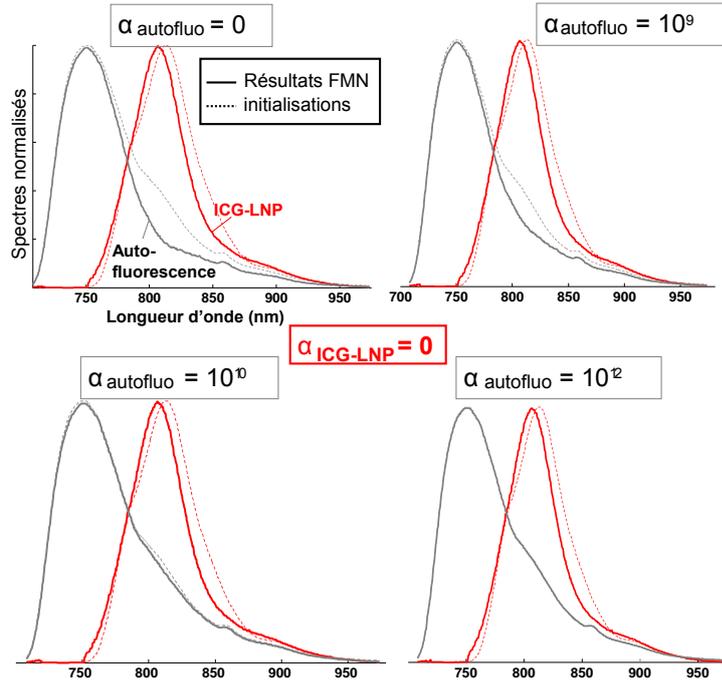


FIGURE 4.21: Pour $\alpha_{ICG-LNP} = 0$, nous augmentons la valeur de $\alpha_{autofluo}$: le spectre d'auto-fluorescence est contraint –seul– à rester proche de son spectre initial.

nos connaissances *a priori* des spectres de fluorescence.

En pratique il est difficile de régler le paramètre de régularisation α : la méthode dite de *L-curve* [Hansen 94] notamment fonctionne difficilement sur nos données. Nous utilisons rarement cette régularisation, sans doute plus adaptée à des cas où la connaissance des spectres de fluorescence au départ est plus précise. En effet en pratique nous n'avons pas d'information sur la profondeur des marqueurs, et l'effet des tissus sur la distorsion des spectres de fluorescence nous empêche d'avoir une idée précise de l'allure des spectres recherchés. Pour l'auto-fluorescence, le spectre ne semble pas beaucoup varier (d'après nos résultats empiriques), et nous pourrions plus couramment utiliser la régularisation sur l'initialisation pour le cas de l'auto-fluorescence.

4.3.2.2 Comparaison avec l'algorithme de Berry *et al.*

Pour conclure sur ce nouvel algorithme régularisé, nous proposons ici de comparer ses performances avec celles d'un algorithme de FMN régularisé de la littérature. En 2007, Berry propose des lois de mises à jour multiplicatives pour la résolution de problèmes de FMN [Berry 07]. La forme générale de ces lois est la suivante :

$$S_{p\lambda} \leftarrow S_{p\lambda} \frac{(A^t V)_{p\lambda}}{(A^t A S)_{p\lambda} + \alpha \left(\frac{\partial J(S)}{\partial s_{p\lambda}} \right)} \quad A_{np} \leftarrow A_{np} \frac{(V S^t)_{np}}{(A S S^t)_{np}} \quad (4.29)$$

Ces lois de mises à jour s'appliquent au cas particulier $J(S) = \|S - S_0\|_2^2 = F_2$; nous obtenons alors les lois suivants qui minimisent notre fonction de coût F_2 :

$$S_{p\lambda} \leftarrow S_{p\lambda} \frac{(A^t V)_{p\lambda}}{(A^t A S + D_\alpha (S - S_0))_{p\lambda}} \quad A_{np} \leftarrow A_{np} \frac{(V S^t)_{np}}{(A S S^t)_{np}} \quad (4.30)$$

Les lois de mise à jour originales que nous proposons ont l'avantage de conserver la positivité des initialisations de A et S au cours des itérations, tandis que les lois de mise à jour de Berry *et al* qui minimisent la même fonction de coût ne présentent pas cet avantage. De plus les lois de mise à jour de Berry *et al* nécessitent que la valeur du paramètre de régularisation α soit suffisamment petit [Berry 07] pour assurer une convergence de l'algorithme, tandis que les nôtres ont l'intérêt de ne pas présenter cette contrainte.

Nous reprenons l'exemple de ce début de chapitre, et avec lequel nous avons d'ores et déjà illustré les résultats obtenus avec notre algorithme régularisé. Dans ce cas, nous nous intéressons uniquement aux spectres obtenus, et nous augmentons la valeur du paramètre de régularisation α (ici α est choisi identique pour les deux composantes, et la régularisation cherchera à rapprocher les résultats des deux spectres d'initialisation choisis). L'exemple présenté figure 4.22 compare les résultats obtenus avec notre algorithme et celui de Berry *et al.* : pour de fortes valeurs du paramètre α , l'algorithme de Berry *et al.* ne converge plus et les spectres obtenus s'éloignent de l'initialisation et présentent des valeurs négatives tandis que notre algorithme ne présente pas ces inconvénients.

4.3.3 Apport de contraintes de parcimonie spatiale

Nous allons maintenant proposer une contrainte de parcimonie spatiale à notre algorithme. En effet, dans le cas idéal où les marqueurs fluorescents se fixeraient uniquement aux cibles biologiques d'intérêt (et qu'aucun signal non spécifique du fluorophore circulant dans le reste du milieu n'existerait), le signal émis par les marqueurs serait très localisé. C'est à dire que les coefficients de mélange correspondant aux marqueurs fluorescents seront quasiment tous nuls, sauf aux quelques points où la cible est localisée. Ceci nous incite à parler de parcimonie, spatialement parlant.

4.3.3.1 Parcimonie

Hoyer propose en 2004 un algorithme de FMN avec contraintes de parcimonie [Hoyer 04] suivi par Kim et Park qui proposent de nouveaux algorithmes de FMN avec contraintes de parcimonie [Kim 08] par minimisation d'un terme de contrainte en norme L_1 en 2008. Ici nous nous intéressons à une contrainte de parcimonie que nous appellerons **parcimonie spatiale**. En effet, nous cherchons dans la matrice de poids A à obtenir que les colonnes de coefficients de poids des marqueurs fluorescents soient parcimonieuses (soit avec peu de coefficients non-nuls). Le schéma 4.23 décrit ce principe : une bonne séparation de sources est caractérisée par une élimination totale du fond autofluorescent, et donc par un signal spécifique spatialement parcimonieux.

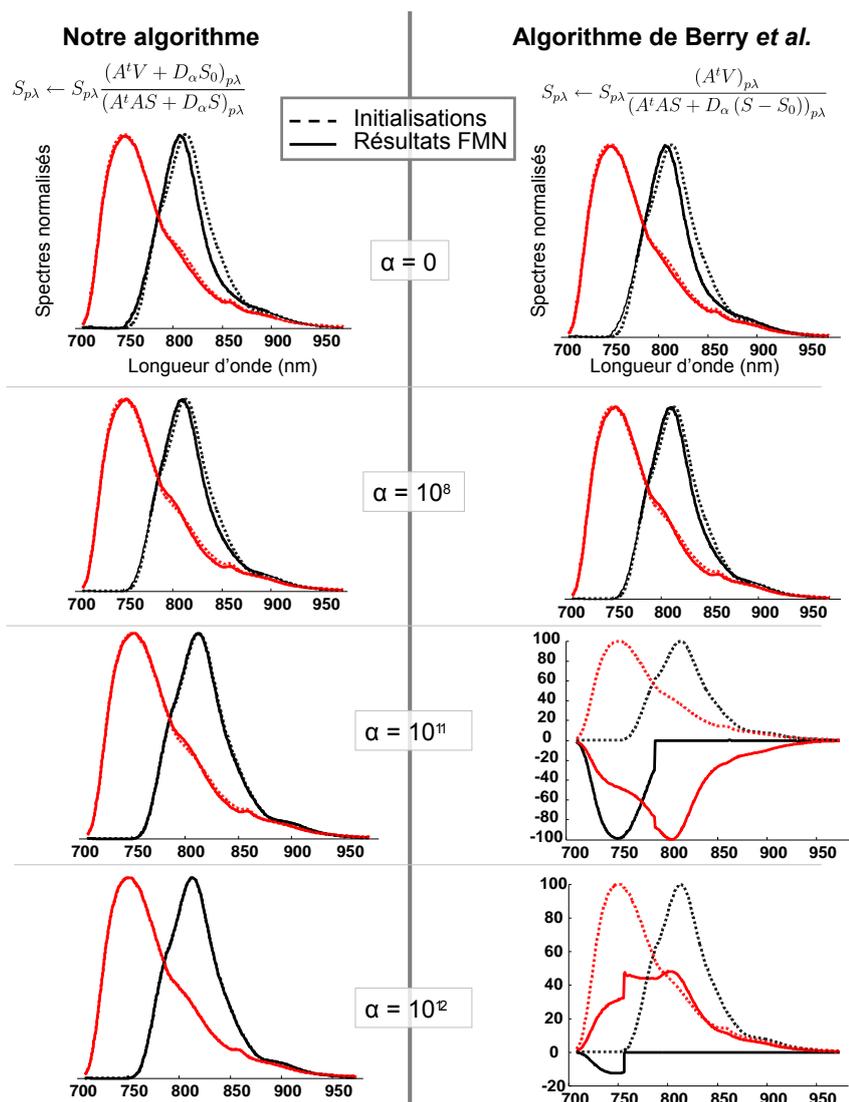


FIGURE 4.22: Comparaison de notre algorithme avec celui de Berry et al. [Berry 07] : effet de la régularisation sur les spectres résultants, selon la valeur du paramètre de régularisation α , ici choisi identique pour les deux sources de fluorescence, l'autofluorescence et la fluorescence des marqueurs.

Parcimonie d'une colonne de A Considérons une matrice de poids A de taille $N_s \times P$ telle qu'elle a été introduite dans la définition de la FMN. Les P colonnes de A représentent les vecteurs de poids des P sources de fluorescence du milieu. La parcimonie d'une colonne A_p ($p \in (1, P)$) de A est définie par [Hoyer 04] comme :

$$spa(A_p) = \frac{\sqrt{N_s} - \left(\sum_{n_s=1}^{N_s} |a_{n_s p}| \right) / \sqrt{\sum_{n_s=1}^{N_s} a_{n_s p}^2}}{\sqrt{N_s} - 1} \quad (4.31)$$

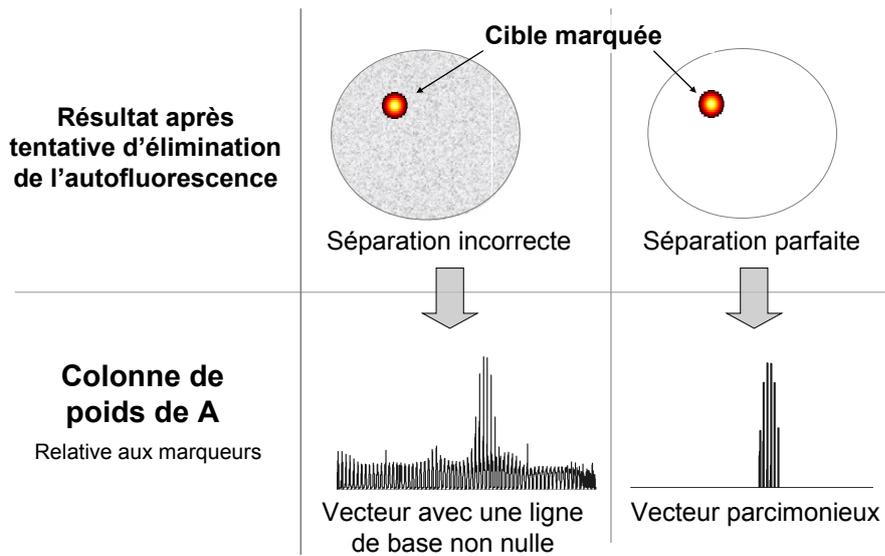


FIGURE 4.23: La recherche d'une source de fluorescence spatialement parcimonieuse correspond à une colonne de A également parcimonieuse.

La valeur de spa est comprise entre 0 pour des vecteurs non-parcimonieux et 1 pour des vecteurs très parcimonieux, comme décrit sur la figure 4.24.

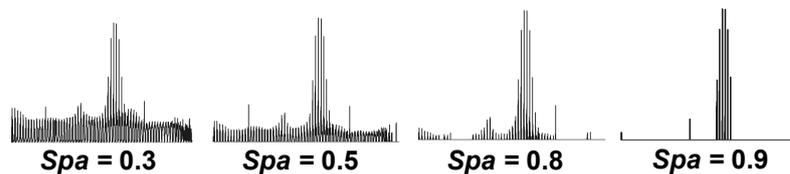


FIGURE 4.24: La valeur de spa est comprise entre 0 et 1 : exemple sur une colonne de poids.

4.3.3.2 Estimation du coefficient de parcimonie

Dans le cas où la tumeur est connue, mais que l'on cherche à mieux la caractériser, il est possible d'estimer la valeur de la parcimonie de la colonne de A correspondant aux marqueurs fluorescents. Pour cela diverses hypothèses sont envisageables. Nous proposons ici un exemple : la figure 4.25 illustre le schéma d'une tumeur marquée dans un milieu.

En considérant qu'il n'y pas de signal non spécifique (c'est-à-dire que tous les marqueurs se sont fixés à la tumeur), le signal d'intérêt est uniquement localisé sur la tumeur. La colonne de poids des marqueurs est notée (A_p) , et l'on cherche à en estimer son coefficient de parcimonie. Pour simplifier le calcul de $spa(A_p)$, on admet que le signal émis par les marqueurs est réparti sur la tumeur T de façon homogène et vaut M_{A_p} , et que le signal de fluorescence est nul partout ailleurs dans le milieu.

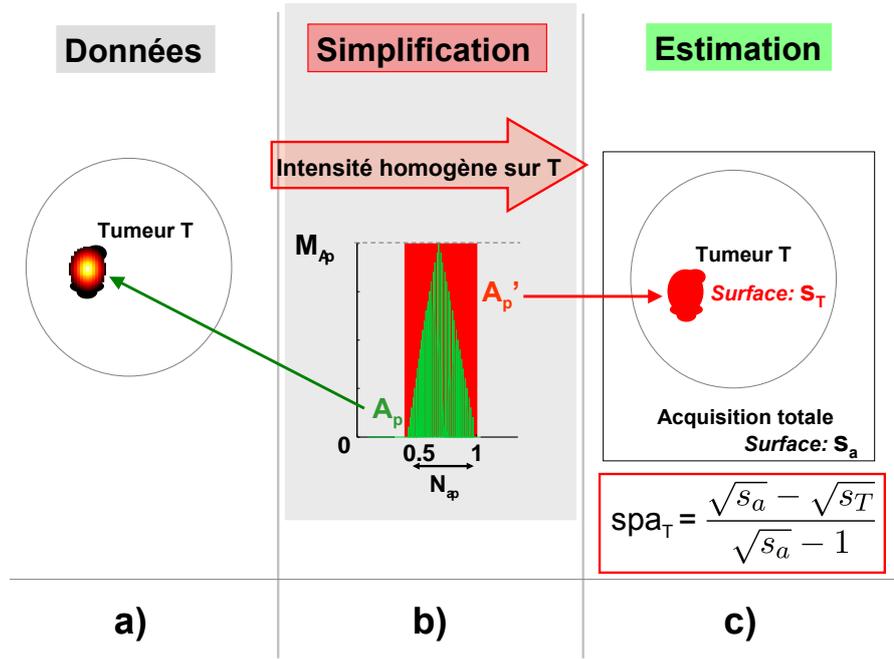


FIGURE 4.25: Estimation de la valeur de parcimonie : a) Schéma d'intensités de la tumeur marquée dans le milieu b) simplification : on considère que le signal de fluorescence est homogène sur toute la tumeur c) le calcul de la parcimonie du vecteur est simplifié.

Nous obtenons alors une expression simplifiée pour le terme $\left(\sum_{n_s=1}^{N_s} |a_{n_s p}| / \sqrt{\sum_{n_s=1}^{N_s} a_{n_s p}^2} \right)$, qui nous conduit à une estimation $\tilde{s}pa$ de la parcimonie décrite par :

$$\begin{aligned}
 \tilde{s}pa(A_p) &= \frac{\sqrt{\text{length}(A_p)} - \left(N_{A_p} \times M_{A_p} / \sqrt{N_{A_p} \times M_{A_p}^2} \right)}{\sqrt{\text{length}(A_p)} - 1} \\
 &= \frac{\sqrt{\text{length}(A_p)} - \sqrt{N_{A_p}}}{\sqrt{\text{length}(A_p)} - 1} \\
 &= \frac{\sqrt{s_a} - \sqrt{s_T}}{\sqrt{s_a} - 1}
 \end{aligned} \tag{4.32}$$

D'autres simplifications pourraient être utilisées, ou une valeur empirique du coefficient de parcimonie pourrait être choisie. Cette valeur estimée est imposée au départ à l'algorithme, qui cherchera alors une solution à la décomposition FMN qui puisse satisfaire le critère de parcimonie choisi.

Dans le cas qui nous concerne le plus souvent, nous avons très peu d'indications sur la localisation de la tumeur. Estimer le coefficient de parcimonie est alors impossible, et demande de tester plusieurs coefficients dans l'algorithme. La valeur proposée à l'algorithme n'est pas nécessairement la valeur finale de parcimonie qui sera trouvée, mais comme pour l'initialisation, aide à la convergence de l'algorithme. En restant dans

le parallèle avec le choix de l'estimation, quelques itérations initiales peuvent permettre de choisir le coefficient de parcimonie à proposer à l'algorithme.

4.3.3.3 Implémentation

L'algorithme suivant propose d'ajouter une étape dédiée à la recherche de marqueurs répartis de façon parcimonieuse dans le milieu, pour une valeur spa de parcimonie imposée au départ :

Algorithme : FMN avec contraintes de parcimonie \mathbf{FMN}_{pdm}

1. Détermination de la zone T de la tumeur après quelques itérations.
2. Test de plusieurs initialisations (pour A et/ou S) et calcul du contraste $C_{T,N}$ après quelques itérations (environ une dizaine) sur les données séparées des marqueurs.
3. Choix de l'initialisation de A et S retournant le meilleur contraste $C_{T,N}$.
4. Mise à jour de S : $S \leftarrow S \frac{(A^t V)}{(A^t A S)}$
5. Mise à jour de A : $A \leftarrow A \frac{(V S^t)}{(A S S^t)}$
6. **Chaque colonne A_p de A référant à un marqueur fluorescent isolé dans le milieu**, pour une valeur de parcimonie φ souhaitée pour les coefficients de la colonne A_p , est modifiée en \tilde{A}_p :

$\forall x \in (1, X)$,

$$\tilde{a}_{xp} = \begin{cases} a_{xp} & \text{if } a_{xp} \geq \frac{\max(a_{xp})}{\beta_p} \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (4.33)$$

avec β_p tel que :

$$\beta_p = \underset{\beta_p}{\operatorname{argmin}} \left| \operatorname{sparsity} \left(\tilde{A}_p(\beta_p) \right) - \varphi \right|$$

7. Reprendre les étapes 4 à 6 jusqu'à ce que le critère d'arrêt soit atteint (par exemple lorsque $F = \epsilon$ pour une valeur d' ϵ choisie, ou pour un nombre d'itérations empiriquement déterminé).
-

4.3.3.4 Problème de la convergence

Pour l'instant, nous n'avons pas démontré la convergence de ce dernier algorithme proposé. Pour remédier à ce manque, nous avons étudié les résultats obtenus par l'algorithme sur de nombreux cas de simulations, qui présentent des données adaptées à la contrainte de parcimonie. Dans ces exemples, nous avons recherché une cible fluorescente localisée, dans un fond autofluorescent émettant à une longueur d'onde différente

de celle des marqueurs. Les spectres de fluorescence (matrice S) ainsi que les pondérations des ces spectres (matrice A) dans les données étant fixées par la simulation, nous avons pu directement juger des performances de l'algorithme en comparaison aux algorithmes sans contraintes de parcimonie.

Ainsi quand les données s'y prêtent (marqueurs localisés), la contrainte de parcimonie a toujours permis d'obtenir de meilleurs résultats de séparation : les spectres sont plus proches de la réalité, et les pondérations plus cohérentes avec le modèle simulé, notamment grâce à l'élimination des fonds résiduels d'autofluorescence autour des marqueurs (voir également l'exemple *in vivo* dans le prochain chapitre).

Les séparations de spectres plus correctes conduisent à une meilleure détection des marqueurs, et donc à un contraste tumeur/tissu sain amélioré (plus proche de 1). Nous illustrons ces propos par un exemple de simulation qui a été menée dans le paragraphe suivant pour comparer les performances de l'algorithme de FMN avec contrainte de parcimonie et des autres algorithmes de FMN présentés dans ce chapitre.

Exemple sur simulations L'exemple testé est le même que celui présenté en début de chapitre, partie 4.3.1 où une tumeur marquée est simulée dans un milieu autofluorescent, aux propriétés optiques du sein (figure 4.26). La tumeur est ici suffisamment localisée pour que la contrainte de parcimonie soit justifiée.

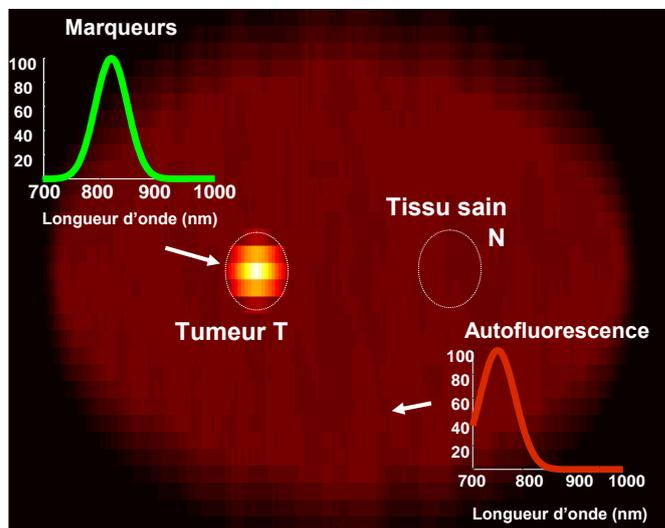


FIGURE 4.26: Exemple sur données simulées du sein : une tumeur ciblée par des marqueurs fluorescents dans un milieu autofluorescent est simulée. Le milieu a les propriétés optiques du sein (voir chapitre 2).

Expérience Sur cette simulation, nous déplaçons les marqueurs de plus en plus profondément dans les tissus (de 0,1 cm à 5 cm) et choisissons soit de ne pas traiter les

données obtenues, soit de leur appliquer l'algorithme de FMN classique ou avec initialisation à départs multiples FMN_{dm} , ou avec contrainte de parcimonie FMN_p , ou encore avec une combinaison de plusieurs contraintes (la chute du contraste tumeur/tissu sain en fonction de la profondeur des marqueurs simulés avait été présentée figure 4.10 dans la partie 4.2.3.1).

Pour chaque cas, nous avons pu visuellement juger de la bonne correspondance entre les spectres obtenus et ceux simulés que nous connaissons (idem pour les pondérations). De manière à pouvoir présenter ici plus facilement les performances de chaque algorithme qu'en détaillant tous les résultats de la décomposition, nous proposons de calculer le contraste $C_{T,N}$ entre la zone tumorale T et la zone de tissu sain N après FMN (voir figure 4.26), pour chaque profondeur testée. Plus l'élimination de l'autofluorescence aura été efficace, et plus la valeur du contraste se rapprochera de 1 ; *a contrario*, plus le contraste est proche de 0, plus la détection de la tumeur est compromise.

Les résultats du contraste obtenu pour chaque type d'algorithme et chaque profondeur des marqueurs simulés pour l'exemple particulier de la simulation du sein sont présentés sur la figure 4.27.

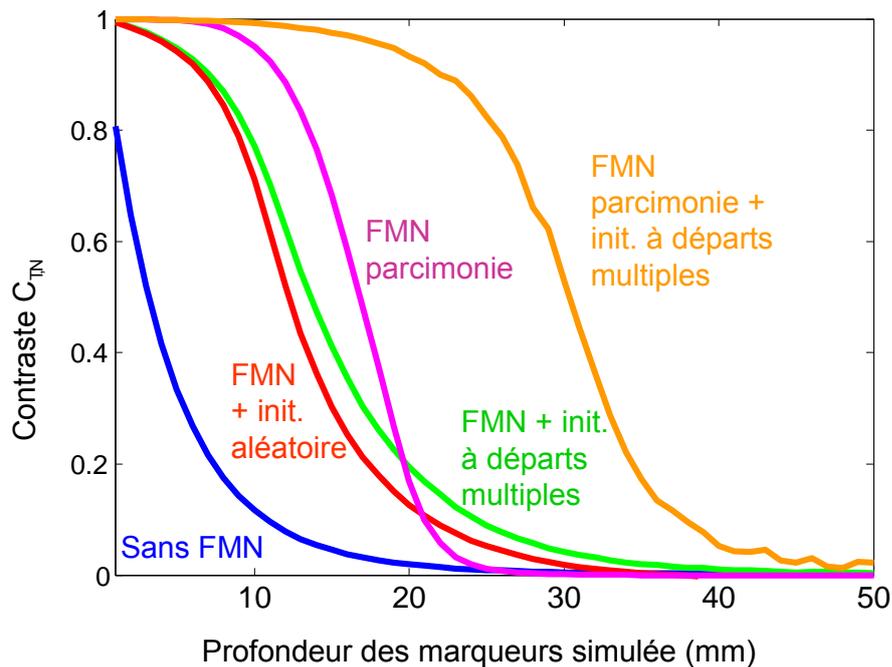


FIGURE 4.27: Calcul du contraste tumeur-tissu sain : comparatif de l'efficacité de divers algorithmes FMN sur données simulées du sein sur la séparation de spectres.

L'ajout de l'étape d'initialisation à départs multiples améliore la détection des marqueurs par rapport aux résultats sans FMN ou avec FMN et initialisations aléatoires, et repousse les limites en profondeur. Mais l'ajout d'une contrainte de parcimonie (pour des cas où le signal recherché est **effectivement parcimonieux**, comme sur l'exemple présenté) en plus de l'initialisation à départs multiples améliore sensiblement les résultats

de la décomposition FMN, et donc le contraste tumeur/tissu sain. Nous appliquerons cet algorithme sur résultats *in vivo* dans le chapitre suivant, et pourrons une fois de plus le comparer aux autres algorithmes à cette occasion.

Bilan du chapitre

Avant de privilégier les méthodes de séparation de sources aveugle (BSS), nous nous sommes intéressés la technique la plus intuitive consistant à soustraire un modèle d'autofluorescence sur les données mélangées, et à la SVD. L'étude en parallèle du comportement spectral des sources de fluorescence (chapitre 3) nous a ensuite orientés vers les méthodes BSS ; la prise en compte de la contrainte de positivité des données primordiale à la résolution du problème de l'élimination de l'autofluorescence nous a conduits à tester les méthodes séparation bayésienne de sources positives et Factorisation en Matrices Non-négatives. Les deux méthodes retournant des résultats de séparation satisfaisants, la simplicité d'implémentation et de régularisation de la méthode FMN, et sa rapidité de convergence nous ont poussés à la sélectionner.

La méthode FMN propose ainsi une décomposition non-unique des données. Afin d'améliorer les performances de l'algorithme de FMN, et d'atténuer l'ambiguïté de la décomposition, l'apport de diverses régularisations a été considéré dans ce chapitre.

Nous avons en premier lieu montré que **le choix de l'initialisation** a un impact important sur l'évolution de l'algorithme : une initialisation aléatoire des matrices A et S offre un meilleur contraste tumeur-tissu sain que celui des données non traitées, mais moins bon que lorsque l'initialisation des spectres de S utilise des modèles (par exemple des gaussiennes) proches des spectres recherchés. Enfin l'ajout d'une étape consacrée au choix de l'initialisation, qui évalue parmi un éventail d'initialisations proposées quelle initialisation optimise la détection des marqueurs, permet encore d'améliorer grandement les résultats.

Nous avons ensuite proposé dans ce chapitre de nouveaux algorithmes de FMN régularisés. Une première **régularisation sur l'initialisation** a abouti à la définition et à la preuve de convergence d'un nouvel algorithme qui impose au résultat de la matrice S de rester proche de son initialisation. Enfin une seconde régularisation, dite de **parcimonie spatiale**, s'intéresse à la répartition locale des marqueurs (d'autant plus vrai si les marqueurs sont très spécifiques) dans le milieu. Un nouvel algorithme qui prend en compte ces contraintes de parcimonie en plus de l'étape d'initialisation à départs multiples a été proposé, et validé sur simulations.

Dans le dernier chapitre de ce manuscrit, nous proposons de mettre en œuvre les algorithmes de FMN sur des données acquises *in vivo* et sur fantômes optiques afin d'éliminer l'autofluorescence des données et de séparer plusieurs marqueurs, pour montrer l'efficacité et les capacités des méthodes spectrales pour la séparation de sources de fluorescence.

CHAPITRE 5

Séparation de spectres sur données *in vivo* et fantômes optiques

Dans cette dernière partie, nous proposons de valider la théorie des chapitres précédents sur données spectrométriques acquises sur petit animal vivant et sur fantôme optique.

La première partie de ce chapitre revient brièvement sur l'influence de la distance entre sources et détecteurs de notre dispositif expérimental sur l'atténuation du phénomène d'autofluorescence ; deux expériences, sur fantôme et petit animal, illustrent cette idée. Le reste du chapitre s'intéresse ensuite uniquement à l'élimination de l'autofluorescence par traitement par Factorisation en Matrices Non-négatives des données notamment à l'aide des algorithmes régularisés proposés dans le chapitre précédent.

Dans toutes les expérimentations, nous appliquons l'algorithme de FMN le plus adapté afin d'éliminer au mieux l'autofluorescence des tissus. Les expériences proposées dans ce chapitre nous permettent de tester plusieurs configurations : un ou plusieurs marqueurs fluorescents à séparer sont placés à différentes profondeurs dans les milieux étudiés.

L'élimination spectrale de l'autofluorescence a pour but d'améliorer la détection de la tumeur marquée ; une meilleure détection entraîne une meilleure localisation tridimensionnelle des marqueurs dans le volume analysé. Dans le but de démontrer ce résultat, nous proposons en fin de chapitre une expérience sur fantôme optique pour laquelle nous reconstruisons la distribution de fluorescence en trois dimensions, avant et après traitement des données par FMN.

Sommaire

5.1	Influence de l'écart sources-détecteurs	137
5.1.1	Sur fantôme optique	137
5.1.2	Résultats <i>in vivo</i>	138
5.2	Un seul type de marqueur fluorescent utilisé	140
5.2.1	Détection d'une seule tumeur	140
5.2.2	Détection de plusieurs tumeurs	149
5.3	Multiplexage	151
5.3.1	Deux marqueurs en capillaires	151
5.3.2	Injection sur souris	154
5.4	Séparation de spectres et reconstructions FDOT	155
5.4.1	Méthode de reconstruction	156
5.4.2	Exemple sur fantôme optique	162

5.1 Influence de l'écart sources-détecteurs sur la détection des tumeurs marquées

Nous avons présenté brièvement dans le chapitre 2 une simulation soulignant l'influence de l'écart entre les sources et les détecteurs sur l'atténuation de signal d'autofluorescence. Comme le sujet de thèse est consacré à l'élimination de l'autofluorescence par traitement numérique des données, nous n'avons étudié le problème de l'écart sources-détecteurs que sur quelques exemples sur fantômes et *in vivo*. Ce problème est néanmoins primordial, et une étude plus poussée mènerait à la mise en place d'un système d'acquisition optimal où la quantité d'autofluorescence mesurée serait minimisée. Un traitement par FMN pourrait alors être appliqué à des données optimisées.

Nous proposons de présenter deux exemples prometteurs dans les paragraphes suivants.

5.1.1 Sur fantôme optique

L'étude est tout d'abord menée sur un fantôme optique composé d'eau, d'intralipide (pour l'effet diffusant), d'encre (pour rendre le milieu absorbant), et de PPIX (qui simule un signal autofluorescent homogène dans tout le fantôme). Les propriétés optiques du fantôme obtenues sont proches de celles du sein, à savoir $\mu'_s \simeq 10 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu_a \simeq 0,5 \text{ cm}^{-1}$ à 720 nm.

Expérience Un capillaire fluorescent rempli de 5 μl d'ICG-LNP à 1 μM est placé à environ 5 mm de profondeur dans le fantôme. Une acquisition du fantôme entier est obtenue pour un écart $e_{S,D}$ fixé entre sources et détecteurs. Puis nous faisons varier l'écart $e_{S,D}$ entre les sources et les détecteurs et obtenons une nouvelle acquisition pour chaque distance $e_{S,D}$ testée (voir schéma 5.1). La distance initiale $e_{S,D}$ est nulle, c'est-à-dire que les détecteurs sont superposés à la ligne d'excitation laser.

Afin d'estimer l'amélioration apportée par l'écart $e_{S,D}$ imposé entre les sources et les détecteurs, nous calculons le contraste $C_{T,N}$ entre la zone du capillaire et une zone autofluorescente autour.

Résultats Les résultats obtenus pour chaque distance sources-détecteurs testée sont proposés sur la figure 5.2.

L'écart $e_{S,D}$ entre les sources et les détecteurs a une influence directe sur la détection des marqueurs du capillaire. Un écart de 2 mm entre la ligne de détection et la ligne

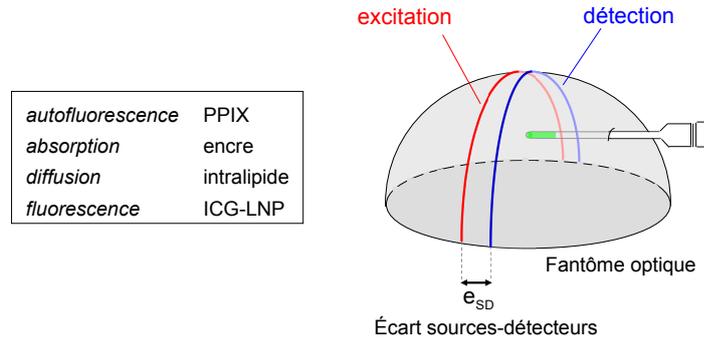


FIGURE 5.1: Le support d'étude est un fantôme optique composé d'eau, intralipide, encre et PPIX. Un capillaire fluorescent rempli de $5 \mu\text{l}$ d'ICG-LNP à $1 \mu\text{M}$ est placé dans le fantôme à environ 5 mm de profondeur, et l'influence de la distance $e_{S,D}$ entre les sources et les détecteurs est testée.

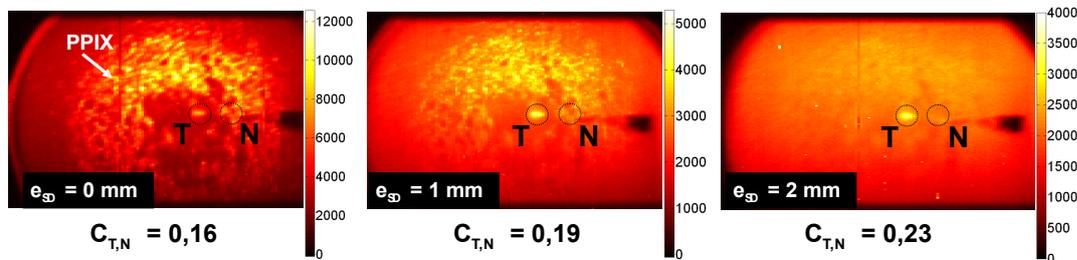


FIGURE 5.2: Influence de l'écart sources-détecteurs : acquisitions d'intensité (obtenues en sommant les spectres de fluorescence en chaque point du fantôme) mesurées pour différentes distances entre la ligne source et la détection de notre système expérimental.

d'excitation permet d'augmenter le contraste $C_{T,N}$ entre le capillaire et les zones autofluorescentes autour et d'atténuer la fluorescence des premières couches du fantôme. En effet, en écartant les sources et détecteurs, nous privilégions la détection de fluorescence dans les couches inférieures à la surface, et éliminons la fluorescence d'amas de PPIX présents sur la surface du fantôme.

5.1.2 Résultats *in vivo*

Nous mettons en place une expérience similaire à la précédente, cette fois sur souris vivante.

Expérience Un capillaire rempli de $5 \mu\text{l}$ d'ICG-LNP à $5 \mu\text{M}$ est placé par voie rectale sur la souris (soit à environ 5 mm de profondeur de la surface de l'animal). Nous modifions sur trois acquisitions la distance $e_{S,D}$ entre les sources et les détecteurs ; pour chaque distance $e_{S,D}$ testée, une acquisition étendue de la zone abdominale de l'animal est obtenue (voir figure 5.4).

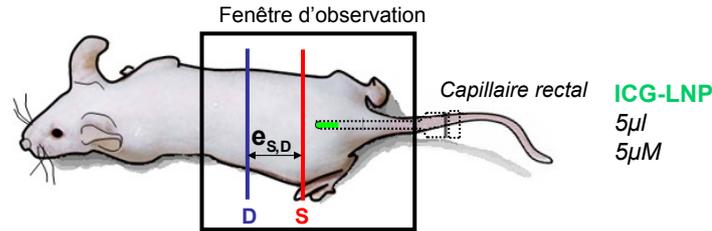


FIGURE 5.3: Un capillaire fluorescent rempli de $5 \mu\text{l}$ d'ICG-LNP à $5 \mu\text{M}$ est placé par voie rectale sur la souris (environ 5 mm de profondeur).

Résultats Les acquisitions obtenues pour des distances $e_{S,D}$ de 0 à 6 mm sont présentées sur la figure 5.4. Sur la même figure, nous affichons pour cette expérience les résultats obtenus après FMN_{pdm} ou FMN_{ri} afin de confirmer l'emplacement du capillaire difficile à distinguer sur les acquisitions mélangées.

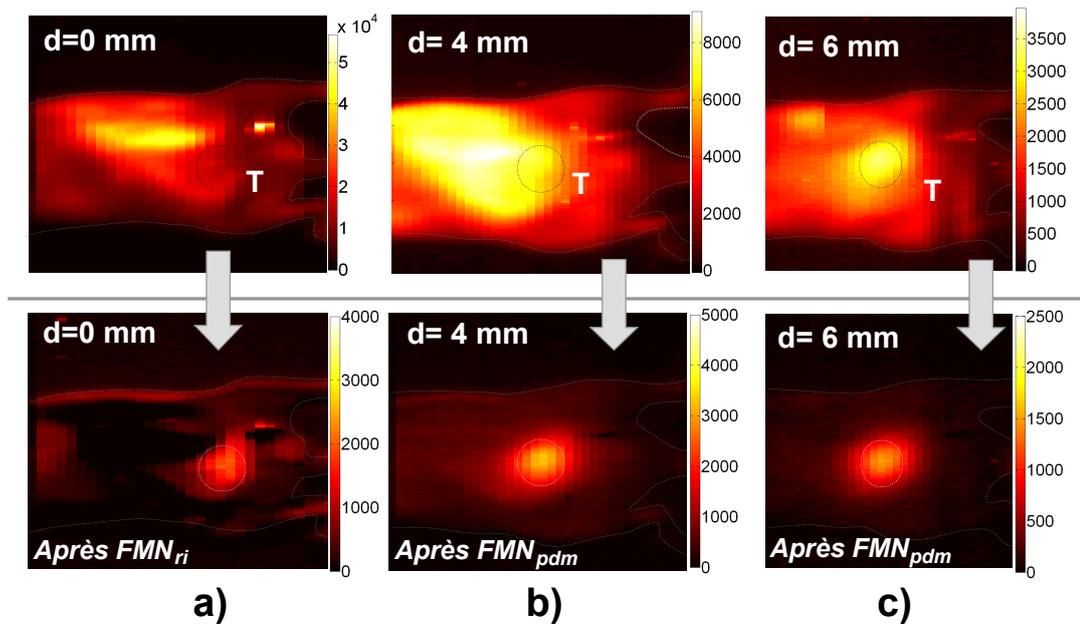


FIGURE 5.4: Un capillaire fluorescent rempli de $5 \mu\text{l}$ d'ICG-LNP à $5 \mu\text{M}$ est placé par voie rectale sur la souris (environ 5 mm de profondeur). L'influence de la distance $e_{S,D}$ entre les sources et les détecteurs sur la détection du capillaire est testée : a) 0 mm, b) 4 mm, c) 6 mm. Résultats avant FMN (haut) et après FMN la plus adaptée (bas).

L'écart entre les sources et les détecteurs, comme dans le cas précédent sur fantôme, a une influence sur la détection du capillaire placé en profondeur. Sur cet exemple, l'écart d'environ 6 mm entre la ligne source et les détecteurs permet de beaucoup mieux distinguer sur les acquisitions mélangées le capillaire fluorescent (voir figure 5.4-c). La séparation de sources par FMN est par conséquent plus efficace puisque le contraste entre le capillaire et les tissus environnants est amélioré par la distance sources-détecteurs.

Lorsque les sources et détecteurs sont superposées (cas de la figure 5.4-a), le capillaire

ne se distingue pas de l'autofluorescence de l'animal ; le traitement par FMN permet de faire apparaître la fluorescence de l'ICG-LNP, mais les réglages de l'algorithme sont beaucoup plus contraignants que dans le cas précédent. En effet, nous avons été obligés sur ce cas d'utiliser un modèle de spectre de l'ICG-LNP et l'algorithme de FMN avec contrainte sur l'initialisation ; autrement il était impossible de retrouver le marqueur noyé dans l'autofluorescence par un algorithme non contraint.

5.1.2.1 Conclusion

Nous n'avons ici qu'observé très sommairement l'effet de l'écart entre les sources et les détecteurs dans la détection de marqueurs en profondeur. Dans le cas *in vivo*, le capillaire fluorescent n'était pas du tout visible dans la configuration où les sources et détecteurs étaient superposés. Après écartement des sources et détecteurs et atténuation de la fluorescence des premiers millimètres de tissus de l'animal, le capillaire fluorescent se distingue alors très bien.

Une étude plus poussée permettrait de mieux comprendre les effets de ces réglages, et d'améliorer la détection et la localisation des tumeurs marquées en atténuant l'effet de l'autofluorescence dans les premières couches des tissus. Cette première étape dans l'acquisition de données résolues en spectres permettrait de prédisposer les données à un traitement ultérieur par séparation de spectres.

Dans les parties suivantes nous nous intéressons uniquement à l'élimination de l'autofluorescence des tissus par séparation de spectres directement sur les données. Le réglage délicat des sources et détecteurs n'a pas été touché, laissant les sources et détecteurs superposés pour toutes les expériences.

5.2 Un seul type de marqueur fluorescent utilisé : élimination de l'autofluorescence *in vivo*

Pour la plupart des expériences, une acquisition de l'objet analysé est effectuée, selon le protocole présenté dans le second chapitre. Le même dispositif est toujours utilisé, avec une excitation laser à 690 nm, et une réorganisation du cube de données en tableau $2D$; ce protocole classique ne sera pas précisé à chaque expérimentation (voir partie 2.1). Il en est de même pour les protocoles sur petit animal déjà présentés (notamment l'installation des animaux, ou l'anesthésie). Par la suite, seuls les protocoles particuliers seront détaillés.

Nous dédions tout d'abord une première partie sur l'élimination par FMN à la détection d'un seul type de marqueurs fluorescents *in vivo*.

5.2.1 Une seule tumeur à isoler

Nous proposons deux types d'expériences dans les paragraphes suivants : sur souris sur laquelle un capillaire en verre partiellement rempli d'un marqueur fluorescent est placé en sous-cutané pour simuler une tumeur, et sur souris avec tumeurs réelles sous-cutanées auxquelles les marqueurs fluorescents sont injectés.

5.2.1.1 A. Expérience *in vivo* sur capillaire

Comme nous l'avions présenté dans le chapitre 2, l'utilisation de capillaires en verre remplis de fluorophores permet de simuler des tumeurs marquées sur souris, et évite l'implantation et la croissance de tumeurs sur l'animal.

En ayant l'objectif d'obtenir des marqueurs toujours plus spécifiques (c'est-à-dire de diminuer la quantité de marqueur non spécifique, qui circule dans le corps dans se fixer à la cible biologique), le capillaire permet de simuler un amas de marqueurs très localisé dans le milieu. Ces expériences avec capillaire sont donc un support idéal pour tester l'algorithme de FMN avec contraintes de parcimonie spatiale que nous avons mis au point.

Présentation Le marqueur que nous utilisons ici est l'ICG-LNP. Nous proposons de rappeler sur la figure 5.5 les allures des spectres moyens de l'autofluorescence (acquis sur souris non injectée) et des ICG-LNP (acquisition *in vitro*).

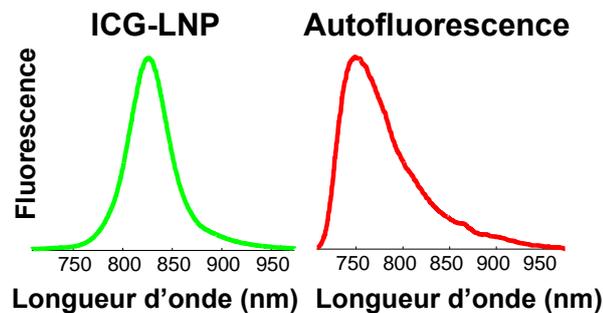


FIGURE 5.5: *a) Spectre moyen d'autofluorescence (acquisitions sur souris non injectées), b) spectre d'ICG-LNP.*

Afin d'avoir quelques points de comparaison pour le signal d'autofluorescence (notamment en terme d'intensité, et zones plus autofluorescentes que d'autres), nous effectuons une première acquisition sur souris sans aucun fluorophore : le profil d'intensité obtenu (somme des spectres de fluorescence en chaque point d'acquisition) est présenté figure 5.6-a.

Pour simuler une tumeur marquée, 5 μl d'ICG-LNP à 0,35 μM sont introduits dans un capillaire en verre d'1 mm de diamètre, placé en sous-cutané sur une souris anesthésiée (voir 5.6-b).

La concentration en marqueurs a été diminuée par rapport aux protocoles classiques d'étude du petit animal. Ceci permet de diminuer le contraste tumeur-tissu sain au départ, et de se placer dans un cas comparable à une détection en profondeur où l'autofluorescence devient non négligeable.

L'acquisition obtenue est présentée sur la figure 5.6-c) : le signal des marqueurs confondu au signal d'autofluorescence, ainsi que les zones tumeur T et tissu sain N sont mis en évidence.

Algorithme utilisé Nous proposons pour ce premier exemple de tester plusieurs algorithmes afin d'appuyer les résultats obtenus sur simulation dans la fin du chapitre

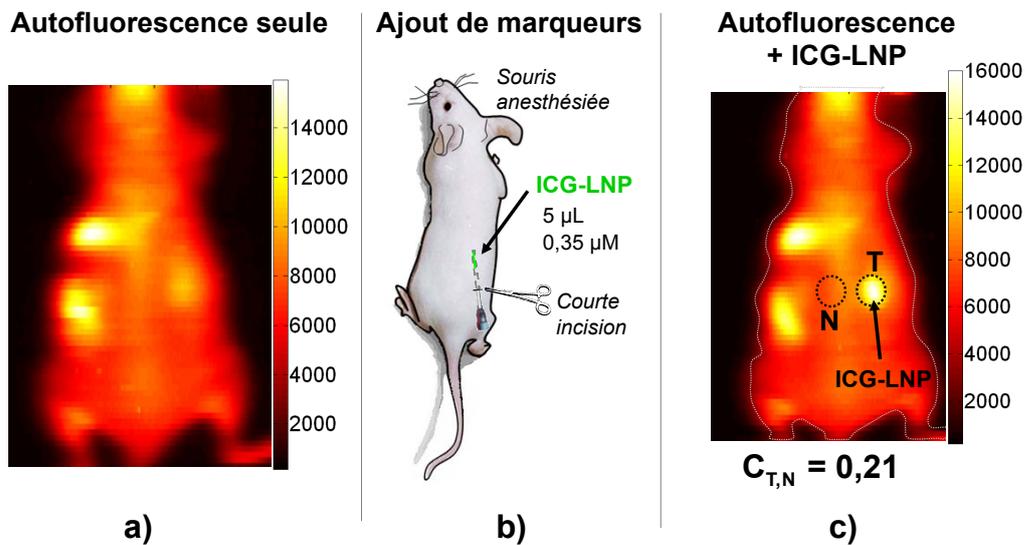


FIGURE 5.6: a) Une mesure de référence de l'autofluorescence de la souris est acquise, b) Un capillaire rempli d'ICG-LNP est placé en sous-cutané sur l'animal, c) Acquisition obtenue : marqueurs d'ICG-LNP plus l'autofluorescence.

précédent. Ici l'algorithme de \mathbf{FMN}_{pdm} (parcimonie et initialisation à départs multiples) est le plus adapté. Nous allons comparer les résultats obtenus par cet algorithme à ceux de l'algorithme FMN simple, avec une initialisation de S par modèles de spectres (\mathbf{FMN}_s), puis avec une initialisation à départs multiples (\mathbf{FMN}_{dm}). Enfin nous le comparerons à l'algorithme avec contraintes de parcimonie, mais avec une initialisation de S par des modèles (\mathbf{FMN}_{ps}), et non plus par une étape de départs multiples. Enfin le contraste tumeur-tissu sain $C_{T,N}$ est systématiquement calculé.

L'étape d'initialisation à départs multiples compare plusieurs modèles gaussiens, translatés de 700 à 975 nm environ. Dans les autres cas, les modèles de spectres sont des valeurs moyennes de spectres obtenus sur des expérimentations précédentes (les initialisations sont précisées en trait pointillé sur les mêmes figures que les spectres de S obtenus après décomposition). Enfin la valeur de parcimonie proposée pour les algorithmes qui la requièrent est une valeur empirique de 0,9.

Résultats Les résultats des contributions séparées, et des spectres de la matrice S obtenus pour chaque algorithme sont présentés figure 5.7.

L'algorithme \mathbf{FMN}_s le plus simple testé ici donne les résultats présentés figure 5.7-a. Le contraste $C_{T,N}$ initial de 0,21 (voir figure 5.6) est augmenté à 0,49 : le signal de fluorescence des marqueurs qui à l'origine ne se différenciait pas des zones les plus intenses d'autofluorescence est devenu le signal prédominant. Un signal d'autofluorescence non négligeable est toujours présent, qui ne gêne pas la détection mais pénaliserait la localisation précise en faussant le signal. En effet l'intensité mesurée sur la zone tumorale comprend le signal des marqueurs plus une contribution d'autofluorescence des tissus.

Le second algorithme propose d'**ajouter l'étape d'initialisation à départs mul-**

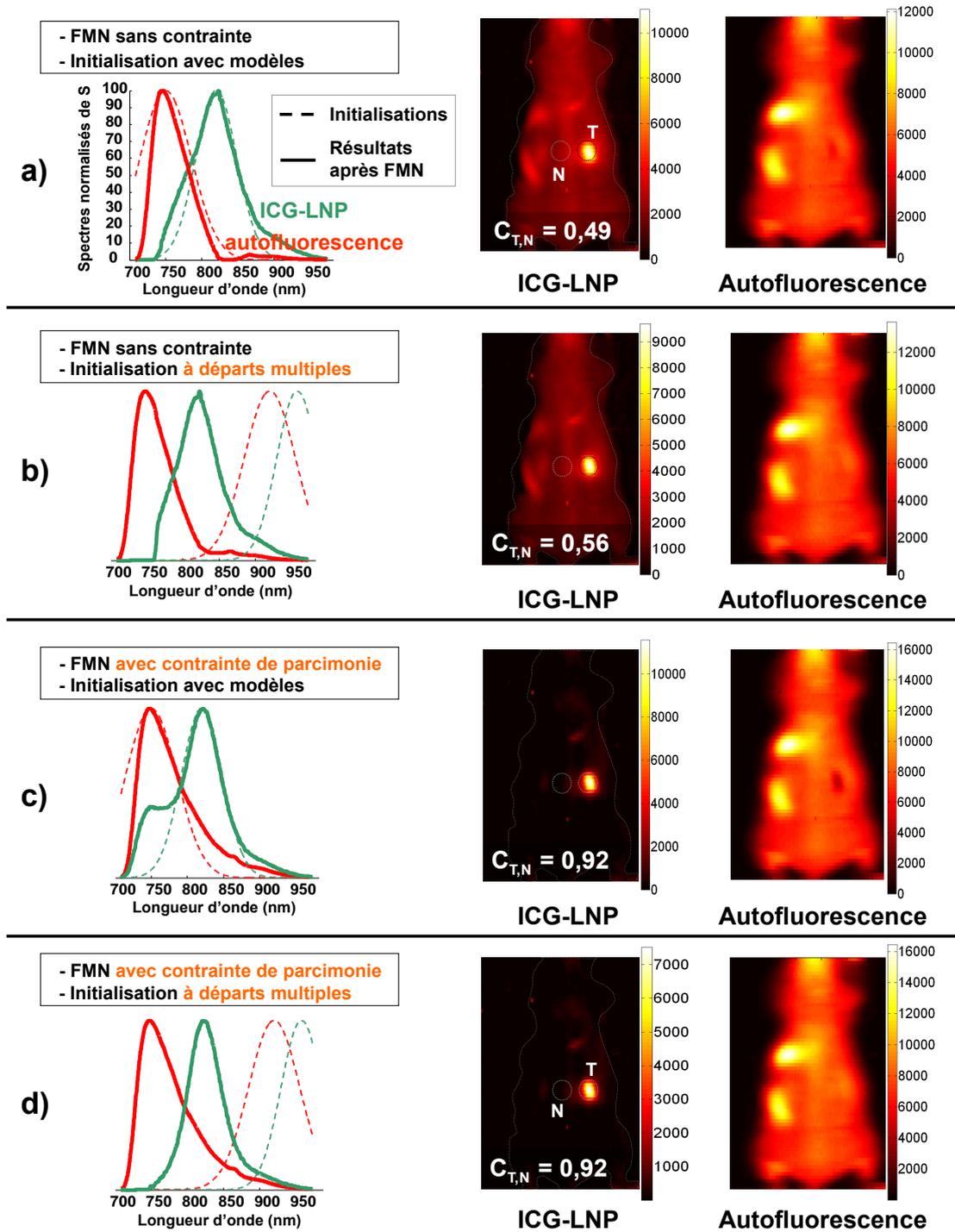


FIGURE 5.7: Expérience sur un seul capillaire et comparaison des résultats obtenus après séparation pour plusieurs algorithmes. a) FMN_s , b) FMN_{dm} , c) FMN_{ps} , d) FMN_{pdm} .

tiples (FMN_{dm}) : les résultats obtenus avec cette méthode sont présentés figure 5.7-b. Le contraste est augmenté à 0,56, et la répartition des intensités est plus cohérente (disparition du « trou » au niveau des marqueurs sur la contribution d'autofluorescence).

L'allure du spectre d'auto fluorescence est d'ailleurs améliorée aux longueurs d'onde critiques qui correspondent à la zone de recouvrement des deux spectres (aux alentours de 820 nm).

Enfin, **des contraintes de parcimonie sont ajoutées** : les résultats avec (\mathbf{FMN}_{pdm}) ou sans l'étape de l'initialisation à départs multiples (\mathbf{FMN}_{ps}) sont proposés sur les figures 5.7-c et 5.7-d. La prise en compte des contraintes de parcimonie améliore le résultat obtenu : le fond autofluorescent est quasiment éliminé (les contrastes atteignent les valeurs de 0,91 et les niveaux d'intensité obtenus sont alors plus cohérents. Enfin l'algorithme \mathbf{FMN}_{pdm} avec contraintes de parcimonie et l'initialisation à départs multiples retourne les meilleurs résultats, et notamment au niveau de l'allure des spectres beaucoup plus proche de la réalité que celle obtenue par les autres méthodes (cf. figure 5.5).

5.2.1.2 B. Cas sur tumeur réelle sous-cutané marquée par de l'IRDye800

L'étude sur tumeur réelle ne réunit plus les critères nécessaires à la recherche d'un signal fluorescent très parcimonieux. En effet, les marqueurs que nous utilisons ne sont pas totalement spécifiques à la cible biologique, et un signal non spécifique (marqueurs circulant et non-fixés à la cible) est mesuré sur tout l'animal après injection. Le signal non spécifique émet à la même longueur d'onde que les marqueurs fixés à la cible, et l'algorithme de séparation de spectres ne peut pas les discriminer.

Nous utiliserons dans ce cas un algorithme de FMN classique, avec une initialisation à départs multiples \mathbf{FMN}_{dm} , ou (ce qui demande un réglage plus fin, et plus de temps) l'algorithme de \mathbf{FMN}_{ri} qui contrôle la distance entre le résultat et l'initialisation pour les cas plus difficiles. En effet lorsque les marqueurs sont totalement noyés dans l'auto fluorescence, il s'est avéré utile de forcer un des spectres à se rapprocher de l'initialisation pour réussir à le retrouver dans le mélange.

Présentation Dans ce second exemple sur tumeur réelle sous-cutané, le marqueur utilisé est de l'IRDye800 (LI-COR) vectorisé par du RAFT-(cRGD)₄ (AngioLone, Fluoptics). Afin de simplifier l'appellation de ce marqueur, nous le nommerons dorénavant uniquement IR800. L'allure du spectre de fluorescence de l'IR800 est rappelée figure 5.8.

Comme pour l'exemple précédent, nous effectuons une première acquisition de l'animal avant l'injection des marqueurs. L'acquisition (intensité obtenue en sommant les spectres de fluorescence en chaque point d'acquisition) est présentée figure 5.9-a. La tumeur est ici naturellement autofluorescente (et se distingue déjà des tissus environnants) ; ce résultat varie selon le type de tumeur, et n'est pas vrai pour tous les cancers.

Nous injectons ensuite 200 μl d'IR800 à 50 μM à l'animal (voir figure 5.9-b) ; 48 h après injection, nous obtenons l'acquisition du signal de fluorescence (voir figure 5.9-c). Une mesure aussi tardive est choisie afin d'obtenir un ratio auto fluorescence/fluorescence spécifique intéressant et plus proche d'un cas de détection en profondeur. Le contraste tumeur-tissu sain $C_{T,N}$ est calculé avant séparation pour avoir un

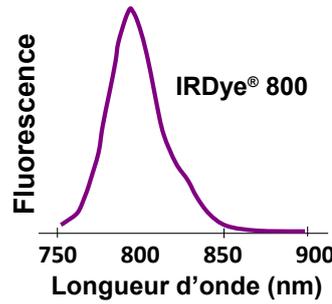


FIGURE 5.8: Spectre de fluorescence de l'IRDye800.

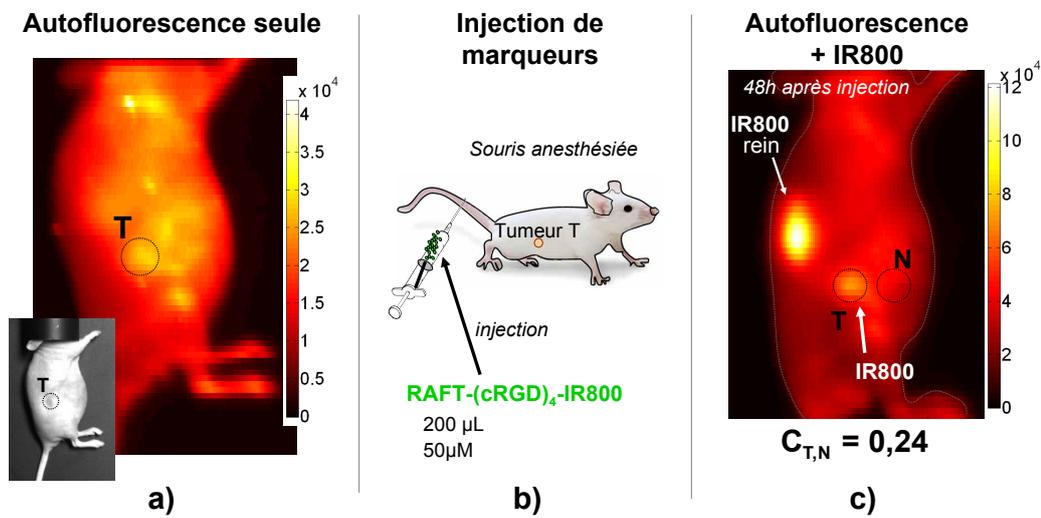


FIGURE 5.9: Expérience sur souris avec tumeur sous-cutané réelle. a) Mesure de référence de l'autofluorescence seule de la souris, b) 200 μ l d'IRD800 à 50 μ M sont injectés à l'animal, c) Acquisition obtenue 48 h après l'injection : marqueurs d'IR800 plus l'autofluorescence.

point de référence (il vaut ici 0,24, comme présenté figure 5.9-c) et nous le mesurerons à nouveau après la séparation des spectres.

Le marqueur est éliminé du corps par voie urinaire, et transite donc par les reins et la vessie : nous observons ici une forte fluorescence au niveau du rein droit de l'animal (voir 5.9-c). La fluorescence des reins – à moins qu'elle ne cache la fluorescence des marqueurs – n'est ici pas gênante puisqu'elle est facilement identifiée par les biologistes. Mis à part les organes particuliers où le marqueur spécifique s'accumule, il reste toujours 48 h après l'injection un important signal non spécifique des marqueurs circulant dans tout l'animal. La figure 5.10 présente les spectres mesurés en trois points (hors zones des reins et de la vessie) de l'animal : dans chaque spectre mélangé, le pic caractéristique de l'IR800 se distingue et confirme la présence de marqueurs dans ces zones de mesure.

Résultats La figure 5.11 présente les résultats obtenus après élimination de l'autofluorescence : les coefficients de poids et les spectres séparés. Le contraste $C_{T,N}$ tumeur/tissus sain est égal à 0,7 à convergence, alors qu'il n'était que de 0,24 avant

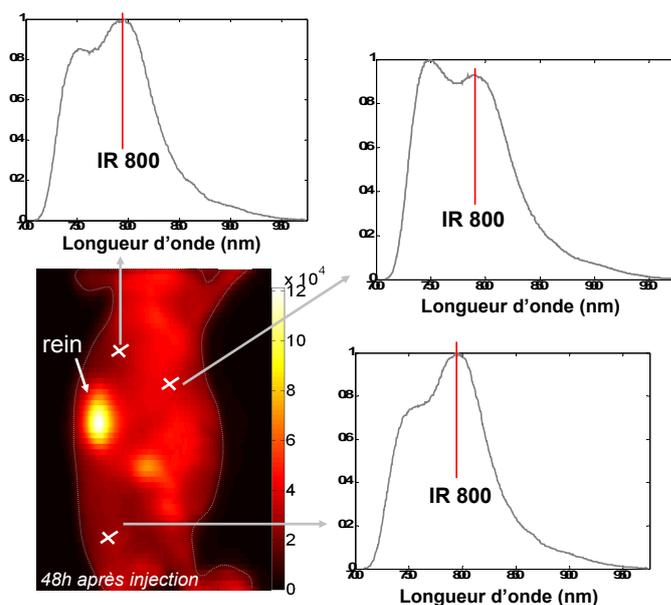


FIGURE 5.10: *Signal non spécifique mesuré 48 h après injections des marqueurs en diverses zones de l'animal. La présence du pic caractéristique de l'IR800 sur les spectres mesurés en ces zones traduit la présence de marqueurs circulant dans les tissus de la souris et non-fixé à la tumeur.*

traitement des données, ce qui augmente considérablement la détection de la tumeur à l'origine difficilement distinguable de l'autofluorescence. De plus, plusieurs zones autofluorescentes (principalement au niveau de l'estomac) d'intensité de fluorescence comparable à celle des marqueurs ont été éliminées. Enfin les spectres de fluorescence séparés de S sont proches de ceux attendus en réalité (cf. figure 5.5 et figure 5.8 de spectres empiriques ou mesurés *in vitro*). Il est difficile de savoir si les spectres obtenus sont ceux véritablement attendus puisque la variation des spectres *in vivo* n'est pas maîtrisée; de plus l'algorithme retourne seulement deux spectres moyens et s'affranchit des légères variations des spectres (principalement en ce qui concerne l'autofluorescence des tissus). Nous pouvons cependant juger la cohérence des résultats obtenus (pondérations des fluorophores sur l'animal, formes de spectres continues et proches des spectres *in vitro*, pics d'émission spécifiques des marqueurs, etc...)

L'intensité des marqueurs au niveau du rein n'est pas aussi intense qu'attendue (voir figure 5.11-b) : la séparation n'est pas parfaite et une partie du signal des marqueurs subsiste sur la contribution d'autofluorescence.

Même après séparation, nous mesurons également un signal non négligeable restant sur tous les tissus de la souris; il s'agit principalement de signal non spécifique (marqueurs non fixés à la tumeur) de l'IR800 que notre séparation de sources n'est pas dans la capacité d'éliminer puisqu'il émet à la même longueur d'onde que le signal d'intérêt. Nous proposons en annexe une seconde expérience similaire, sur tumeur réelle sous-cutané marquée avec de l'IR800 : nous imageons cette fois l'animal 4h, 24h et 48h après injection, et la séparation par FMN est appliquée à chaque acquisition (voir annexe I) permettant d'améliorer à chaque fois le contraste tumeur/tissu sain.

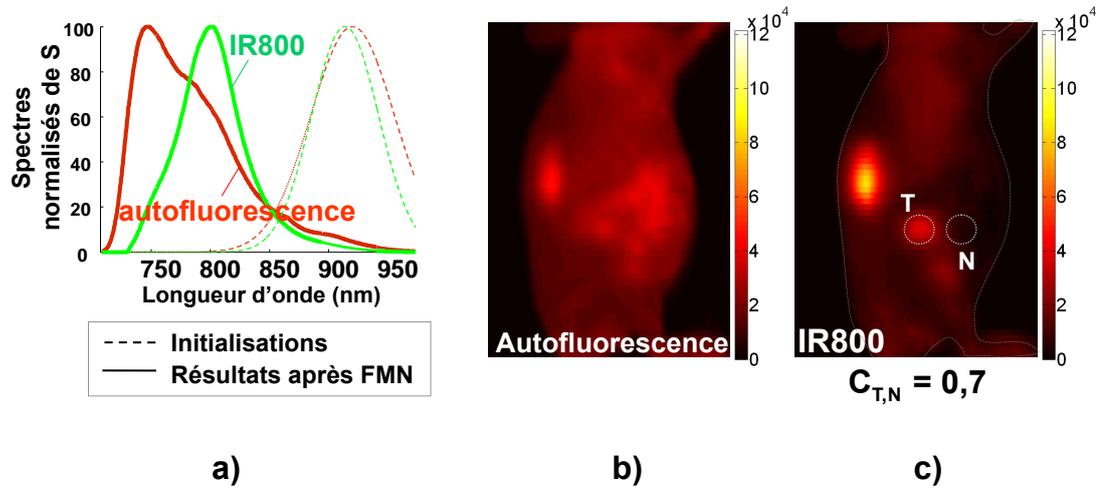


FIGURE 5.11: Résultats sur tumeur sous-cutanée : a) Spectres de la matrice S obtenus et initialisations choisies par l'étape d'initialisation à départs multiples, b) autofluorescence après séparation, c) contribution d'IR800 obtenue après séparation des spectres.

5.2.1.3 C. Cas sur tumeur sous-cutané réelle marquée par de l'ICG-LNP

Nous avons également testé les marqueurs ICG-LNP sur souris avec tumeur. Ici, une structure cyclo RGD (c-RGD) comme celle présente sur les marqueurs IR800 a été ajoutée aux ICG-LNP, afin de rendre les marqueurs plus spécifiques à la tumeur de la souris (étude biologique en cours au sein du laboratoire LFCM du CEA).

Expérience les ICG-LNP c-RGD sont injectés à la souris ($200 \mu\text{l}$ à $50 \mu\text{M}$) ; 5h, 15h, 24h et enfin 48h après l'injection, une acquisition de l'animal est obtenue. Le cas à 5h n'a ici pas présenté d'intérêt, le marqueur étant encore trop présent partout dans le corps de l'animal et très peu dans la tumeur. Nous ne présentons donc seulement que les points d'acquisitions au delà de 15h (voir figures 5.12-a, 5.12-b et 5.12-c).

Contrairement à l'IR800 utilisé auparavant qui s'élimine par voie urinaire, le marqueur ICG-LNP est éliminé du corps par voie hépatique, et transite cette fois par le foie et les intestins. La fluorescence du marqueur au niveau des intestins sera donc plus difficile à discriminer de la forte autofluorescence de l'abdomen (voir figure 5.13).

L'accumulation dans le foie est majoritaire : sur les acquisitions obtenues, nous observons un signal de fluorescence aussi important voire plus que celui de la tumeur au niveau du foie de l'animal (voir 5.12-b par exemple). Enfin, sur chaque acquisition avant traitement (à 15 h, 24 h et 48 h), le contraste tumeur/tissu sain est nul : sans connaissance au départ de la position de la tumeur, elle est difficilement distinguable des zones autofluorescentes de l'abdomen et largement noyée dans l'autofluorescence et le signal non spécifique sur tout l'animal.

Résultats L'accumulation des marqueurs dans la tumeur est effectivement relativement faible. Pour cette raison, le choix de l'algorithme de FMN le plus adapté est délicat. La parcimonie avec des coefficients de parcimonie proches de 1 est une fois de plus hors-

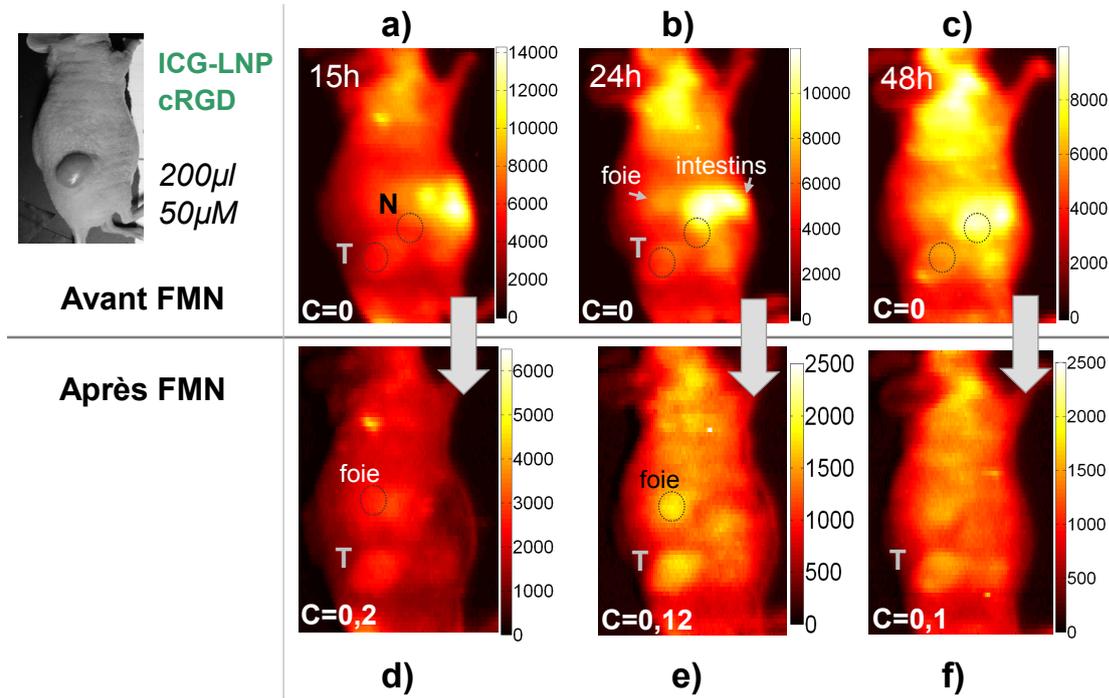


FIGURE 5.12: *Expérience sur souris avec une tumeur sous-cutanée marquée par de l'ICG-LNP (200 μ l à 50 μ M). Acquisitions obtenues à 15 h (a), 24 h (b) et 48 h (c) après injection des marqueurs. Résultats de la séparation de spectres (d, e et f) par FMN_{r_i} (régularisation sur le spectre des marqueurs, coefficient de régularisation à 10^5) et amélioration du contraste $C_{T,N}$.*

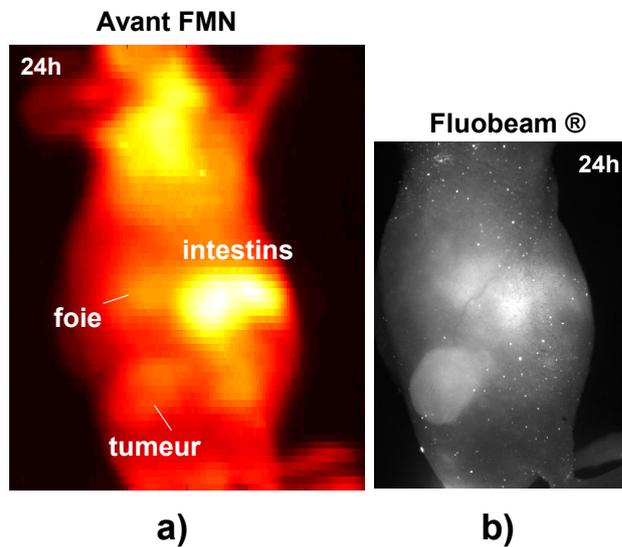


FIGURE 5.13: *Détection de la fluorescence des ICG-LNP dans le foie, et de l'auto fluorescence des intestins : a) Acquisition sur notre système, b) Image obtenue par la sonde Fluobeam (Fluoptics), pour une excitation à 785 nm (optimale pour l'excitation des ICG-LNP et pour l'atténuation de l'auto fluorescence). Nous retrouvons les zones critiques telle que le foie et les intestins.*

sujet sur l'expérimentation *in vivo* à cause du signal non spécifique non négligeable des marqueurs en toutes zones de l'animal.

Nous favoriserons pour ce type d'exemple une initialisation proche des spectres attendus couplée à un algorithme de FMN régularisé qui contraint le résultat à se rapprocher de l'initialisation. Pour ces exemples, nous avons choisi de contraindre le spectre de fluorescence d'ICG-LNP minoritaire dans les données mélangées. Le choix du paramètre est toujours empirique, et nous avons testé plusieurs valeurs avant de juger lequel rendait le meilleur résultat de séparation (en terme de contraste tumeur/tissu sain).

La figure 5.12 présente les meilleurs résultats de séparation de spectres obtenus avec un réglage empirique des valeurs de coefficients de régularisation de l'algorithme de FMN contraint sur l'initialisation. Les contributions d'ICG-LNP après l'élimination de l'autofluorescence sont proposées sur les figures 5.12-d, 5.12-e et 5.12-f : les contrastes $C_{T,N}$ tumeur/tissu sain à l'origine nuls sont légèrement augmentés, jusqu'à 0,2 15 h après l'injection des marqueurs. L'amélioration de la détection est minime, mais permet tout de même de mieux discriminer la tumeur qu'avant traitement par séparation de spectres.

5.2.2 Plusieurs tumeurs : différentes localisations et profondeurs

Nous avons introduit le problème de distorsion des spectres de fluorescence dans le chapitre 3, notamment sur les simulations du sein. Suivant l'absorption et la diffusion du milieu environnant, et sur plusieurs centimètres de profondeur des tissus, le spectre de fluorescence des marqueurs peut subir des décalages de son pic d'émission ainsi qu'une déformation du spectre. La méthode FMN propose de déterminer un spectre de fluorescence moyen du marqueur, et ne tient donc pas compte des éventuelles distorsions des spectres d'un même type de marqueurs suivant les profondeurs auxquelles il se situe. Le problème se pose donc de savoir si le spectre moyen déterminé par la FMN est suffisant pour décrire deux spectres légèrement distordus l'un par rapport à l'autre. Nous avons déterminé en simulation que la distorsion ne sera pas un problème, et que le signal de fluorescence (à cause de la perte de fluorescence quand les marqueurs sont de plus en plus profonds dans les tissus) serait de toute façon quasiment perdu avant que ça ne le devienne.

5.2.2.1 Expérience *in vivo* sur capillaires

Nous proposons ici un expérimentation sur souris, dans un premier temps avec des capillaires remplis d'ICG-LNP pour simuler deux tumeurs marquées à différentes profondeurs. Puis nous tenterons de retrouver les contributions des marqueurs séparées de l'autofluorescence de l'animal.

Présentation Deux capillaires, chacun rempli de 5 μ l d'ICG-LNP à 5 μ M, sont placés sur la souris anesthésiée : un premier est placé sous cutané, et le second dans le rectum. Nous estimons la différence de profondeur entre les deux capillaires de l'ordre

de 5 mm (voir figure 5.14-a). La souris est scannée sur notre système, et la figure 5.14-b présente l'acquisition obtenue (en sommant les spectres en chaque point de l'animal). Le capillaire en sous-cutané émet un fort signal de fluorescence (le calcul du contraste entre ce capillaire et les tissus n'a pas d'intérêt), tandis que le signal émis du capillaire dans le rectum est peu différent du signal d'autofluorescence des tissus. La dynamique de la figure 5.14-b permet de distinguer le signal émis par le capillaire le plus profond ; sans connaissance de sa localisation, il serait difficilement distinguable. Nous nous intéresserons ici au contraste $C_{T,N}$ entre le capillaire du rectum et les tissus sains : avant traitement des données, il est égal à 0,42.

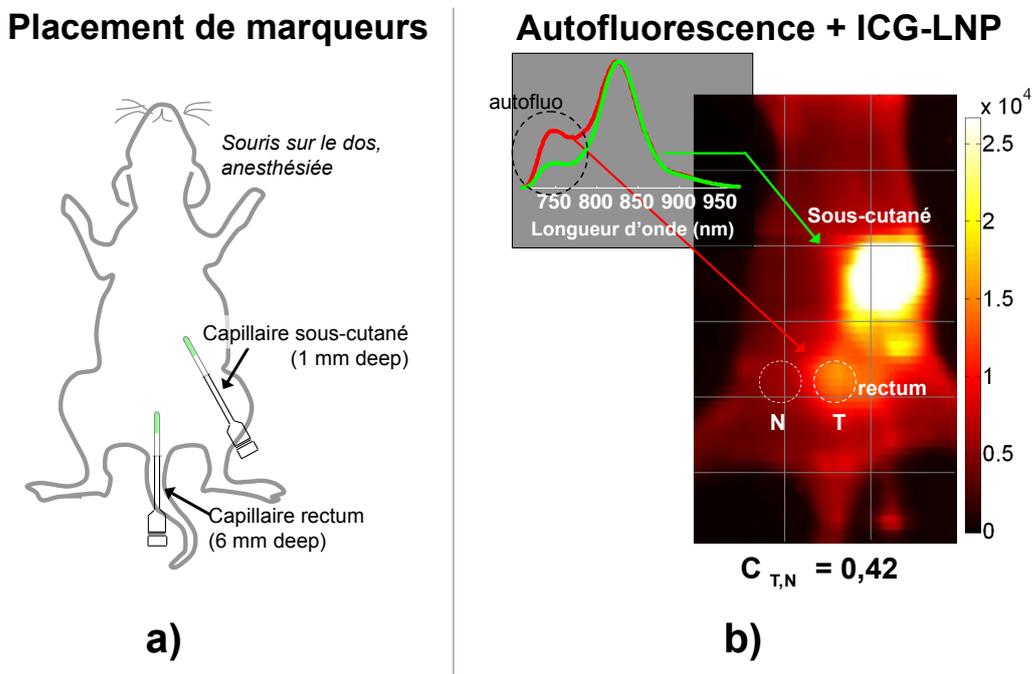


FIGURE 5.14: a) Deux capillaires remplis d'ICG-LNP ($5 \mu\text{l}$ à $5 \mu\text{M}$) sont placés respectivement dans le rectum et en sous-cutané, b) acquisition obtenue : existence d'un faible décalage en longueur d'onde des pics d'ICG-LNP suivant la localisation des capillaires.

La différence de profondeur d'environ 5 mm entre les capillaires est responsable d'un décalage des pics de fluorescence des marqueurs de l'ordre de 5 nm (voir 5.14-b). Nous appliquons notre algorithme FMN_{pdm} avec contraintes de parcimonie sur ces données, avec une valeur initiale empirique de 0,7.

Résultats Le résultat de la séparation de spectres par FMN_{pdm} est présenté figure 5.15 : un seul spectre de fluorescence pour les marqueurs à deux profondeurs a été trouvé, ainsi qu'un spectre pour l'autofluorescence (voir figure 5.15-a). La séparation des contributions est très bonne, avec notamment une augmentation du contraste $C_{T,N}$ de 0,42 à 0,84 pour le capillaire du rectum (voir figure 5.15-b). La répartition entre l'autofluorescence et la fluorescence des marqueurs après séparation semble correcte : il

n'y par exemple pas de « trou » à l'emplacement du capillaire rectum sur les données séparées de l'autofluorescence.

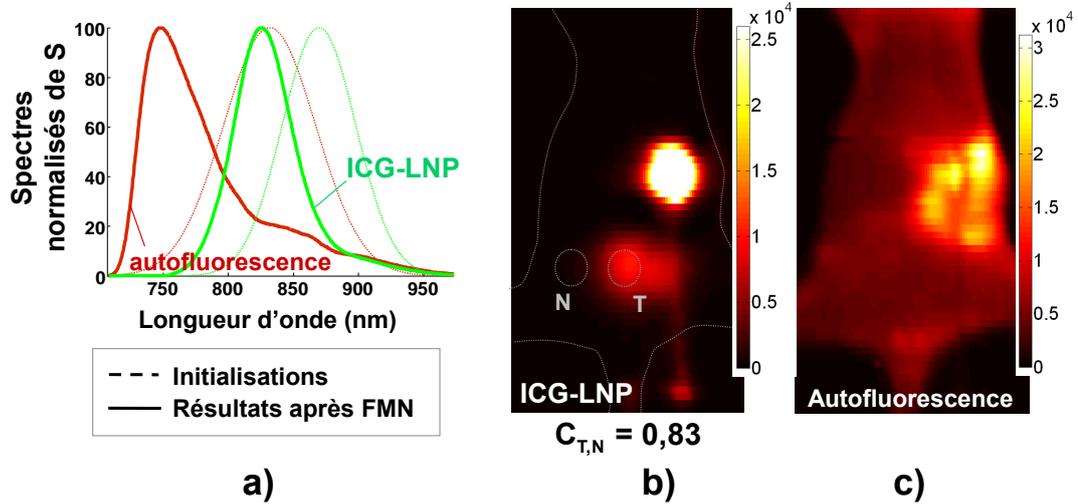


FIGURE 5.15: Résultats après FMN : a) Spectres de la matrice S obtenus et initialisations choisies par l'étape d'initialisation à départs multiples, b) contribution d'IR800 obtenue après séparation : le capillaire en profondeur est parfaitement visible et a été isolé des tissus autofluorescents, c) autofluorescence après séparation.

5.3 Multiplexage : plusieurs marqueurs fluorescents *in vivo*

Nous avons validé dans la partie précédente que l'algorithme de FMN est efficace pour la séparation d'un seul type de marqueurs et de l'autofluorescence des tissus *in vivo*. Dans cette partie, nous testons l'algorithme sur des données acquises sur le même dispositif que pour les précédents exemples, mais en ajoutant un second fluorophore, portant le nombre de sources à distinguer à 3.

5.3.1 Deux marqueurs en capillaires

Dans une première expérience *in vivo* sur souris, nous cherchons à séparer 3 sources de fluorescence : l'autofluorescence des tissus, des marqueurs ICG-LNP et des marqueurs Alexa 750. Une mesure *in vitro* des fluorophores et un spectre moyen d'autofluorescence mesuré sur souris sont présentés sur la figure 5.17.

La mesure de l'autofluorescence de la souris seule avant le placement des marqueurs en capillaires sur la souris est proposée sur la figure 5.16-b

Expérience Deux capillaires respectivement remplis de $5 \mu\text{l}$ d'ICG-LNP à $0,35 \mu\text{M}$ et de $5 \mu\text{l}$ d'Alexa 750 à $0,3 \mu\text{M}$ sont placés sous-cutané sur la souris (voir schéma 5.16-b). Une fois de plus les concentrations des marqueurs ont été choisies plus faibles

qu'en imagerie du petit animal pour se placer dans un cas proche de la détection en profondeur dans les tissus.

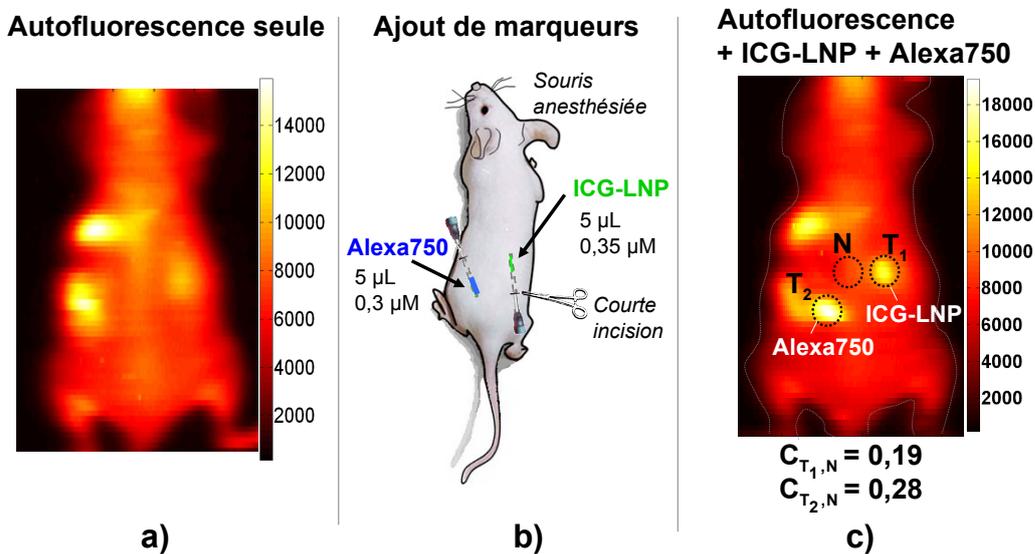


FIGURE 5.16: a) Mesure de référence de l'autofluorescence de la souris, b) Deux capillaires respectivement remplis d'ICG-LNP (5 μl à 0,35 μM) et d'Alexa 750 (5 μl à 0,3 μM) sont placés en sous-cutané, c) acquisition obtenue.

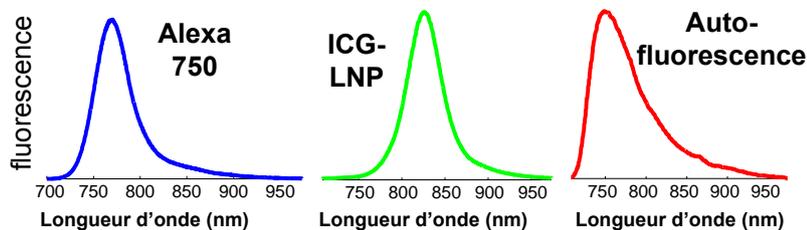


FIGURE 5.17: Spectre de fluorescence de l'Alexa 750, de l'ICG-LNP (mesures in vitro) et de l'autofluorescence (spectre moyen acquis sur souris).

L'acquisition obtenue est présentée figure 5.16-c : deux contributions de marqueurs se superposent à l'autofluorescence des tissus, et trois sources sont donc à séparer.

L'étape d'initialisation à départs multiples s'avère plus fastidieuse et chronophage lorsqu'il y a trois sources à séparer. Après avoir fait tourner plusieurs fois l'étape d'initialisation à départs multiples, l'hypothèse que nous avons au départ semble se confirmer : éloigner les initialisations permet d'éviter les zones de recouvrement spectral et d'obtenir des résultats plus proches de la réalité plus rapidement. Dans cet exemple nous utilisons pour l'initialisation des gaussiennes proches des formes des spectres recherchés que nous éloignons les uns des autres pour éviter des zones de recouvrement entre les spectres trop importantes. Il n'y pas eu d'étape de sélection automatique des initialisations, mais plusieurs tests empiriques. Nous utilisons ensuite l'algorithme \mathbf{FMN}_p avec contraintes de parcimonie puisque les expériences sur capillaire s'y prêtent bien.

La valeur du coefficient de parcimonie a été choisi à 0,9 pour cet exemple (puisque nous recherchons des signaux de fluorescence très localisés), pour l'ICG-LNP et l'Alexa 750.

Résultats Les résultats après séparation des spectres sont présentés sur la figure 5.18 : les trois spectres séparés sont proches des spectres attendus (cf. figure 5.17 et figure 5.18-a). Les intensités séparées sont cohérentes, et offrent de meilleurs contrastes $C_{T_1,N}$ pour l'ICG-LNP, de 0,19 à 0,84, et $C_{T_2,N}$ pour l'Alexa 750, de 0,28 à 0,96 (voir figures 5.18-b et 5.18-c). Enfin l'autofluorescence est homogène (pas de « trou »), et proche du profil de référence acquis avant la mise en place des capillaires (voir figures 5.18-d et 5.16-a).

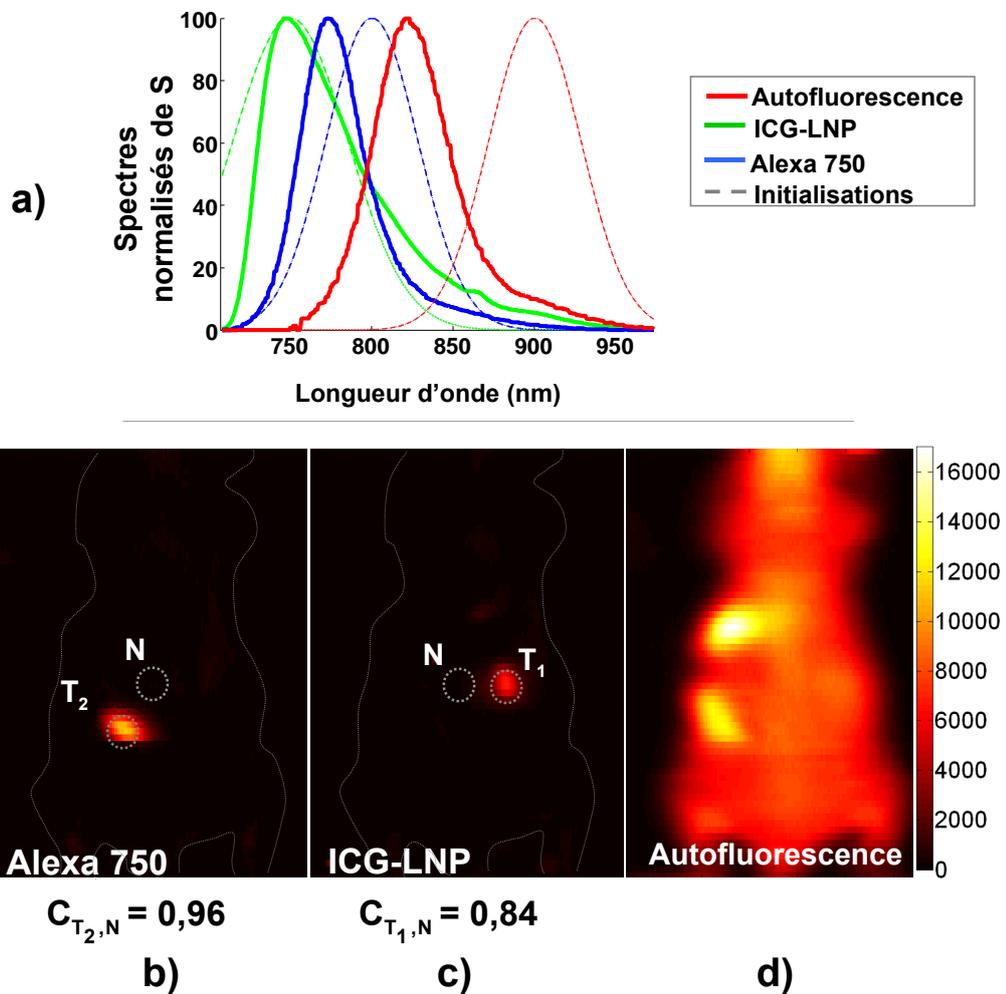


FIGURE 5.18: Séparation par FMN_p : a) Spectres de la matrice S obtenus et initialisations choisies empiriquement, b) contribution d'Alexa 750 obtenue après séparation des spectres, c) contribution d'ICG-LNP d) autofluorescence après séparation.

5.3.2 Injection sur souris

Nous proposons dans cette partie une expérience similaire à celle mise en place précédemment, mais cette fois sans utiliser de capillaires, et sur souris injectée. Nous souhaitons séparer ici à nouveau trois fluorophores : l'autofluorescence de l'animal, l'IR800 et du FP750 (FluoProbes 750). Le marqueur FP750 émet à 776 nm (voir figure 5.19) ; ici encapsulé dans des nanoparticules lipidiques, son pic d'émission est légèrement décalé dans le rouge (pic à environ 778 nm). L'injection en intra-musculaire du marqueur FP750 et l'acquisition dans les minutes suivantes nous permet d'obtenir un signal localisé des marqueurs émettant à une autre longueur d'onde que celles des IR800 ciblant la tumeur, et de tester à nouveau notre algorithme de FMN dans la séparation de trois fluorophores.

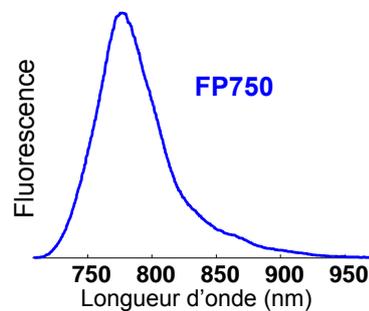


FIGURE 5.19: Spectre d'émission du marqueur *FluoProbes 750* (FP750), mesuré sur notre dispositif.

Expérience Une dose de 200 μl à 50 μM d'IR800 est injectée à l'animal. 48 h plus tard, nous injectons 20 μl de fluorophore FP750 à 5 μM en intramusculaire au niveau de l'épaule de l'animal (voir figure 5.20-a). Une acquisition de la souris est obtenue immédiatement après l'injection (voir figure 5.20-b). La tumeur marquée par l'IR800 se distingue peu au milieu de l'autofluorescence et du signal spécifique. L'injection locale de FP750 est responsable quant à elle du plus fort signal de fluorescence mesuré. Un fort signal non spécifique d'IR800 dans tout le corps de l'animal (marqueur non-fixé à la cible), et principalement dans les reins et la vessie (élimination urinaire du marqueur) est détecté.

Résultats Nous appliquons l'algorithme de FMN_{ps} avec uniquement une contrainte de parcimonie sur le marqueur FP750 attendu très localisé au niveau de l'épaule de l'animal (ce qui se vérifie sur l'acquisition). Les résultats après séparation des trois spectres sont présentés figure 5.21 : les spectres de fluorescence obtenus sont proposés sur la figure 5.21-a, et les pondérations des fluorophores sur les figures 5.21-b (autofluorescence), 5.21-c (IR800) et 5.21-d (FP750).

La séparation est cohérente : nous retrouvons la fluorescence de l'IR800 au niveau des reins, de la vessie, et de la tumeur. L'autofluorescence de la souris est prépondérante une fois de plus au niveau de l'abdomen, et nous pouvons noter qu'une partie de l'autofluorescence a été mal attribuée au niveau du rein, traduisant une séparation

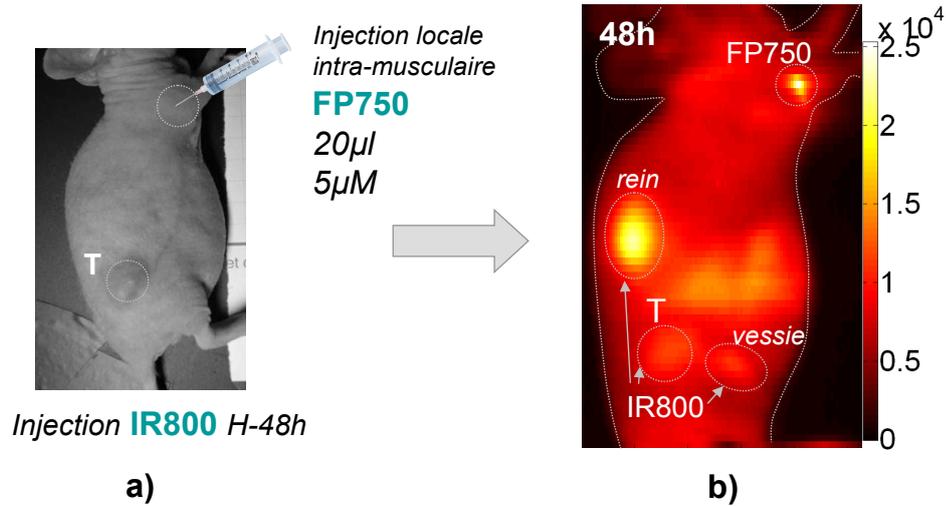


FIGURE 5.20: 200 μl à 50 μM d'IR800 sont injectés à la souris. 48 h plus tard, 20 μl de FP750 sont injectés en intra-musculaire (a), et une acquisition de l'animal est obtenue (b).

non-optimale. Enfin la contribution de FP750 au niveau de l'épaule a été parfaitement isolée.

L'algorithme de FMN_{ps} a séparé sur cet exemple à nouveau trois spectres de fluorescence dans une gamme de longueurs d'onde restreinte. Les spectres de fluorescence de l'autofluorescence, de l'IR800 et des FP750 se chevauchent, et leurs pics d'émission sont plus proches que sur les trois espèces (autofluorescence, ICG-LNP et Alexa 750) testées en capillaire dans une expérience précédente. L'injection locale de FP750 a permis de tester et de repousser les limites de l'algorithme sur un jeu de données réelles, mais dans cette expérience particulière, les marqueurs FP750 n'avaient aucun rôle de ciblage biologique particulier. De plus, dans certaines expériences, plusieurs marqueurs d'intérêt sont injectés pour cibler différents organes ou pour suivre différents phénomènes physiologiques ; cette expérience appuie l'idée qu'un traitement pas FMN permettrait de distinguer dans ce type de cas les divers fluorophores.

5.4 Reconstruction de la distribution des marqueurs fluorescents par FDOT après séparation de spectres par FMN

Nous avons illustré dans les expériences précédentes qu'un traitement des données spectrales par FMN améliore la détection des tumeurs marquées par les fluorophores. Il paraît alors naturel d'utiliser un prétraitement qui élimine l'autofluorescence des tissus avant de reconstruire la distribution des marqueurs en Fluorescence Diffuse Optical Tomography (FDOT) [Soubret 06]. En effet, si la détection des marqueurs est améliorée (amélioration du contraste tumeur/tissu sain), la localisation précise des marqueurs bénéficiera également de la séparation de sources.

Afin d'illustrer le bénéfice d'un pré-traitement par FMN des données pour l'amé-

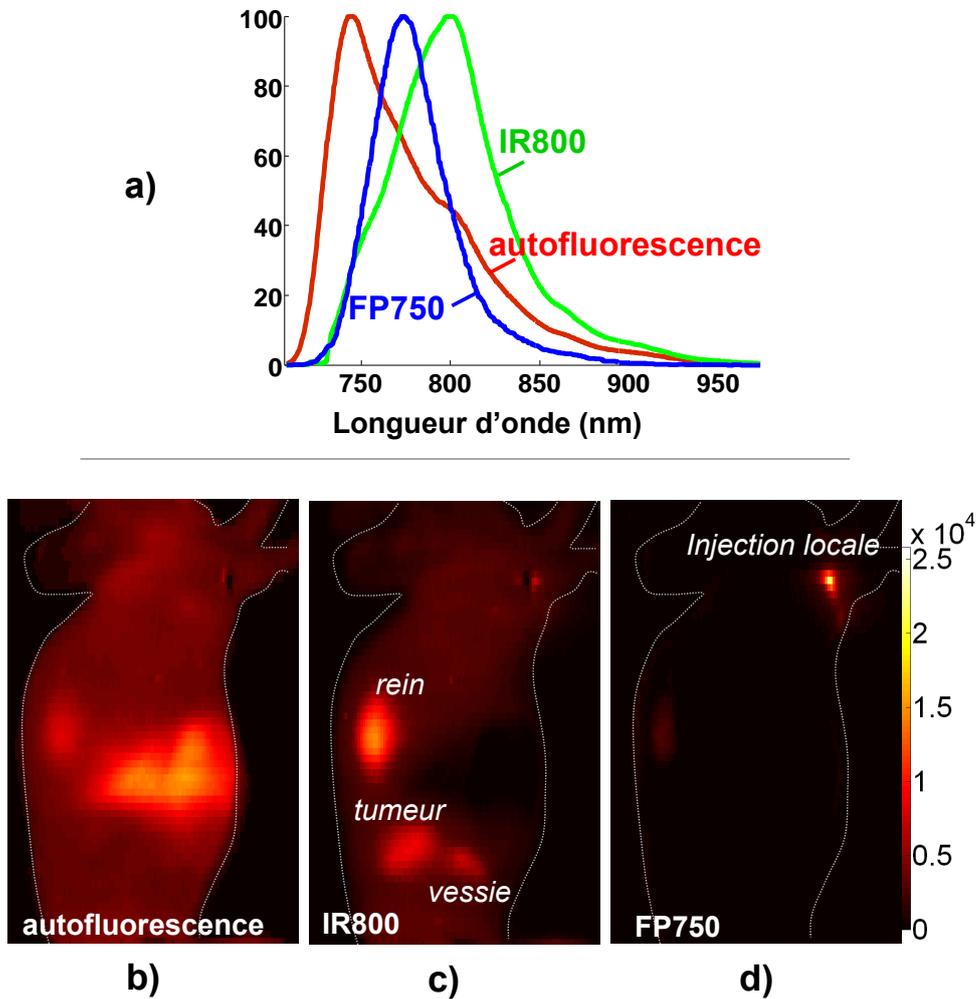


FIGURE 5.21: Après FMN_{ps} : a) Spectres séparés obtenus, b) pondération de l'autofluorescence des tissus sur l'animal, c) contribution d'IR800, d) contribution de FP750.

loration des reconstructions FDOT, nous proposons de décrire dans cette partie une méthode de reconstruction (celle utilisée au sein du laboratoire LISA au CEA pour les applications FDOT) [Koenig 8], et de l'appliquer sur des données acquises sur notre dispositif, avant et après élimination de l'autofluorescence.

5.4.1 Méthode de reconstruction

Pour reconstruire la distribution 3D des marqueurs fluorescents dans le milieu, nous choisissons une méthode de reconstruction qui recherche un fluorophore ponctuel dans le milieu. Le modèle direct est quant à lui basé sur la méthode des volumes finis [Koenig 8, Boutet 09, Koenig 10]. L'algorithme mis en œuvre pour obtenir les représentations en 3 dimensions du milieu est très basique mais permet d'avoir une idée de l'efficacité du prétraitement par FMN sur les reconstructions FDOT. L'optimisation des algorithmes de reconstruction en FDOT est une autre problématique qui n'a pas été étudiée pendant

cette thèse.

5.4.1.1 Problème direct

Le problème direct consiste ici à obtenir l'expression de la fluorescence mesurée, en connaissant le milieu diffusant exploré et la répartition spatiale des fluorophores dans le milieu.

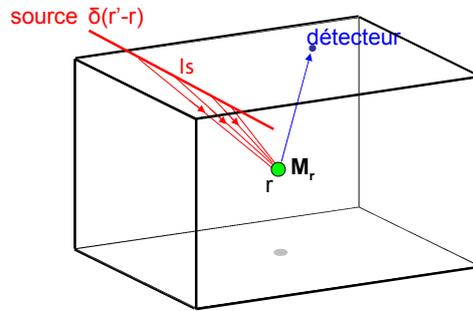
Sur notre système, l'illumination laser en ligne vient exciter les fluorophores du milieu, qui réémettent alors un signal de fluorescence détecté par la CCD. La propagation des photons d'excitation et des photons émis par fluorescence est régie par l'approximation de la diffusion (voir chapitre 1).

En considérant que le milieu est homogène, et que l'illumination est continue, on a (voir chapitre 1) la formulation suivante :

$$\left(\Delta - \frac{\mu_a}{D}\right)\Phi(r) = -\frac{S(r)}{D(\lambda)} \quad (5.1)$$

Modèle direct Le problème direct s'intéresse à modéliser le flux $\Phi(r)$ de fluorescence mesuré en chaque détecteur de notre système, pour chaque position de la source possible, et pour toutes les positions des fluorophores ponctuels.

Pour une position s de la ligne laser l_s , tous les points r' de la ligne source vont exciter l'ensemble des fluorophores du milieu (aux positions r dans le milieu).



La distribution de Dirac δ vérifie la propriété fondamentale suivante pour toute distribution S_s de sources :

$$S_s(r) = \iiint S_s(r')\delta(r' - r)dr' \quad (5.2)$$

On appelle fonction de Green $G(r', r)$ toute solution de l'équation aux dérivées partielles linéaire : $LG(r', r) = \delta(r' - r)$.

Ainsi pour chaque position s de la source, la fonction de Green $G(r', r)$ vérifie l'équation qui décrit la propagation des photons de la source S_s vers un fluorophore en r :

$$\forall s, \forall r' \in S_s, G(r', r) \text{ vérifie } \left(\Delta - \frac{\mu_a}{D}\right)G(r', r) = -\delta(r' - r) \quad (5.3)$$

Finalement, le flux $\Phi(r)$ mesuré en la position r du milieu sera la somme sur le domaine Ω de toutes les contributions des points de la source, d'où :

$$\Phi_s(r) = \int_{\Omega} S_s(r') \cdot G(r', r) \cdot dr' \quad (5.4)$$

Chaque point du milieu en r une fois excité par le flux de photons $\Phi_s(r)$ réémet de la fluorescence. La fluorescence réémise est proportionnelle au flux incident :

$$F_s(r) = \beta(r) \Phi_s(r) \quad (5.5)$$

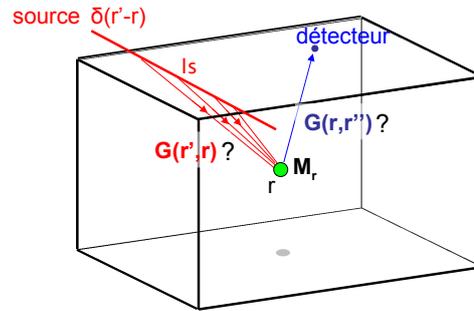
De façon analogue, on peut alors décrire la propagation des photons du fluorophore en r vers le détecteur en r'' . On obtient le flux de photons mesuré en r'' et provenant de r :

$$\Phi_s(r'') = \int_{\Omega} F_s(r) \cdot G(r, r'') \cdot dr \quad (5.6)$$

On peut finalement obtenir le flux mesuré en r'' et initié par la source S :

$$\Phi_{sd}(r'') = \int_{\Omega} \int_{\Omega} \underbrace{S_s(r') \cdot G(r', r)}_{\text{source-fluorophore}} \cdot \underbrace{F_s(r) \cdot G(r, r'')}_{\text{fluorophore-détecteur}} \cdot dr' \cdot dr \quad (5.7)$$

La résolution de 5.3 mène aux fonctions $G(r', r)$ et $G(r, r'')$, solutions de l'approximation de la diffusion des photons des sources aux fluorophores du milieu, et des fluorophores aux détecteurs, pour chaque source, fluorophore et détecteur du milieu.



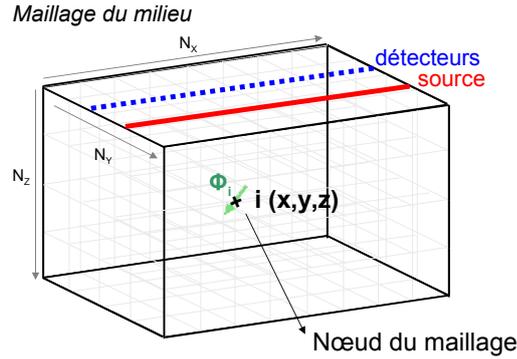
Méthode des Différences finies Pour résoudre les équations aux dérivées partielles sur un milieu diffusant de forme arbitraire il n'existe pas de forme analytique pour décrire la propagation de la lumière, on doit donc utiliser une approche numérique.

De telles approches (éléments finis, différences finis, volumes finis par exemple) nécessitent que le milieu soit discrétisé (en des nœuds et éléments de volumes), et fournissent une approximation de la solution de l'équation [Arridge 95, Ntziachristos 01]. La précision de la solution sera d'autant meilleure que le maillage sera fin.

En pratique, nous utilisons des routines déjà mises en place dans le laboratoire LISA (CEA), basées sur **la méthode des volumes finis**[Boutet 09].

Par la suite, les fantômes optiques sur lesquels nous travaillerons sont de forme parallélépipédique dont la discrétisation en maillage régulier est la plus adaptée. Dans ce cas précis, la méthode des volumes finis est équivalente à la **méthode des différences finies**, aussi nous proposons de décrire ici la discrétisation de l'équation différentielle par la méthode des différences finies, plus simple à expliquer.

Résolution Considérons un maillage à N ($N = N_X \times N_Y \times N_Z$) nœuds :



Pour chaque position de la source d'excitation $\delta(r_s-r)$, le système suivant est résolu :

$$\left(\Delta - \frac{\mu_a}{D} \right) \times \Phi_s = -\delta(r_s-r)$$

$$\underbrace{\left(\begin{matrix} & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \end{matrix} \right)}_{\mathbf{L}} \underbrace{\left(\begin{matrix} \Phi_1 \\ \vdots \\ \Phi_N \end{matrix} \right)}_{\Phi_s} = - \underbrace{\left(\begin{matrix} \delta_s \end{matrix} \right)}_{\delta_s}$$
(5.8)

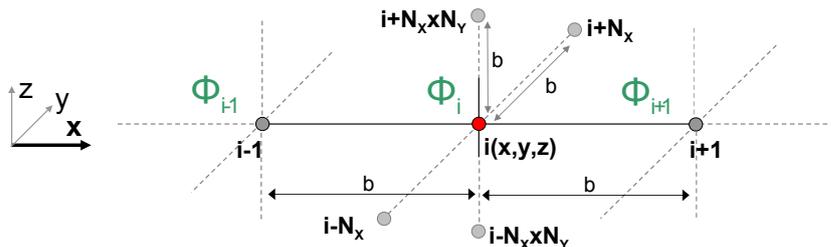
où Φ_s est le vecteur de taille $1 \times N$ recherché, qui contient la valeur du flux en tout point i ($i \in (1, N)$) du maillage. La méthode des différences finies consiste à remplacer les dérivées par des différences finies. Ainsi on approche :

$$f'(x) = \lim_{b \rightarrow 0} \frac{f(x+b) - f(x)}{b}$$
(5.9)

par :

$$f'(x) \simeq \frac{f(x+b) - f(x)}{b}$$
(5.10)

Pour résoudre le système 5.8, on cherche à exprimer le Laplacien du flux par différences finies.



Pour une position de la source donnée, et au point i de coordonnées (x, y, z) du maillage, la dérivée première du flux Φ_i , par exemple par rapport à la composante x , peut être estimée ainsi :

$$\frac{\partial \Phi_i}{\partial x} \simeq \frac{\Phi_{i+1} - \Phi_i}{b} \quad \text{et} \quad \frac{\partial \Phi_i}{\partial x} \simeq \frac{\Phi_{i-1} - \Phi_i}{b} \quad (5.11)$$

D'où la dérivée seconde :

$$\frac{\partial^2 \Phi_i}{\partial^2 x} \simeq \frac{\Phi_{i+1} - 2 \times \Phi_i + \Phi_{i-1}}{b^2} \quad (5.12)$$

Le même calcul peut être obtenu sur les composantes y et z :

$$\frac{\partial^2 \Phi_i}{\partial^2 y} \simeq \frac{\Phi_{i+N_x} - 2 \times \Phi_i + \Phi_{i-N_x}}{b^2} \quad \text{et} \quad \frac{\partial^2 \Phi_i}{\partial^2 z} \simeq \frac{\Phi_{i+N_x \times N_y} - 2 \times \Phi_i + \Phi_{i-N_x \times N_y}}{b^2} \quad (5.13)$$

Bien entendu, l'expression du Laplacien est impossible pour les nœuds sur les bords du maillage. Pour ces cas particuliers, des conditions aux limites sont décrites à la fin de ce paragraphe. Pour les autres nœuds, l'écriture matricielle de l'opérateur L pour une position s de la source donnée est la suivante :

Composantes $x + y + z$ de Δ

$$\begin{pmatrix} \frac{6}{b^2} - \frac{\mu_a}{D} & \frac{1}{b^2} & \frac{1}{b^2} & \frac{1}{b^2} & 0 \\ \frac{1}{b^2} & \frac{6}{b^2} - \frac{\mu_a}{D} & \frac{1}{b^2} & \frac{1}{b^2} & 0 \\ 0 & \frac{1}{b^2} & \frac{6}{b^2} - \frac{\mu_a}{D} & \frac{1}{b^2} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{b^2} & \frac{6}{b^2} - \frac{\mu_a}{D} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \frac{1}{b^2} & \frac{6}{b^2} - \frac{\mu_a}{D} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \Phi_1 \\ \Phi_2 \\ \vdots \\ \Phi_N \\ \Phi_N \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} \delta_s \end{pmatrix}$$

$\left(\Delta - \frac{\mu_a}{D} \right) \times \text{flux} = \text{source}$

Conditions aux limites En pratique, le modèle présenté précédemment ne prend pas en compte les nœuds en bord de maillage où les différences finies ne pourront pas être appliquées. Les équations de propagation doivent donc être complétées par des équations qui gèrent les conditions aux limites du milieu.

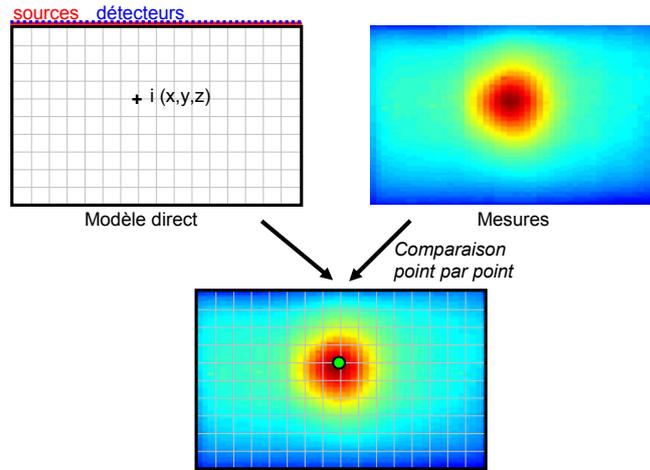
Diverses conditions aux limites sont envisageables pour compléter l'approximation de diffusion [Haskell 94] ; parmi ces conditions nous pouvons citer par exemple la **condition aux limites de courant partiel** qui fait un bilan de puissance au niveau de l'interface milieu-hors milieu [Ishimaru 77], la **condition aux limites extrapolées** [Case 67] qui elle impose que la densité de photons s'annule à une distance d_e de la

Pour tout fluorophore m du milieu, on recherche la quantité F_m qui minimise l'écart entre le modèle de flux et nos mesures Φ_{sd}^{mes} :

$$\forall m, F_m = \underset{F}{\operatorname{argmin}} \|G_{sm} \cdot G_{md} \cdot F - \Phi_{sd}^{mes}\|^2 \quad (5.18)$$

Enfin parmi les F_m obtenus, on cherchera les positions des fluorophores dans le milieu qui minimisent la quantité χ_m^2 :

$$\chi_m^2 = \|G_{sm} \cdot G_{md} \cdot F_m - \Phi_{sd}^{mes}\|^2 \quad (5.19)$$



5.4.2 Exemple sur fantôme optique

Après avoir sommairement présenté la méthode reconstruction que nous avons choisie [Koenig 8, Koenig 10], nous présentons un exemple d'application sur fantôme optique. Nous proposons de reconstruire la distribution de fluorophores en 3D à partir de données acquises sur notre système. Nous analysons le résultat de localisation obtenu selon que les données reconstruites ont subi ou non un pré-traitement pour éliminer l'autofluorescence du fantôme.

5.4.2.1 Expérience

Un fantôme optique à base d'eau, d'intralipide, d'encre et de PPIX est préparé. La PPIX rend le fantôme autofluorescent, de façon très homogène. Les coefficients optiques obtenus pour ce fantôme sont proches de ceux du sein, à savoir $\mu_a \simeq 0,04 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu'_s \simeq 8 \text{ cm}^{-1}$ à 720 nm (mesure obtenue au TCSPC). Nous plaçons un capillaire rempli de $5 \mu\text{l}$ à $1 \mu\text{M}$ d'ICG-LNP à 1 cm de profondeur dans le fantôme (voir schéma 5.22-a).

Une acquisition complète de la fluorescence du fantôme est obtenue sur notre système : à la mesure de la fluorescence du capillaire s'ajoute le signal homogène d'autofluorescence du fantôme, comme présenté figure 5.22-b). Une point fluorescent plus petit est mesuré sur la droite de l'image : il s'agit ici du bouchon du capillaire autour duquel un peu de marqueur ICG-LNP est resté bloqué. Nous appliquons à ces données l'algorithme de \mathbf{FMN}_{pdm} , avec une contrainte de parcimonie sur le capillaire fluorescent très localisé dans le fantôme (contrainte ici choisie à 0.8).

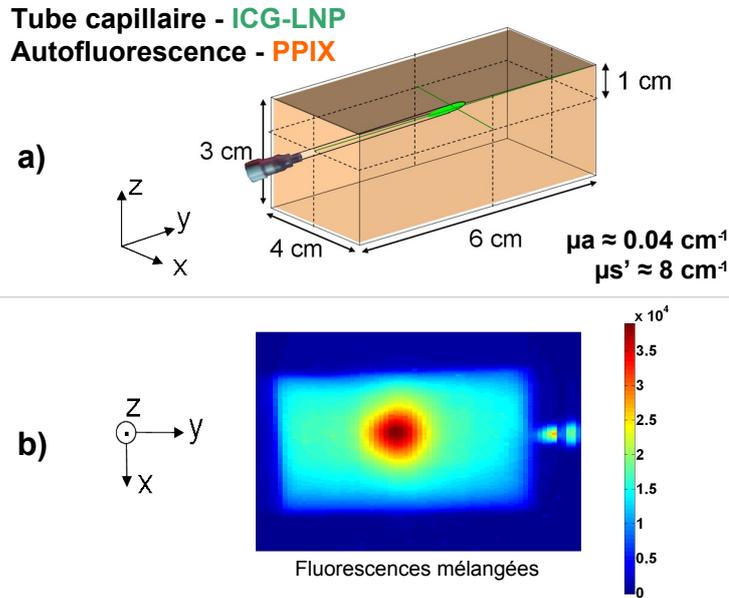


FIGURE 5.22: Expérimentation sur un fantôme optique à base d'eau, d'intralipide, d'encre et de PPIX. a) Positionnement d'un capillaire rempli d'ICG-LNP à 1 cm de profondeur pour simuler une tumeur marquée, b) Profil d'intensité (spectres sommés en chaque point de l'acquisition) obtenu, couplant les contributions d'auto fluorescence du fantôme et de fluorescence du capillaire d'ICG-LNP.

5.4.2.2 Séparation de spectres

L'algorithme de séparation de sources permet de séparer la fluorescence des ICG-LNP de l'auto fluorescence (PPIX) du fantôme : les spectres obtenus et les profils d'intensité (pondération des fluorophores dans les données) séparés sont respectivement présentés figures 5.23-a, 5.23-b et 5.23-c. La FMN a parfaitement isolé la fluorescence du capillaire ; aucun résidu d'auto fluorescence n'est mesuré autour. Les spectres de fluorescence obtenus sont proches de ceux attendus (forme, pics d'émission).

L'homogénéité de l'auto fluorescence du fantôme est très bien restaurée après FMN : l'absence d'un « trou » à l'emplacement du marqueur est signe de la qualité de la séparation obtenue.

5.4.2.3 Reconstruction

Nous appliquons la méthode de reconstruction présentée au début de cette partie à nos données, avant et après séparation des sources de fluorescence par \mathbf{FMN}_{pdm} .

Reconstruction sur données avant séparation Les données mélangées avant séparation comportent un signal étalé d'auto fluorescence sur tout le fantôme, et un signal plus ponctuel au centre du fantôme provenant du capillaire rempli d'ICG-LNP.

En appliquant l'algorithme de reconstruction aux données brutes (voir figure 5.22-b), nous obtenons la reconstruction tridimensionnelle de la distribution des marqueurs

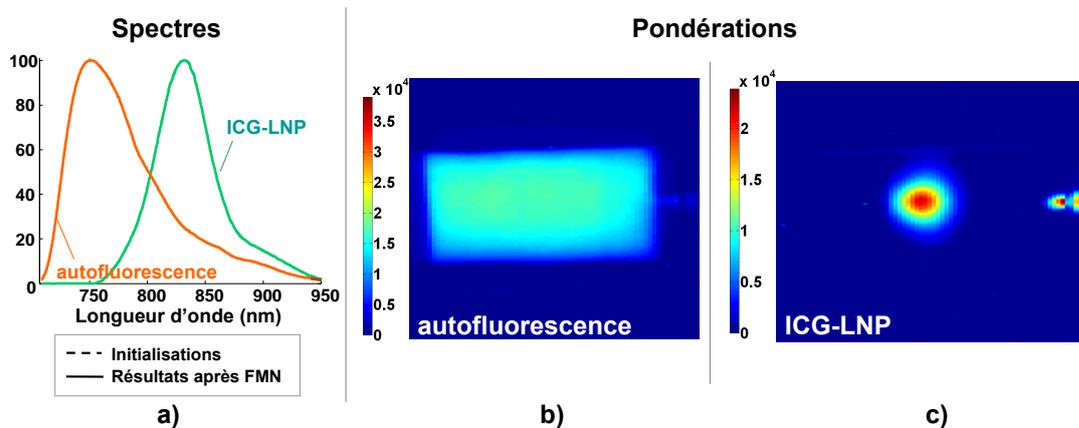


FIGURE 5.23: L'algorithme de FMN_{pdm} est appliqué aux données : a) spectres de fluorescence obtenus, b) contribution séparée d'autofluorescence, c) contribution d'ICG-LNP.

présentée figure 5.24-a : les marqueurs sont localisés dans le fond du fantômes, et en plus grande quantité qu'ils ne le sont en réalité dans le capillaire.

L'autofluorescence autour du signal du capillaire peut s'interpréter comme une diffusion plus large du signal de fluorescence des marqueurs. Le signal semble alors avoir été émis par des marqueurs plus profondément enfoui dans le fantôme, ce qui conforte le résultat obtenu. D'un autre côté, l'intensité maximale mesurée au centre du fantôme est la somme du signal de fluorescence des marqueurs avec la contribution du signal d'autofluorescence constant émis par le fantôme. Plus l'intensité du signal détecté est élevé, et plus les marqueurs devraient se situer proches de la surface. En effet nous avons déjà précédemment mis en évidence (notamment sur la simulation du sein) la perte exponentielle de l'intensité du signal avec la distance parcourue par la lumière dans les tissus. L'intensité plus élevée du signal peut alors être mal interprété comme la présence de marqueurs plus proches de la surfaces qu'ils ne le sont réellement.

Ici la détection de fluorescence en tous les points du maillage (soit d'un signal très diffus) est responsable de la reconstruction 3D des marqueurs bien plus éloignés des détecteurs qu'ils le sont en réalité.

Reconstruction sur données après FMN Une fois les données traitées par FMN_{pdm} et l'autofluorescence éliminée (voir figure 5.23-c), nous appliquons l'algorithme de reconstruction. Cette fois les marqueurs sont correctement localisés, puisque l'intensité du signal n'est due qu'à l'émission de fluorescence des marqueurs, et la diffusion du signal est cette fois cohérente avec des marqueurs à 1 cm de profondeur pour les propriétés optiques connues du fantôme.

Bilan du chapitre

Dans ce dernier chapitre nous avons appliqué la théorie et les algorithmes de FMN mis au point en séparation de spectres sur données acquises *in vivo* et sur fantômes optiques.

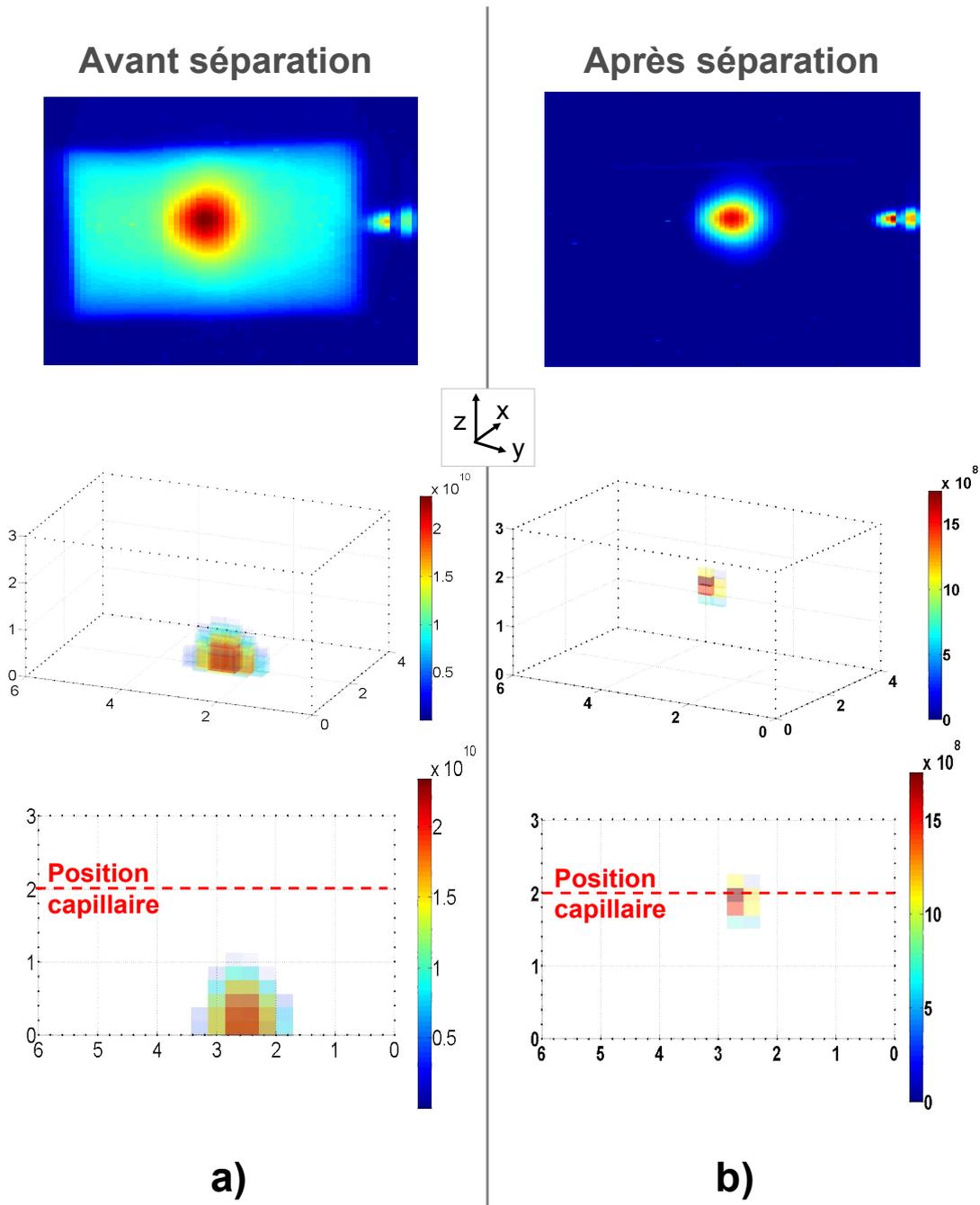


FIGURE 5.24: Influence du pré-traitement par FMN sur les reconstructions de la distribution de marqueurs. a) Reconstruction obtenue sur les données mélangées, avant la séparation de spectres, b) reconstruction obtenue sur les données traitées par FMN.

Avant de traiter l'élimination de l'autofluorescence par voie numérique en appliquant les méthodes de séparation de spectres développées au chapitre 4, nous avons proposé d'illustrer l'influence du réglage de l'écart entre les sources et les détecteurs par deux résultats expérimentaux. Une simulation avait d'ores et déjà été proposée au second chapitre, mettant en avant l'intérêt d'écartier les détecteurs des sources pour détecter

des cibles fluorescentes en profondeur. Ici les deux expériences, sur fantôme puis sur souris, appuient ce résultat : la détection des capillaires fluorescents est nettement améliorée après un réglage optimal de l'écart entre les sources et les détecteurs.

La seconde partie du chapitre est consacrée uniquement à l'élimination de l'autofluorescence post-acquisition, par traitement des données. Le choix de l'algorithme de FMN et de la régularisation la mieux adaptée aux différentes acquisitions est souvent facilement justifiable : une expérimentation sur souris où des capillaires remplis de marqueurs sont utilisés pour simuler des tumeurs très localisées demandera par exemple un algorithme de FMN avec contraintes de parcimonie \mathbf{FMN}_p . Dans les cas où les marqueurs fluorescents (que nous utilisons) sont directement injectés à l'animal, la parcimonie spatiale des marqueurs n'est plus un *a priori* acceptable. En effet, les marqueurs injectés ne se fixent pas uniquement à la tumeur, et un signal non spécifique important est mesuré sur toute la souris. Le traitement de ces données a alors requis l'utilisation d'une méthode FMN simple sans contrainte, ou \mathbf{FMN}_{r_i} avec contrainte sur l'initialisation. Cette dernière régularisation nécessite un choix pertinent de l'initialisation de l'algorithme, et un réglage fin des paramètres de régularisation, ce qui rend son utilisation plus fastidieuse.

Pour toutes les données traitées, quel que soit l'algorithme retenu, la séparation des spectres a permis d'atténuer (dans les meilleurs cas d'éliminer) l'autofluorescence parasite : la détection des marqueurs a ainsi toujours été améliorée. Pour les expérimentations avec injection du marqueur sur petit animal, les résultats varient également selon les fluorophores utilisés : l'IR800 (sur un traceur de type RAFT-(cRGD)₄) est plus spécifique à la tumeur et offre un meilleur contraste tumeur/tissu sain que les ICG-LNP.

Suite à la problématique posée au chapitre 3 sur la distorsion des spectres de fluorescence des marqueurs suivant la profondeur à laquelle ils se situent dans les tissus, une étude sur simulation au chapitre 4 avait conclu qu'un seul spectre moyen suffirait pour localiser un même marqueur fluorescent à deux profondeurs différentes ; le nombre de sources de fluorescence dans le modèle de FMN n'avait alors pas besoin d'être incrémenté. Dans ce chapitre, nous avons proposé l'étude *in vivo* de la détection de plusieurs tumeurs à différentes profondeurs ; l'algorithme de FMN a permis de détecter deux capillaires sur souris, situés à quelques millimètres de profondeur l'un de l'autre, quand les données non-traitées ne permettaient d'en distinguer qu'un seul.

Les algorithmes se sont avérés tout aussi performants sur la séparation d'un plus grand nombre de marqueurs : en expérimentation sur capillaires ou après injection des marqueurs, la FMN a permis de séparer jusqu'à deux fluorophores différents de l'autofluorescence des tissus.

Enfin, ce chapitre met en évidence l'intérêt d'un prétraitement par FMN sur les données pour l'amélioration des reconstructions FDOT de la distribution des marqueurs fluorescents dans le milieu. Après une description sommaire de l'algorithme de reconstruction utilisé, une expérience sur fantôme optique est proposée pour illustrer cette idée. Sur nos donnée spectrales, sans l'extinction du signal d'autofluorescence, nous avons obtenu une reconstruction 3D incorrecte de la distribution des marqueurs dans le

fantôme ; après traitement des données et élimination de l'autofluorescence, nous avons pu cette fois précisément localiser les marqueurs dans le milieu.

Conclusion et perspectives

Conclusion

Dans le but de discriminer par leurs spectres plusieurs sources fluorescentes, nous avons mis en oeuvre un dispositif de mesures résolues en longueur d'onde. Le système expérimental que nous avons imaginé et mis en place nous a permis d'obtenir les spectres de fluorescence en chaque point de fantômes optiques et souris *in vivo*. Dans le cas où des marqueurs fluorescents sont injectés aux sujets, les spectres mesurés sont des combinaisons linéaires des spectres d'autofluorescence et des spectres des fluorophores d'intérêt.

En parallèle, l'état de l'art sur les études cliniques des paramètres optiques du sein et sur les ratios tumeur/tissus sains typiques des marqueurs fluorescents existants nous a conduits à implémenter des simulations de détection de fluorophores dans des tissus mammaires autofluorescents. Les travaux sur ces cas simulés nous ont permis d'explorer diverses configurations et de contrôler des paramètres tels que les contrastes offerts par les marqueurs, ou encore la profondeur à laquelle ils se situent dans les tissus.

Lors de l'étude du comportement spectral de l'autofluorescence, nous avons mis en avant la difficulté à déterminer l'origine précise de la fluorescence des tissus biologiques dans le rouge et le proche infrarouge. Quand la fluorescence exogène des aliments ingérés par l'animal est indéniable, la contribution de fluorophores endogènes des tissus n'est quant à elle pas vérifiée. Nous avons seulement proposé quelques hypothèses sur la fluorescence potentielle de certains fluorophores endogènes des tissus biologiques.

En nous appuyant sur plusieurs expérimentations *in vivo* sur souris, nous avons pu étudier les propriétés spectrales du signal d'autofluorescence. Bien que le spectre de fluorescence de ce signal parasite soit peu variable d'une localisation à l'autre sur la souris, il n'en est pas de même de l'intensité mesurée ; nous avons notamment observé systématiquement un signal plus intense dans les intestins, l'estomac et le foie de l'animal, ce qui conforte l'hypothèse de la fluorescence des aliments. Quant aux marqueurs fluorescents, nous avons simulé puis observé la déformation de leur spectre suivant la profondeur à laquelle ils se situent dans les tissus, et selon les propriétés optiques du

milieu ; cette déformation s'accompagne également d'une décroissance exponentielle de l'intensité de fluorescence comme prévu par le modèle. Enfin le photoblanchiment et la composition du milieu dans lequel les agents de contraste sont injectés sont des facteurs susceptibles de modifier les spectres de fluorescence détectés.

Face à ces résultats, nous avons privilégié la mise en place d'une méthode de séparation de sources dite aveugle pour laquelle peu d'information *a priori* sur les fluorophores est nécessaire. Notre choix s'est finalement porté sur une séparation par Factorisation en Matrices Non-négatives (FMN) qui offre l'avantage de séparer des données non-négatives, comme l'analyse de données spectrométriques le préconise. Sans information *a priori* sur les sources, la modélisation du problème de séparation par factorisation matricielle – typique des cas de séparation de sources aveugles – offre une infinité de solutions admissibles. Bien que la décomposition FMN restreigne l'ensemble de décompositions par sa contrainte intrinsèque de non-négativité, nous avons montré par une étude sur simulations du sein que l'ajout d'information *a priori* sur les sources fluorescentes améliorerait les résultats d'élimination de l'autofluorescence. Nous avons ainsi proposé diverses régularisations à l'algorithme classique de FMN, sur l'initialisation des données et la répartition parcimonieuse des marqueurs d'intérêt dans les tissus, agrémentées d'une preuve de convergence et/ou d'études de faisabilité sur simulations.

Les différents algorithmes régularisés ont finalement été testés sur des données réelles acquises sur notre dispositif, sur fantômes optiques et *in vivo* sur souris. Pour chaque expérimentation sur petit animal, un protocole précis a été proposé, et validé par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale de Grenoble. Sur toutes les acquisitions testées, les méthodes de séparation de sources FMN les plus adaptées ont toujours augmenté le contraste entre la zone tumorale marquée et les tissus environnants, améliorant ainsi la détection de la cible dans les tissus. Les algorithmes sont également performants dans la séparation de plusieurs sources : la séparation de deux fluorophores en plus de l'autofluorescence a été réalisé sur souris *in vivo*. Enfin nous avons validé et illustré à travers un exemple sur données réelles l'utilité d'un prétraitement des données et de l'élimination primordiale de l'autofluorescence pour une reconstruction précise de la distribution des marqueurs dans le milieu. L'élimination de l'autofluorescence permet d'améliorer les reconstructions FDOT tridimensionnelles des distributions des marqueurs et donc de localiser correctement les tumeurs ciblées. L'utilisation de notre méthode de séparation spectrale permet de repousser la limite de détection des marqueurs dans les tissus biologiques de plusieurs centimètres et rapproche l'imagerie optique de fluorescence des applications cliniques visées.

Perspectives

Les perspectives qui s'ouvrent après ces travaux de thèse portent sur le traitement des signaux et les méthodes de séparation de spectres, mais aussi sur l'étude chimique et biologique de l'autofluorescence.

Nous mettons tout d'abord en avant quelques améliorations qui pourraient être

apportée à la méthode que nous avons mise en place.

Nous avons proposé divers algorithmes régularisés pour lesquels le choix du paramètre de régularisation est pratiquement toujours empirique. De même, la valeur du coefficient de parcimonie à imposer dans l'algorithme est pour l'instant choisie par l'utilisateur. Une étude plus spécifique, par exemple sur simulations, permettrait de renforcer ce point ; la mise en oeuvre d'une méthode choisissant automatiquement les paramètres de régularisation permettrait de renforcer l'algorithmie et de soulager l'utilisateur. En restant sur l'algorithme avec contrainte de parcimonie, nous n'avons pas démontré la convergence de la méthode et nous nous sommes uniquement appuyés sur des résultats de simulations satisfaisants ; il serait intéressant de se pencher sur la démonstration complète de l'algorithme. En restant dans le domaine de la régularisation, de nouvelles contraintes pourraient être ajoutées au modèle, comme par exemple l'unimodalité des spectres d'émission recherchés [Bro 8].

De plus, le dispositif expérimental que nous avons monté acquiert les données spectrométriques sous forme d'un cube de données : deux dimensions sont les dimensions spatiales, et la troisième les longueurs d'onde. Par souci de simplification, nous avons toujours réarrangé nos données sous forme d'un tableau deux dimensions où les données spatiales n'étaient alors plus différenciées. Le traitement direct du cube de données permettrait d'ajouter des contraintes spatiales sur la distribution des fluorophores ; le modèle utilisé pour décomposer le signal ne serait alors plus décrit par une factorisation de matrices, mais impliquerait le traitement de tenseurs par le biais de méthodes telle que la Factorisation en Tenseurs Non-négatifs (NTF) [Cichocki 09].

Enfin, nous nous sommes concentrés pour ces travaux de thèse sur l'élimination de l'autofluorescence par traitement des données post-acquisition. Nous avons proposé sur simulation puis sur données réelles d'observer l'influence sur le dispositif du réglage de l'écart entre les sources et les détecteurs. Les exemples que nous avons proposé mettent en avant l'intérêt d'écarter les sources et détecteurs (jusqu'à présents superposés) pour détecter des cibles fluorescentes en profondeur, et atténuer le signal d'autofluorescence des premiers millimètres de tissus. L'exploitation de ces premiers résultats très encourageants et une étude consacrée à ce sujet permettrait d'optimiser le dispositif d'acquisitions et d'atténuer le signal d'autofluorescence avant traitement par séparation de spectres.

De nos analyses et résultats au cours de cette thèse se sont également dégagés plusieurs nouveaux axes d'étude qu'il serait intéressant de suivre.

Une première limite sur ce travail est le manque d'information quant à l'origine du signal d'autofluorescence dans les gammes du rouge et du proche infrarouge. Nos résultats bénéficieraient d'une étude biologique et chimique complémentaire de ce phénomène. La prise en compte d'information *a priori* plus spécifiques dans notre méthode de séparation de sources serait alors envisageable, par exemple sur la répartition des fluorophores naturels dans le milieu, ou sur les spectres d'émission des composants responsables de ce signal.

Les études *in vivo* ont également souligné le problème du signal *non spécifique* émis par les marqueurs circulant dans le milieu et qui ne se fixent pas à la cible biologique. Ce signal non négligeable perturbe la détection des marqueurs fixés à la tumeur, et

ne peut être spectralement éliminé puisqu'il émet à la même longueur d'onde que le signal d'intérêt. L'étude plus approfondie du comportement des marqueurs et de leur distribution dans les organes, par exemple au cours du temps, pourrait aboutir à la mise en place de nouveaux *a priori* et de nouvelles méthodes de traitement des données spectroscopiques de fluorescence auxquelles le paramètre du temps aurait été ajouté. Le développement de techniques de séparation de sources de type NTF [Cichocki 09] ou PARAFAC [Bro 7] devraient alors être envisagées.

ANNEXE A

Spectromètre Andor : fiche technique

SPECTROSCOPY



- The Shamrock 163 Series are the latest addition to the Andor family of imaging spectrographs based on Czerny-Turner optical design. They feature a 163 mm focal length, an entrance aperture ratio of f/3.6 and a wavelength resolution of 0.17 nm.
- Their superior performance, compact size, low cost and versatility make them attractive to researchers and Original Equipment Manufacturers. The Shamrock 163 Series can be used either as an imaging (SR-163i) or as a non-imaging (SR-163) spectrograph.
- Coupled to Andor's compact, high performance USB cameras, Shamrock 163 Series are the ideal tool for absorption/transmission, fluorescence, reflection and source characterization.

- Czerny-Turner optical design with Patented imaging corrected optics
- The most compact imaging spectrograph on the market
- Unique interchangeable grating turret
- Calibrated micrometer drive for accurate wavelength tuning
- Interchangeable fixed slits
- Useable in all mounting positions
- Wide range of accessories available

● Models

SR-163i	Imaging Shamrock 163 spectrograph
SR-163	Non-imaging Shamrock 163 spectrograph

● Spectrograph Overview:

Czerny-Turner arrangement with imaging toroidal optics

Focal Length (mm)	163
Entrance Aperture Ratio	f/3.6
Resolution	0.17nm or better *
Grating size (mm)	40 x 40
Focal plane (WxH, mm)	28 x 10
Spectral Dispersion	4.43 nm/mm at 500 nm (1200 l/mm grating)
Wavelength accuracy (nm)	± 0.25*
Wavelength Repeatability (nm)	± 0.05*
Horizontal magnification (Spectral Mode)	1
Vertical magnification (Spectral Mode)	1.8
Slit (SR-163 only)	Interchangeable fixed widths
Sizes (mm) SR-163	198 x 216 x 96
SR-163i	210 x 216 x 96
Weights	
SR-163	3.5kg
SR-163i	3.9kg
Shutter specification (SR-163i only)	Shutter used for imaging, multi-track fibres and background subtraction. Minimum exposure time 0.1 sec, Max frequency 1 Hz



* Measured with 1200 l/mm grating, 10 µm slit and 13.5µm pixel size CCD

● Slit Options

Slit width (μm)	Slit height (mm)	Resolution @ 546 nm*	Andor Part Number
10	3	0.17	SR1-SLT-10-3
25	3	0.28	SR1-SLT-25-3
50	3	0.46	SR1-SLT-50-3
75	3	0.58	SR1-SLT-75-3
100	3	0.69	SR1-SLT-100-3
200	3	1.1	SR1-SLT-200-3
500	3	2.0	SR1-SLT-500-3

*Resolution measured with 1200 l/mm grating and 13.5μm pixel size CCD.

● Grating Options

Lines/mm	Blazed (nm)	Recommended Spectral Region (nm) >20%	Nominal Dispersion (nm/mm)	Bandpass (nm) †	Resolution @546 nm*	Peak Efficiency (%)	Andor Part Number
150	300	200-800	40.21	1070	1.57	70	SR1-GRT-0150-0300
150	500	350-1200	40	1064	1.36	74	SR1-GRT-0150-0500
200	730	430-1800	29.87	795	1.16	80	SR1-GRT-0200-0730
300	300	230-700	20.1	535	0.78	75	SR1-GRT-0300-0300
300	500	275-900	19.9	529	0.77	80	SR1-GRT-0300-0500
300	760	420-1700	19.61	522	0.76	88	SR1-GRT-0300-0760
300	860	500-1800	19.48	518	0.76	85	SR1-GRT-0300-0860
400	400	210-750	14.9	396	0.58	65	SR1-GRT-0400-0400
400	550	300-1100	14.73	392	0.57	85	SR1-GRT-0400-0550
400	850	480-2000	14.34	381	0.56	75	SR1-GRT-0400-0850
500	330	230-900	11.91	317	0.46	73	SR1-GRT-0500-0330
500	560	330-1250	11.63	309	0.45	80	SR1-GRT-0500-0560
500	770	400-2000	11.34	302	0.44	86	SR1-GRT-0500-0770
600	300	200-650	9.896	263	0.38	85	SR1-GRT-0600-0300
600	500	300-1050	9.65	257	0.38	85	SR1-GRT-0600-0500
600	750	450-1400	9.29	247	0.37	74	SR1-GRT-0600-0750
900	550	320-1500	6.11	162	0.24	81	SR1-GRT-0900-0550
1200	300	200-600	4.76	126	0.18	77	SR1-GRT-1200-0300
1200	500	250-800	4.43	118	0.17	74	SR1-GRT-1200-0500
1200	750	460-1600	3.89	103	0.16	83	SR1-GRT-1200-0750
1800 [‡]	500	320-800	2.59	69	0.1	90	SR1-GRT-1800-0500
2400 [‡]	300	200-800	2.12	56	0.08 ^{**}	69	SR1-GRT-2400-0300

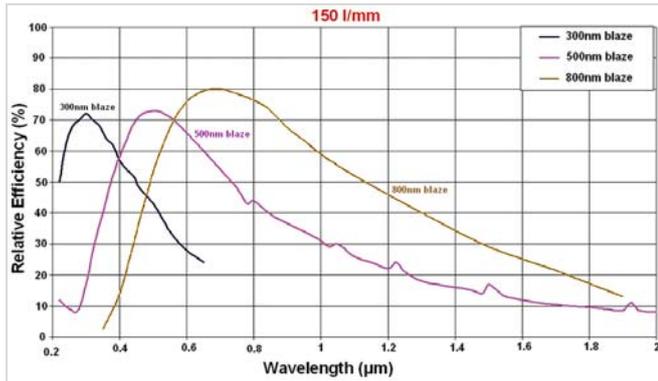
† Measured with 27.6mm wide CCD

* Resolution measured with 10 μm slit and 13.5 μm pixel size CCD

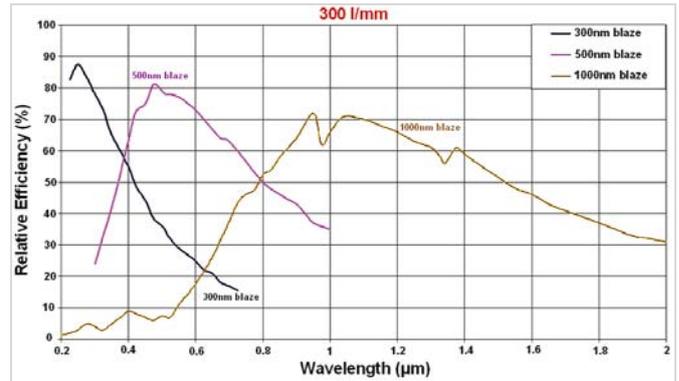
‡ The upper wavelength of 1800 and 2400 l/mm gratings are limited by the spectrograph mechanical to 720 and 540 nm respectively

** For 2400 l/mm grating resolution measured @ 435nm

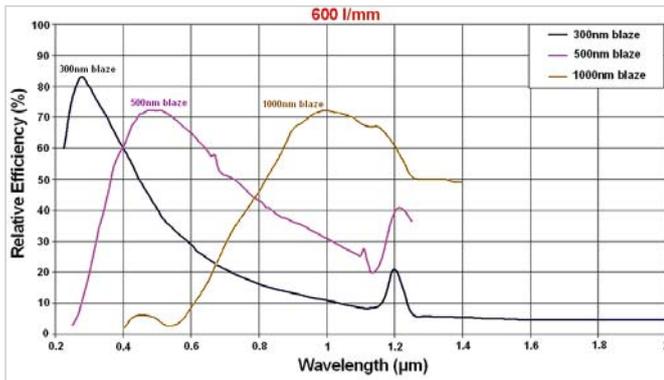
● Grating Efficiency Curves



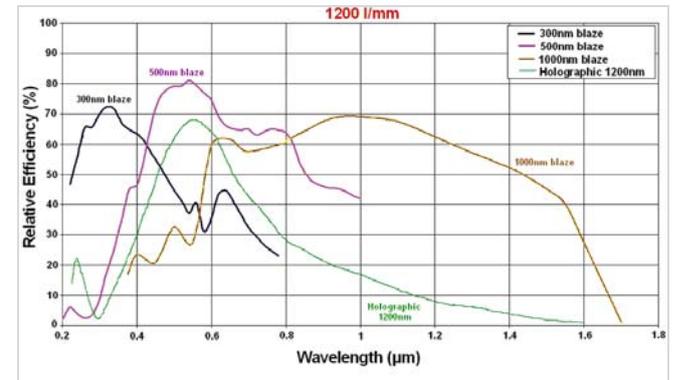
150 l/mm ruled



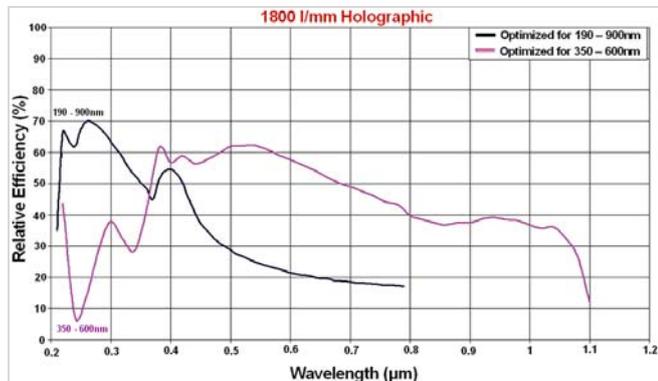
300 l/mm ruled



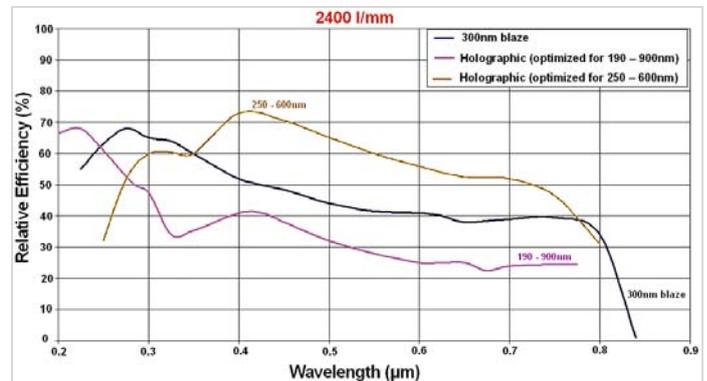
600 l/mm ruled



1200 l/mm ruled and holographic



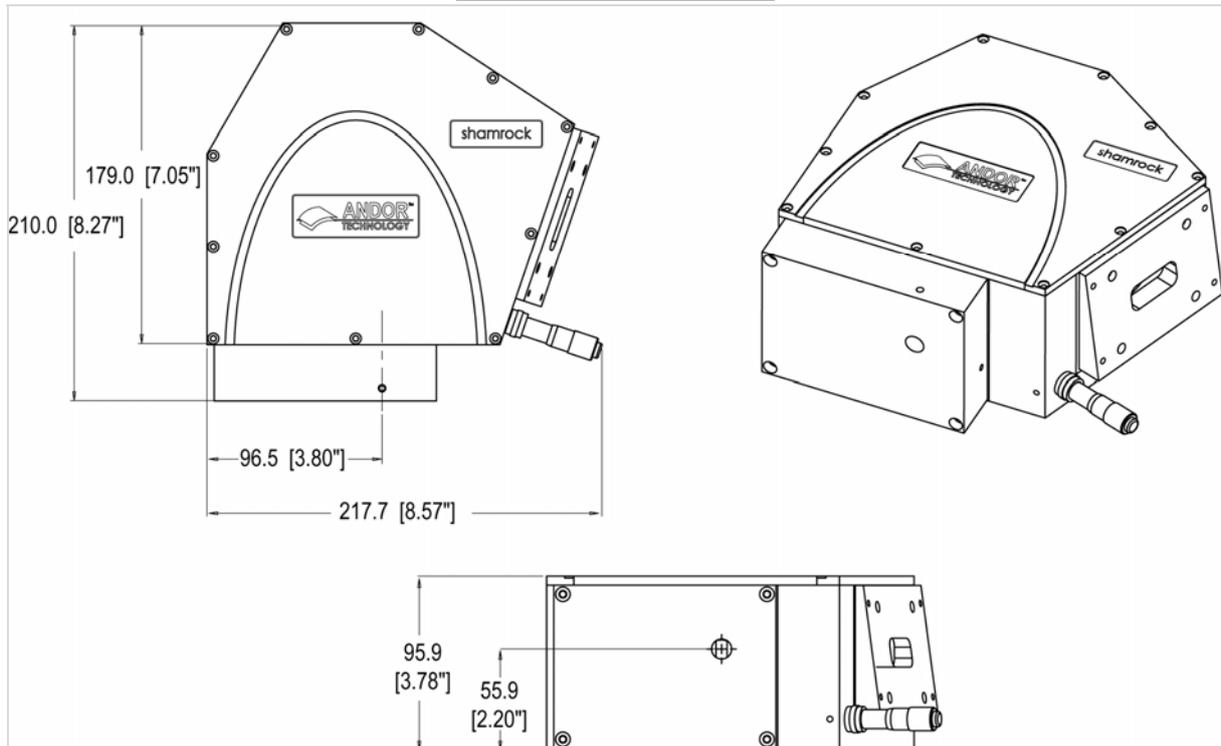
1800 l/mm holographic



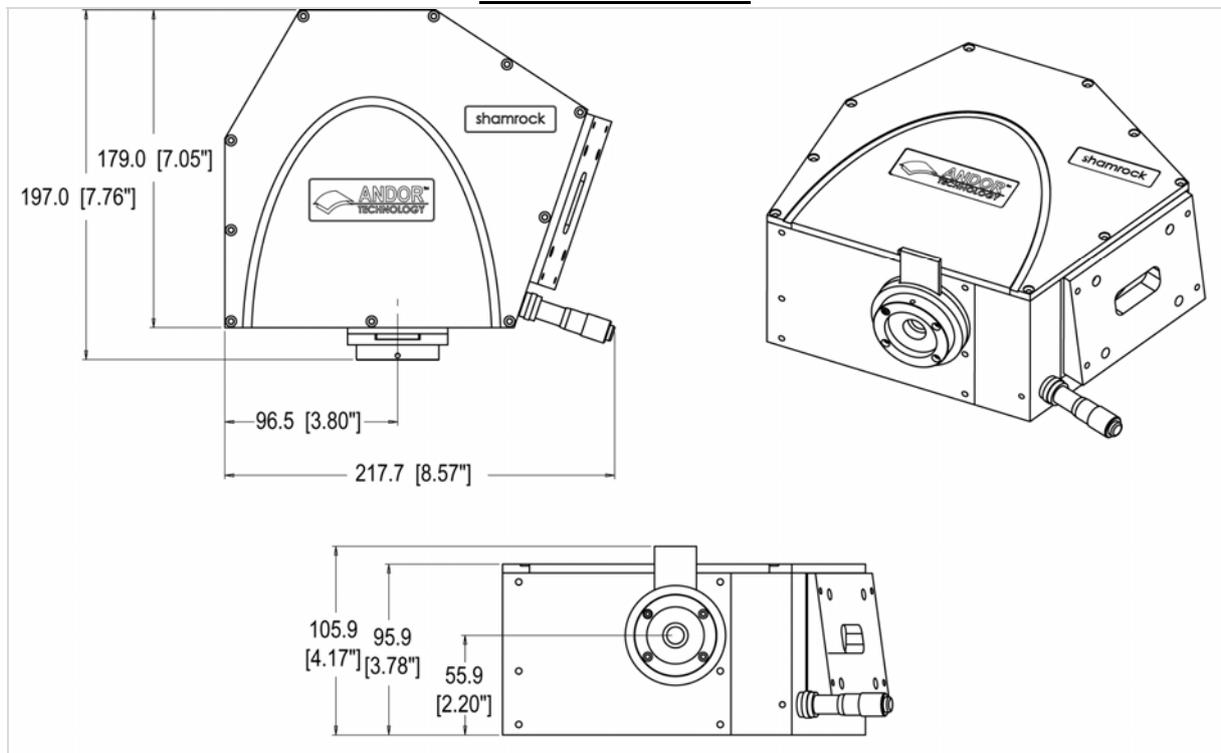
2400 l/mm ruled and holographic

● Dimensions

Shamrock SR-163i with Shutter



Shamrock SR-163 with Slit



● **Ordering information**

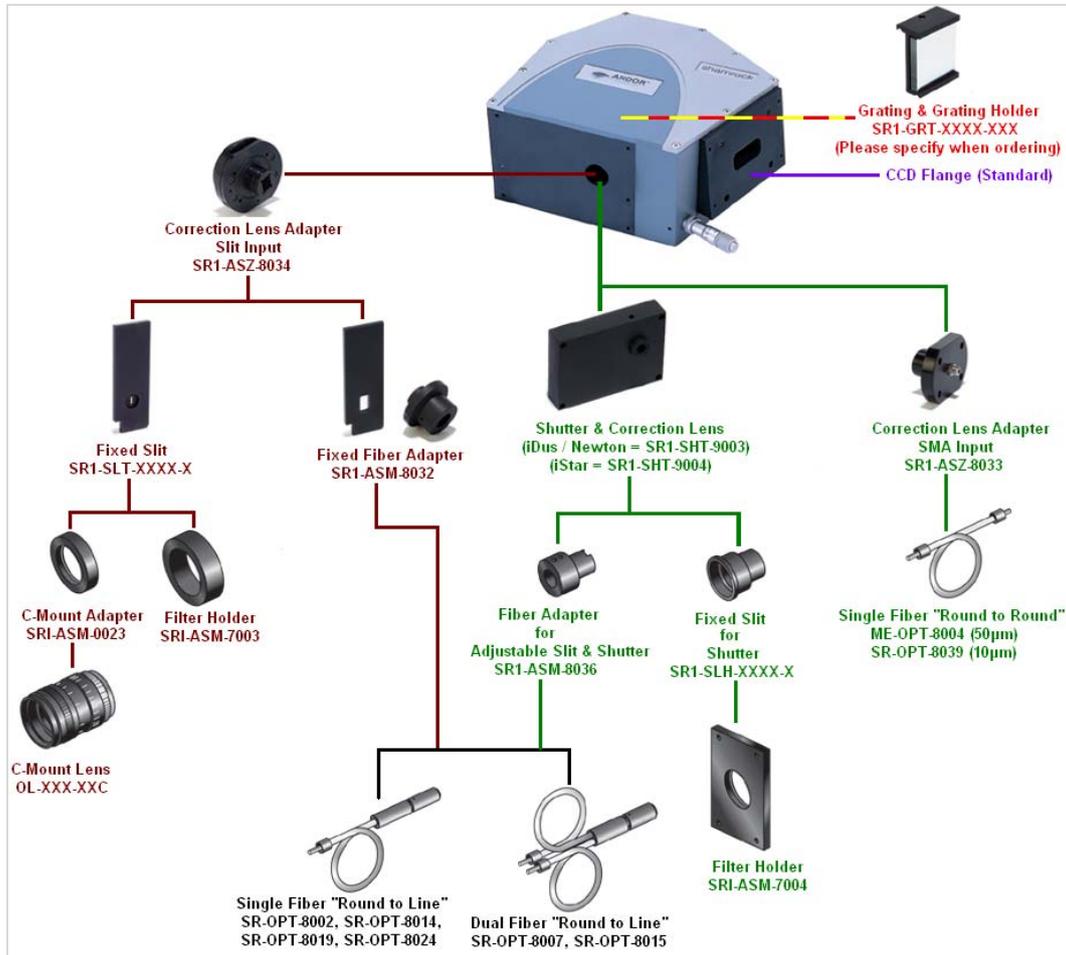
To order this spectrograph quote one of the following model numbers:

SR-163i Imaging Shamrock 163 spectrograph (base unit + CCD flange).

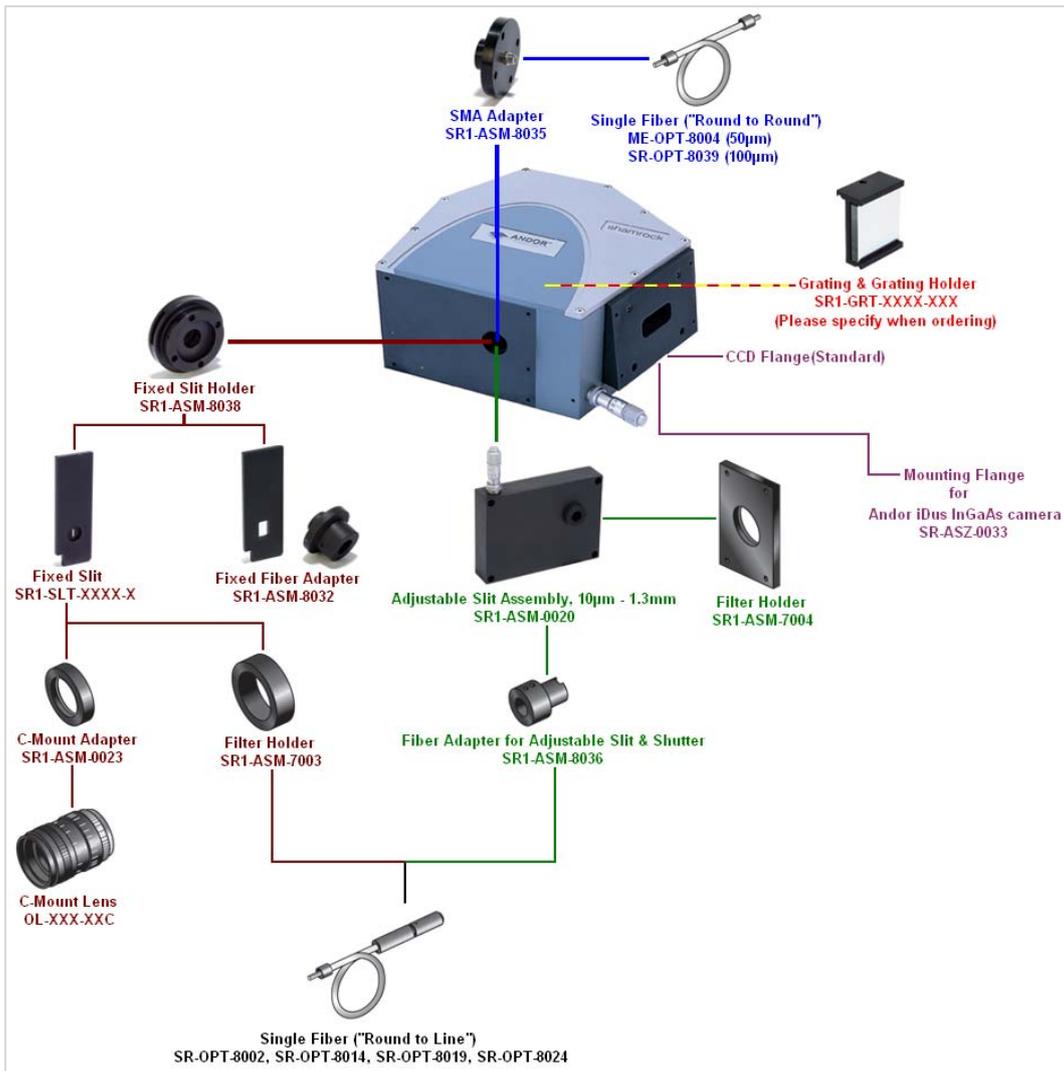
SR-163 Non-imaging Shamrock 163 spectrograph (base unit + CCD flange).

To view the range of accessories available for the SR-163 & SR-163i, please refer to the illustrations below and on the next page

● **Accessories available for use with the SR-163i are shown below:**



● Accessories available for use with the SR-163 are shown below:



Need more information? Please contact us at:

International Office	US Office	Japanese Office	Chinese Office
Phone +44 28 9023 7126	Phone 800.296.1579	Phone +81 3 3511 0659	Phone +86-10-5129-4977
Fax +44 28 9031 0792	Fax 860.290.9566	Fax +81 3 3239 8264	Fax +86-10-6445-5401

ANNEXE B

Caméra CCD Andor : fiche technique

SPECTROSCOPY



" New USB Camera for Spectroscopy "

Andor's DV420A CCD camera with USB offers the best price/performance for a wide range of spectroscopy applications.

The 1024 x 255 array with 26µm² pixels offers the best dynamic range versus resolution.

The system boasts minimal dark current with thermoelectric cooling down to -70° C.

- Peak QE of 95%
- Min operating temp of -70°C with TE cooling
- UltraVac™ *1
- Simple USB Connection
- Single window design
- Front or back illuminated sensor
- 26 x 26µm pixel size
- Andor Solis software
- Software selectable pre-amplifier gain (PAG)
- ... High detector sensitivity
- ... Negligible dark current without the aggravation or safety concerns associated with LN₂
- ... Critical for sustained vacuum integrity and to maintain unequalled cooling and QE performance, year after year.
- ... USB connection direct from back of the camera – no controller box required
- ... Delivers maximum photon throughput
- ... Offers the ultimate in price/performance options
- ... Optimised pixel size for high dynamic range and resolution
- ... Friendly Windows user interface offers system integration, automation and advanced data manipulation facilities
- ... Offers best choice for noise and dynamic range

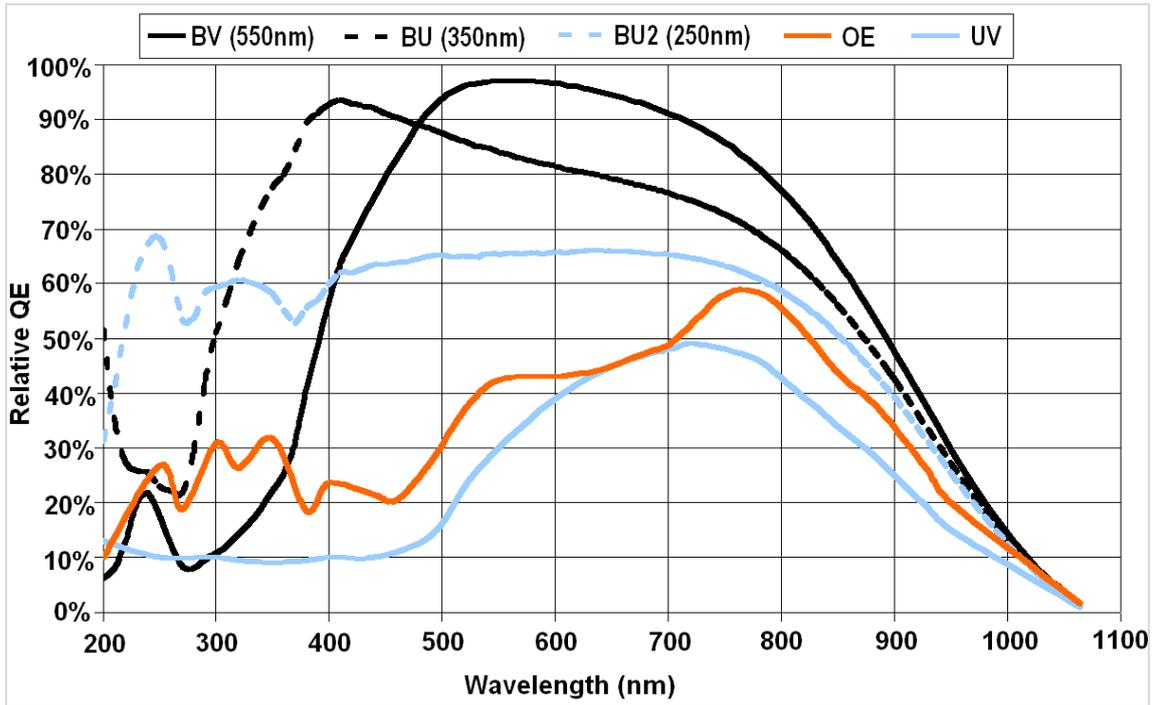
● Camera Overview:

Active Pixels*2	1024 x 255
Pixel Size (W x H; µm)	26 x 26
Image Area (mm)	26.6 x 6.7
Pixel well depth (e ⁻ , minimum) [OE]	300,000 [200,000]
(typical) [OE]	465,000 [395,000]
Register Well Depth (e ⁻ , typical) *3	1,000,000
Max spectra per sec (FVB) *4, *10	75
Read Noise (e ⁻ , typical)*	4 @ 33 kHz

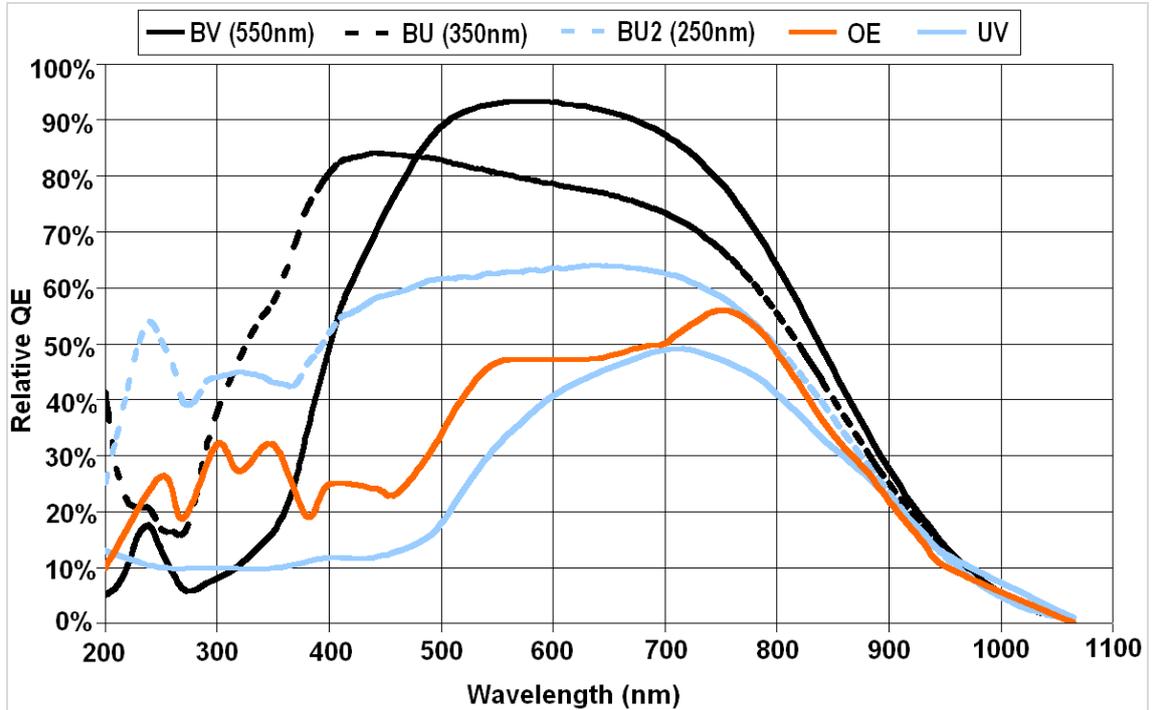
* Noise quoted is for OE device



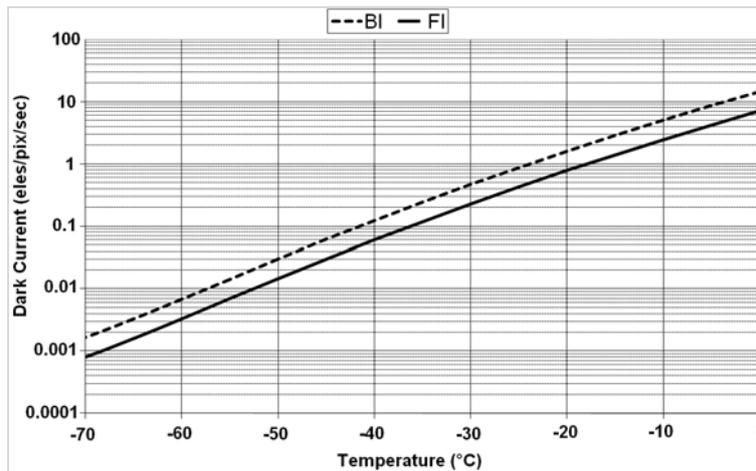
● Quantum Efficiency @ Room Temperature*5



● Quantum Efficiency @ -100°C



● Dark Current*6



● Minimum Temperature *7

	Using PS-24
Air-cooled (ambient air @ 20°C)	-55°C
Re-circulator (XW-RECR) (ambient air @ 20°C)	-65°C
Water-cooled (@ 10°C, 0.75 l / min)	-70°C

● System Characteristics

Dummy Pixels *8	8, 8, 0, 0												
Linearity (% , maximum) *9	1												
Vertical Clock Speed (µs) *10	8, 16, 32												
Sensitivity (e-/count) typical values	<table border="1" style="display: inline-table;"> <thead> <tr> <th></th> <th>PAG x1</th> <th>PAG x1.7</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>@ 33 KHz</td> <td>2</td> <td>N/A</td> </tr> <tr> <td>@ 50 KHz</td> <td>3.5</td> <td>2.5</td> </tr> <tr> <td>@ 100 KHz</td> <td>14</td> <td>9</td> </tr> </tbody> </table>		PAG x1	PAG x1.7	@ 33 KHz	2	N/A	@ 50 KHz	3.5	2.5	@ 100 KHz	14	9
	PAG x1	PAG x1.7											
@ 33 KHz	2	N/A											
@ 50 KHz	3.5	2.5											
@ 100 KHz	14	9											
Digitization	16-bit												
Camera window type	Single quartz window; AR coating and MgF ₂ window available												

● Noise

System Readout Noise (e-) *11 [BI]

	Typical	Maximum
33 kHz pixel readout rate	4 [5]	6 [8]
50 kHz pixel readout rate	5 [6]	8 [9]
100 kHz pixel readout rate	8 [11]	12 [15]

● Computer

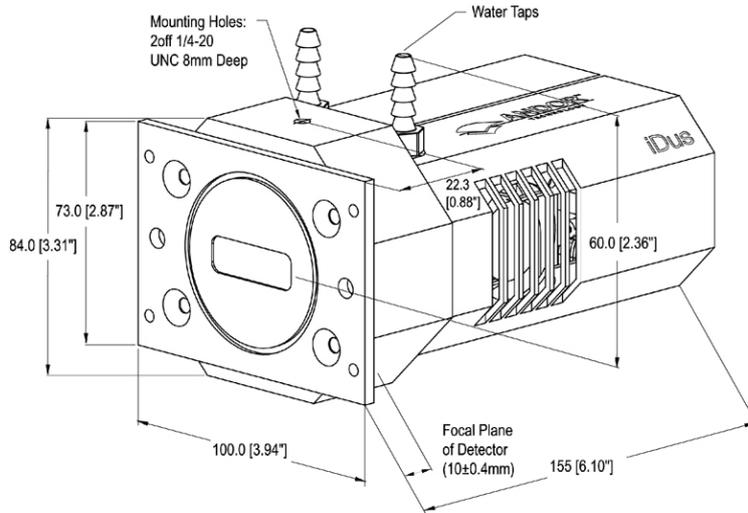
- Minimum:
- 800MHz Pentium + 256Mbytes RAM
 - Minimum of 25MB free hard disc to install software
 - USB 2.0
- Recommended:
- 2.4GHz Pentium (or better) + 512 Mbytes RAM

● Operating & Storage Conditions

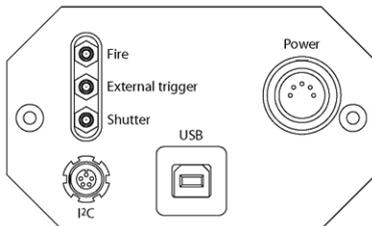
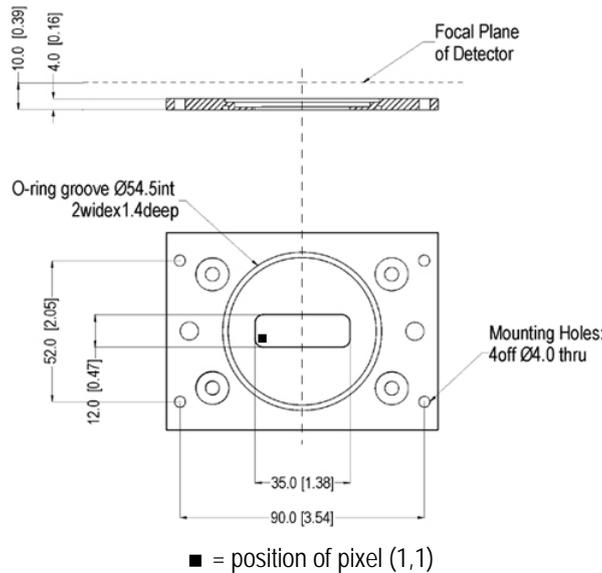
Operating Temperature	0°C to 30°C ambient
Relative Humidity	< 70% (non-condensing)
Storage Temperature	-25°C to 55°C

● Dimensions

● Weight: 2 Kg [4 lb 8 oz]



NOTE: There are two mounting holes (1/4-20UNC), one located on the top of the CCD head and one on the bottom. They are positioned centrally at a distance of 22mm from the front of the front face.



Rear connections

Cable clearances required at rear of camera:

Exit connector type	Clearance
Power supply cable	90 mm
USB cable	60 mm
Right angled variant of power supply cable	40 mm

NOTE: There are two (1/4-20UNC) mounting holes. One is located on the top of the camera head and the other is located on the bottom of the head. They are positioned centrally at a distance of 22mm from the front of the front face.

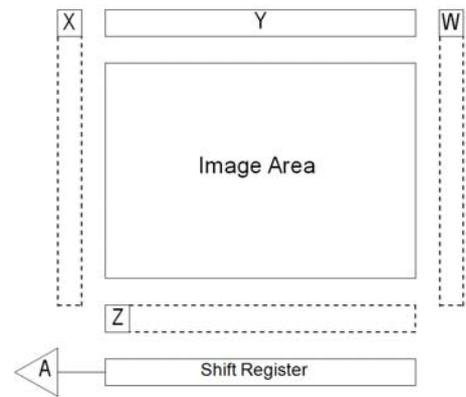
SPECIFICATIONS ARE SUBJECT TO CHANGE WITHOUT NOTICE

● **Notes**

- ◆1 Assembled in a state-of-the-art Class 10,000 clean-room facility, Andor's UltraVac™ vacuum process combines a permanent hermetic vacuum seal (no o-rings), with a stringent protocol to minimize outgassing, including use of proprietary materials. Outgassing is the release of trapped gases that would otherwise prove highly problematic for high-vacuum systems.
- ◆2 Edge pixels may exhibit a partial response.
- ◆3 The register well depth that is actually accessible by the CCD system is dependent on the sensitivity setting
- ◆4 Based on a Horizontal Pixel Readout of 100KHz and a vertical pixel shift of 8μS
- ◆5 Quantum efficiency of the CCD sensor as measured by the CCD Manufacturer
- ◆6 The graph shows typical dark current level as a function of temperature for front illuminated (FI) and back illuminated (BI) CCDs. The dark current measurement is averaged over the CCD area excluding any regions of blemishes.
- ◆7 Cooling is provided by the use of an external mains driven power brick. Minimum temperatures listed are typical values. Systems are specified in terms of minimum dark current achievable rather than absolute temperature
- ◆8 Chip manufacturers may include a number of pixels or elements that are neither active nor part of the shift register. Andor refers to these pixels as dummy pixels and represents them in a 4-part notation (W,X,Y,Z), where:

- W = dummy pixels to the right of the shift register (non-amplifier end)
- X = dummy pixels to the left of the shift register (amplifier end)
- Y = dummy pixels at the top of the image area
- Z = dummy pixels between the shift register and the image area.
- A = position of output amplifier

It should be noted that the elements can be made up of either, pixels, rows or columns. The diagram shows what is seen when looking at the front of the CCD.



- ◆9 Linearity is measured from a plot of Counts vs. Signal up to the saturation point of the system. Linearity is expressed as a percentage deviation from a straight line fit.
- ◆10 Vertical speeds are software selectable. All sensors are guaranteed to operate at 16μS vertical pixel shift and most can be clocked faster. At these faster speeds there may be some degradation of Charge Transfer Efficiency (CTE).
- ◆11 System Readout noise is for the entire system. It is a combination of CCD readout noise and A/D noise. Measurement is for Single Pixel readout with the CCD at a temperature of -50°C and minimum exposure time under dark conditions. Noise is measured at the highest available pre-amplifier gain for each speed.

● **Ordering Information**

To order the camera you require, please quote one of the following model number(s):

- DV420A- BV:** back illuminated – AR coated for optimal performance in the visible region
- BU:** back illuminated – AR coated for optimal performance in the 350 nm region
- BU2:** back illuminated – AR coated for optimal performance in the 250 nm region
- UV:** front illuminated device with UV coating
- OE:** open electrode device

- The DV420A is supplied with the following:
 - PS-24** Power supply
- The DV420A also requires one of the following software options:
 - Andor Solis (S)** A ready-to-run Windows 2000 or XP-based package with rich functionality for data acquisition and processing.
 - Andor SDK** A DLL driver and software development kit that let you create your own applications for the Andor Camera. Available for Windows 2000 or XP and Linux.
- The DV420A is available with the following input window options (which must be ordered at time of build):
 - OPTION-C1-AR1** AR coated quartz window (broadband visible 400-900nm)
 - OPTION-C1-MGF2** Magnesium Fluoride window
- The following accessories are available for use with the DV420A:
 - XW-RECR** Re-circulator for enhanced cooling performance
 - SD-166** iDus shutter driver
 - P25 Shutter** Prontor 25mm shutter

Need more information? Please contact us at:

International Office	US Office	Japanese Office	Chinese Office
Phone +44 28 9023 7126	Phone 800.296.1579	Phone +81 3 3511 0659	Phone +86-10-5129-4977
Fax +44 28 9031 0792	Fax 860.290.9566	Fax +81 3 3239 8264	Fax +86-10-6445-5401

Caractérisation Spectro+CCD

Une des premières expérimentations à effectuer lors de l'utilisation de matériel et notamment de la caméra CCD est la caractérisation de cette dernière. Dans notre cas, le système est composé d'une caméra CCD, mais couplée à un spectromètre, ce qui complique la caractérisation. Le maximum de caractérisations a été effectué, mais nous nous sommes principalement reposés sur les données du constructeur (des tests sont effectués sur chaque appareil avant envoi). Les vérifications qui ont tout de même pu être effectuées sont détaillées dans les parties suivantes.

C.1 Linéarité du système

La caméra CCD utilisée est une caméra 16 bits. Nous nous attendons donc à obtenir un niveau de gris maximum égal à 2^{16} , soit 65536. Pour tester la linéarité du système, l'intensité lumineuse (en niveaux de gris) est mesurée, en fonction du temps d'ouverture du shutter (soit le temps d'acquisition du signal). Le résultat est présenté sur la figure C.1 et nous pouvons conclure que le système est tout à fait linéaire.

C.2 Bruits de lecture et d'obscurité

Nous allons maintenant tester sur notre système le comportement du matériel en fonction de différents types de phénomènes, comme les bruits de lecture et d'obscurité.

C.2.1 Bruit de lecture

Il est dû à :

- l'efficacité du transfert de charge,
- l'amplification analogique.

Ce bruit est obtenu en mesurant l'offset de la courbe C.2.

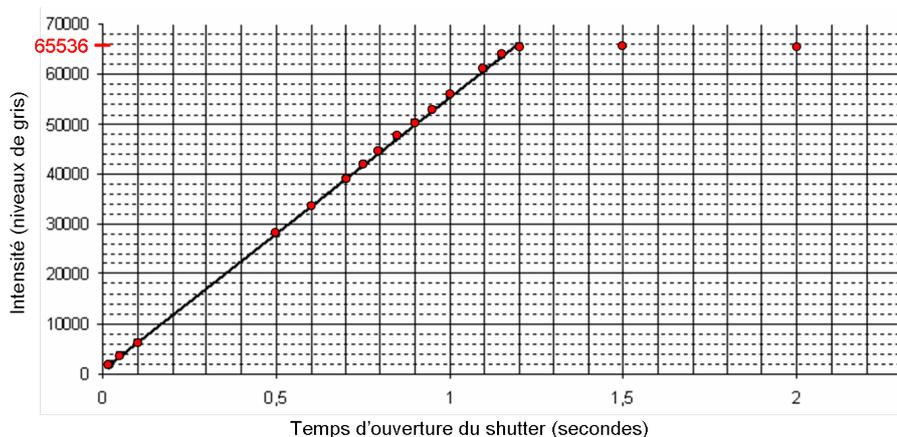


FIGURE C.1: Étude de la linéarité du système : caméra couplée au spectromètre. Une fois l'intensité maximale atteinte (ici à partir d'1.2 secondes), l'image est saturée.

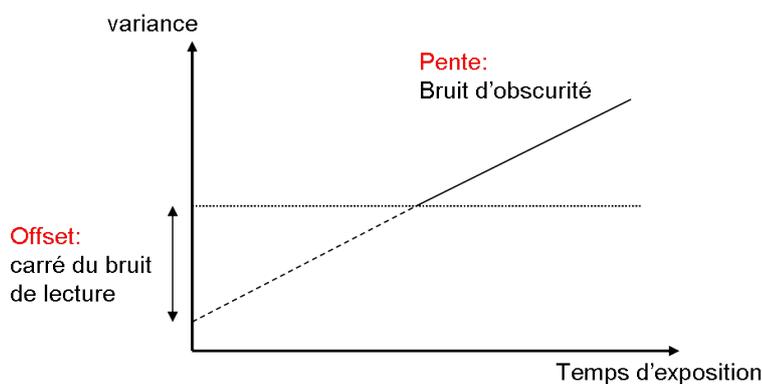


FIGURE C.2: Définition des bruits de lecture et d'obscurité

C.2.2 Bruit d'obscurité

Selon certains auteurs, il s'agit d'électrons arrachés spontanément à la matrice. Pour d'autres, du rayonnement de corps noir. Enfin, certains auteurs le considèrent comme le bruit photonique associé au courant d'obscurité. Nous l'évaluons à partir de la pente de la courbe C.2.

Dans le cas de notre système, les résultats obtenus sont tirés de la courbe expérimentale C.3. Pour obtenir ce graphique, nous avons acquis deux images de noir (sans source laser éclairée ou autre type de source) pour plusieurs temps d'acquisitions, et calculé la variance de la différence des deux images pour chaque temps d'acquisition. Nous obtenons :

- Bruit de lecture : il est égal à la racine carré de l'ordonnée à l'origine obtenue, soit ici $0.2442^{0.5} = 0.4942$ niveaux de gris soit : $1.8 \cdot (\text{pas de quantification})^1 = 7.6$ électrons pour une valeur typique de 6 électrons.
- Bruit d'obscurité : il est égal à la pente obtenue, soit 0.0013.

1. La forme typique d'un quantifieur est une fonction en escalier. La largeur d'un intervalle de l'escalier est appelée le pas de quantification

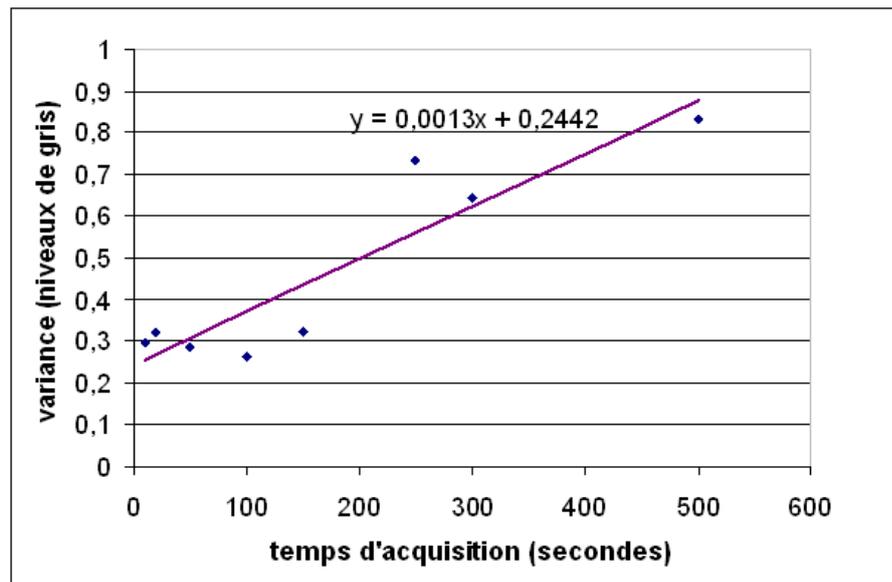


FIGURE C.3: Résultats expérimentaux pour la mesure du bruit de lecture et d'obscurité

Ces deux bruits sont totalement négligeables devant les mesures de signaux effectuées avec le système.

C.2.3 Le courant d'obscurité

Nous nous sommes contentés des données du constructeur, personnalisées pour chacun de nos composants, donc très précises. Ainsi, le courant d'obscurité est donné par la courbe du constructeur C.4. Cette courbe donne le niveau de courant d'obscurité en fonction de la température, pour un éclairage de face (front illuminated, FI) ou de dos (back illuminated, BI) de la CCD.

Les différents bruits ont donc été testés ou analysés d'après les données du constructeur, et le système ne présente aucune anomalie.

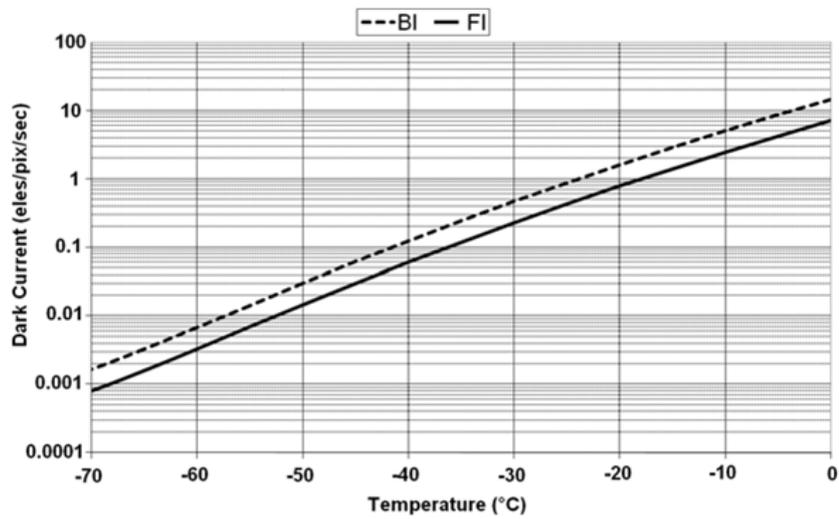


FIGURE C.4: *Courant d'obscurité : données du constructeur (Andor) pour la caméra CCD. BI : back illuminated, FI : front illuminated*

Détermination des propriétés optiques d'un milieu à l'aide d'une chaîne TCSPC

L'une des méthodes permettant de caractériser un milieu diffusant (soit son absorption et sa diffusion) utilise la mesure de courbes temporelles. La chaîne d'acquisition qui permet de mesurer la dispersion temporelle d'une impulsion lumineuse après traversée du milieu diffusant est décrite dans le paragraphe suivant.

D.0.4 Présentation de la chaîne d'acquisition TCSPC

Pour mesurer les courbes temporelles, nous disposons d'une chaîne d'acquisition Comptage de Photons Uniques Corrélés dans le Temps (TCSPC) (de l'anglais *Time Correlated Single Photon Counting*) que nous allons présenter dans cette partie. Une source laser envoie un faisceau lumineux focalisée sur l'entrée d'une fibre d'excitation, qui va éclairer le milieu diffusant. Le signal est collecté par la fibre de détection dont l'extrémité est placée devant un photomultiplicateur (PM). Une carte à comptage de photon unique exploite le signal du photomultiplicateur pour générer les courbes temporelles.

D.0.4.1 Principe et fonctionnement du TCSPC

A la sortie du photomultiplicateur, la carte de comptage détecte des photons uniques, soit un seul photon maximum par impulsion lumineuse. Nous enregistrons le temps d'arrivée de ce photon, l'origine des temps étant donné par le signal de synchronisation de la source laser. Après renouvellement de ce processus un grand nombre de fois, à la fréquence de répétition de la source laser, un histogramme des temps d'arrivée des photons –appelé fonction d'étalement temporelle du point (TPSF) (pour l'anglais *Temporal Point Spread Function*)– est obtenu (voir schéma D.2).

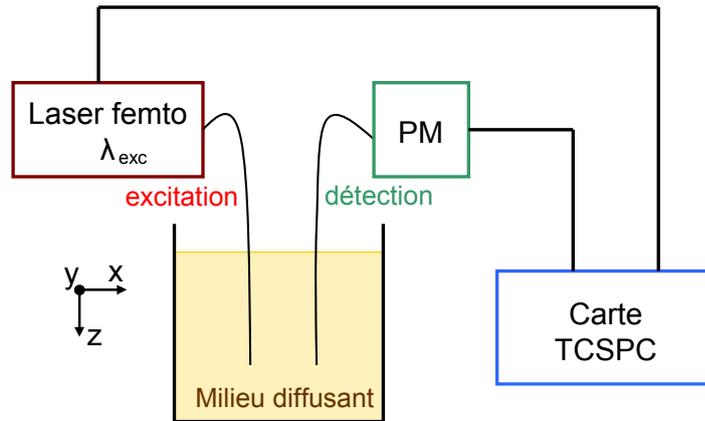


FIGURE D.1: Schéma de la chaîne d'acquisition TCSPC (d'après [Laidevant 06]).

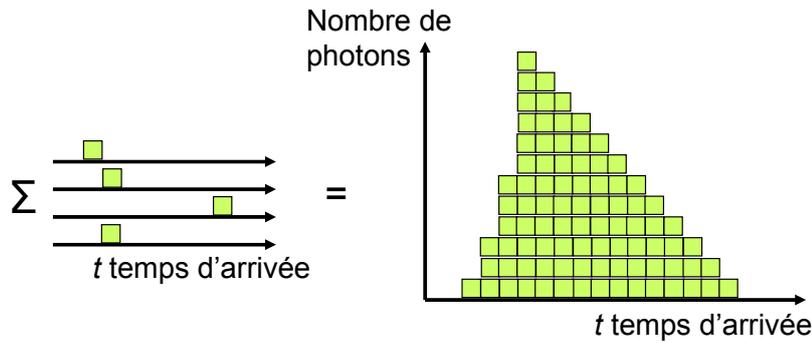


FIGURE D.2: Construction de l'histogramme des temps d'arrivée des photons par le TCSPC (d'après [Laidevant 06]).

D.0.4.2 Réponse de l'instrument

Sans plonger les fibres dans le milieu diffusant (voir figure D.3), nous mesurons la réponse de l'instrument (IRF) (pour le terme anglais *Instrument Response Function*), soit la répartition temporelle de l'impulsion laser détectée par la chaîne de mesure. Le protocole et les conditions expérimentales devront rester scrupuleusement les mêmes pour les mesures en milieu diffusant qui suivront.

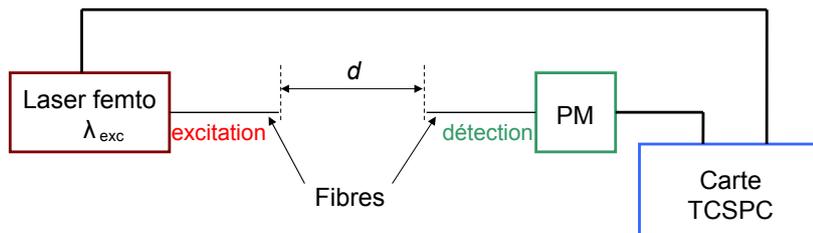


FIGURE D.3: Mesure de l'IRF

L'IRF s'interprète comme la convolution de la réponse impulsionnelle de l'instrument, obtenue si l'excitation laser était un Dirac parfait, et de la forme temporelle de la source laser (Dirac « élargi »). La réponse impulsionnelle n'est autre que la combinaison des réponses de l'ensemble des autres éléments du système, tels les densités optiques, les fibres, le PM et toute l'électronique, qui contribuent au retard ou à l'élargissement temporel du signal. Tout signal mesuré par le système est convolué à l'IRF. Ainsi la TPSF **mesurée** est la convolution de ce que nous nommerons la TPSF **vraie** et de l'IRF, à laquelle s'ajoute un terme de bruit (bruit de lecture, courant d'obscurité, et bruit photonique) (voir schéma D.4). Le bruit de photons doit quant à lui être considéré dans le problème. Plus de détails sont donnés dans les travaux de Laidevant [Laidevant 06], où un chapitre entier est consacré à la mise en place du système d'acquisition TCSPC.

Nous avons ici utilisé le savoir-faire directement présent dans notre laboratoire sur le sujet.

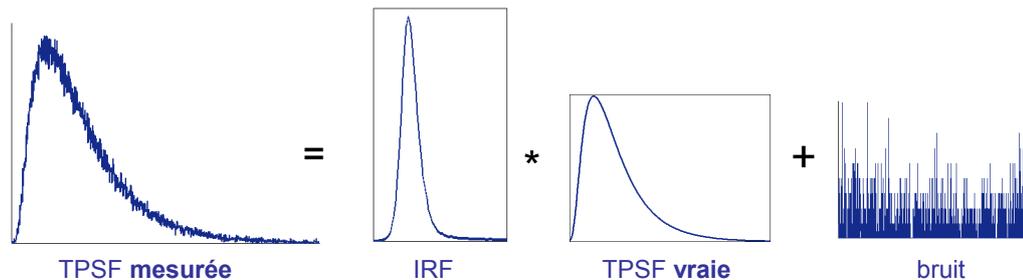


FIGURE D.4: La TPSF mesurée est égale à la convolution de la TPSF vraie par l'IRF, plus un terme de bruit (inspiré de [Laidevant 06])

La mesure au préalable de l'IRF est donc indispensable, et une attention particulière doit être portée sur le respect des conditions de mesure entre l'IRF et la mesure en milieu diffusant correspondante. La mesure de l'IRF est précédée d'une étape de filtrage à l'aide de densités optiques qui permettent d'atténuer le faisceau laser avant qu'il n'atteigne le PM. Les fibres d'excitation et de détection sont positionnées face à face (voir figure D.3), et écartés d'une distance mesurée d . Pour une distance $d = 20$ cm par exemple (nécessaire pour obtenir un signal assez puissant, et suffisant pour ne pas éblouir le détecteur), un retard de $t = d/c = 0,2/(30.10^7) = 0.66$ ns sera à corriger sur l'IRF afin de le caler aux mesures.

La chaîne d'acquisition TCSPC nécessite de nombreux réglages, un chapitre entier pourrait y être consacré. Aurélie Laidevant a fait ce travail dans sa thèse, et les chapitres sur ce sujet peuvent être considérés comme des références claires et complètes à consulter pour plus de détails ([Laidevant 06], chapitre 2).

D.0.5 Interprétation des TPSF

Les courbes temporelles obtenues par le système décrit précédemment permettent de remonter aux paramètres optiques du milieu. Nous faisons ici le lien entre la quantité

que nous mesurons – la TPSF – et la solution de l'équation de diffusion en milieu infini. Le but est de déterminer un modèle qui dépende des paramètres optiques qui nous intéressent, le plus proche possible de la TPSF.

D.0.5.1 Solution de l'équation de diffusion en milieu infini

Nous utilisons l'approximation de l'équation de diffusion qui décrit la densité de photons $\Phi(\mathbf{r}, t)$ ($W.m^{-2}$) dans un milieu homogène infini. Rappelons l'expression de l'approximation de diffusion (AD), déjà présentée dans le chapitre 1 :

$$\frac{1}{c} \frac{\delta \Phi(\mathbf{r}, t)}{\delta t} - \nabla(D(\mathbf{r})\nabla\Phi(\mathbf{r}, t)) + \mu_a\Phi(\mathbf{r}, t) = S(\mathbf{r}, t) \quad (D.1)$$

La solution de cette équation approchée s'exprime facilement dans le cadre d'un milieu homogène, et en faisant l'hypothèse que le terme de source $S(\mathbf{r}, t)$ est une impulsion modélisée par une fonction de Dirac. Nous obtenons alors la solution suivante :

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

où r est la distance à la source. Si nous nous rapportons au montage utilisé, schématisé figure D.1, r représente alors l'écartement entre notre fibre source et notre fibre de détection. Restons sur notre montage, et intéressons nous au signal mesuré.

D.0.5.2 Lien entre la quantité mesurée sur la fibre de détection et le flux de photons

L'analyse qui suit est tirée des travaux de [Haskell 94] et de [Laidevant 06]. Le signal mesuré sur la fibre de détection s_{fibre} , placée à un écartement r de la fibre de source, est la luminance (définition dans le chapitre 1) à la position r , dans la direction $\hat{\mathbf{s}}$, intégrée sur toute la surface notée A , et sur l'ouverture numérique notée Ω de la fibre. Nous notons θ l'angle d'incidence. (voir figure D.5.

D'où le signal détecté :

$$s_{\text{fibre}}(\mathbf{r}, t) = \int_A dx dy \int_{\Omega} L(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t) \hat{\mathbf{s}} \cdot \hat{\mathbf{n}} d^2\hat{\mathbf{s}} \quad (D.3)$$

En considérant que la luminance L peut être exprimée comme la somme d'un terme isotrope du flux de photons et d'un terme directionnel associé au flux [Laidevant 06], nous obtenons :

$$L(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t) = \frac{1}{4\pi} \underbrace{\phi(\mathbf{r}, t)}_{\text{densité de photons}} + \frac{3}{4\pi} \underbrace{j(\mathbf{r}, t)}_{\text{flux}} \cdot \hat{\mathbf{s}} \quad (D.4)$$

En reprenant les approximations de la diffusion utilisées pour obtenir notre formule d'approximation de diffusion (AD) (soit en considérant que le flux varie lentement, et que la source est supposée isotrope), nous pouvons écrire le flux \mathbf{j} sous la forme d'une loi de Fick [Laidevant 06] :

$$\mathbf{j}(\mathbf{r}, t) = -D\nabla\phi(\mathbf{r}, t) \quad (D.5)$$

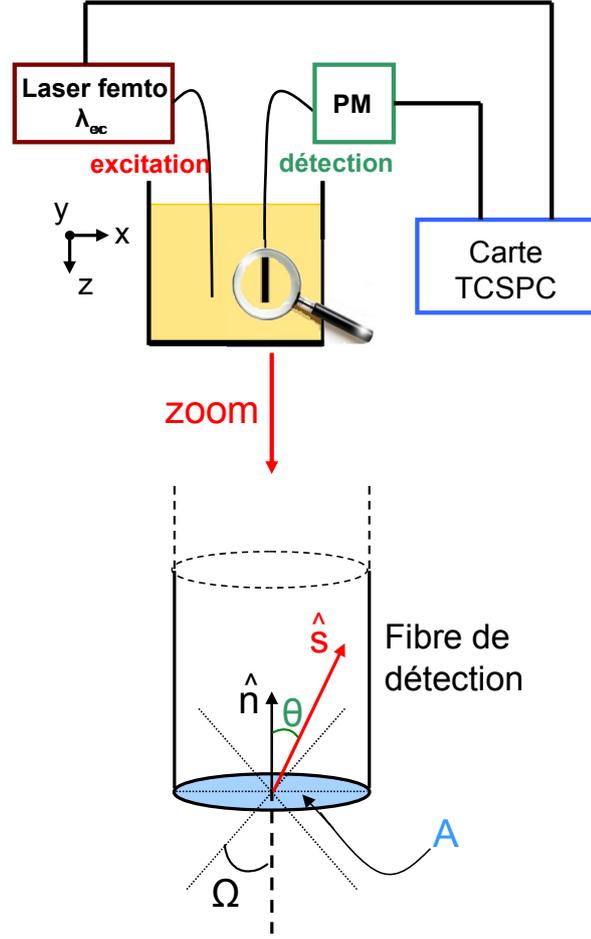


FIGURE D.5: Notations choisies pour la description du signal mesuré sur la fibre de détection

Une fois de plus dans les travaux d'Aurélien Laidevant, il est montré que puisque seule la composante du gradient de ϕ selon z doit être considérée (les composantes selon les autres directions sont nulles), nous avons :

$$\int_{\Omega} [\nabla\phi(\mathbf{r}, t) \cdot \hat{\mathbf{s}}] \hat{\mathbf{s}} \cdot \hat{\mathbf{n}} \, d^2\hat{\mathbf{s}} = \frac{\delta\phi}{\delta z} \int_{\Omega} \cos(\theta) \, d^2\hat{\mathbf{s}} \quad (\text{D.6})$$

D'où :

$$s_{\text{fibre}}(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t) = \int_A dx dy \int_{\Omega} \left[\frac{1}{4\pi} \phi(\mathbf{r}, t) + \frac{3D}{4\pi} \frac{\delta\phi}{\delta z} \cos(\theta) \right] \cos(\theta) \, d^2\hat{\mathbf{s}} \quad (\text{D.7})$$

Enfin, puisque l'ouverture numérique de nos fibres est environ égale à 0.2, nous pouvons considérer que $\cos(\theta)$ est égal à 1. Nous considérons également que la densité de photons est constante sur toute la surface de la fibre de détection, de façon à sortir les termes entre crochets de l'équation D.7 de l'intégrale. Ainsi :

$$s_{\text{fibre}} \propto \underbrace{\frac{1}{4\pi} \phi(\mathbf{r}, t)}_{\text{densité}} + \underbrace{\frac{3D}{4\pi} \frac{\delta\phi}{\delta z}(\mathbf{r}, t)}_{\text{flux}} \quad (\text{D.8})$$

Or, en milieu infini, le terme de flux peut être considéré comme négligeable [Laidevant 06].

Ainsi le signal mesuré sur la fibre de détection est **proportionnel au flux de photons** $\Phi(\mathbf{r}, t)$, qui par ailleurs vérifie l'équation de diffusion proposée précédemment. Nous obtenons donc finalement :

$$s_{\text{fibre}} \propto \frac{1}{(4\pi Dct)^{3/2}} \exp\left(-\frac{r^2}{4Dct} - \mu_a ct\right) \quad (\text{D.9})$$

D.0.6 Détermination des paramètres optiques à partir des TPSF

Bruit de photons Le bruit de photons est lié à la statistique des photons, et est indépendant du détecteur. Il suit une loi de Poisson et vérifie donc la propriété suivante : lorsque \bar{N} photons sont attendus par intervalle de temps t , l'écart-type sur le nombre moyen de photons est égal à $\sqrt{\bar{N}}$.

Définition de χ^2 Nous notons χ^2 la fonction d'erreur entre un signal et son modèle :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left(\frac{\text{signal}_i - \text{modèle}_i}{\sqrt{\text{signal}_i}} \right)^2 \quad (\text{D.10})$$

où $\sqrt{\text{signal}_i}$ est le bruit de photons (signal_i est le nombre de photons détectés par canal i).

D.0.6.1 Définition du problème

L'acquisition des courbes temporelles en milieu diffusant décrite précédemment D.1 nécessite de plonger les fibres d'excitation et de détection dans le milieu observé (à typiquement 2 cm de profondeur, et à environ 2 – 3 cm des bords). Nous supposons que les fibres sont suffisamment éloignées des bords des récipients et de la surface pour que les approximations en milieu infini puissent être adoptées.

Etant donné qu'en milieu infini le signal détecté sur notre fibre est proportionnel au flux de photons D.2, nous allons rechercher les paramètres optiques D et μ_a optimaux pour que la TPSF mesurée se rapproche de l'expression du flux. Sur la figure D.6, en haut, est rappelé schématiquement que le signal que nous mesurons – la TPSF mesurée – est la convolution de l'IRF avec la TPSF vraie, plus le terme de bruit.

La TPSF et l'IRF sont les deux quantités mesurables par notre système : la TPSF est mesurée suivant l'expérimentation décrite sur la figure D.1 et l'IRF est mesuré quant à lui hors du milieu, selon le principe décrit sur le schéma D.3. Il reste à chercher directement les paramètres D et μ_a optimaux, et donc un modèle $\text{modèle}(D, \mu_a)$ tel que sa convolution avec l'IRF soit le plus proche possible de la TPSF mesurée (cf. figure D.6).

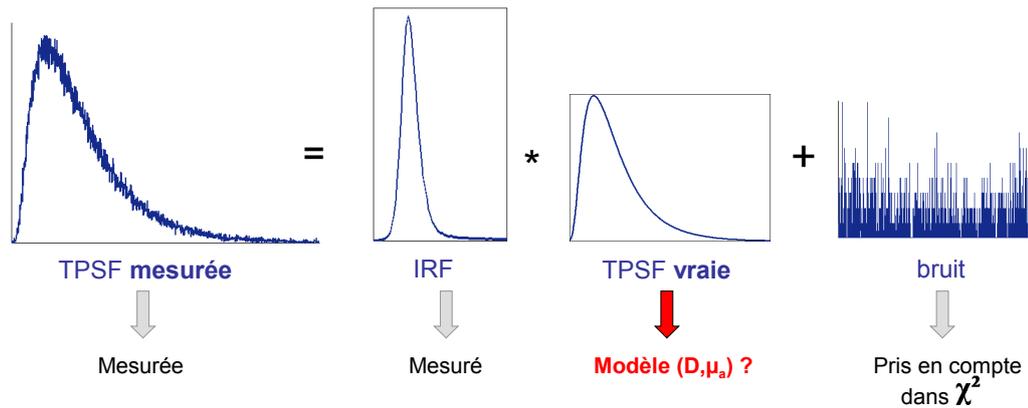


FIGURE D.6: La résolution du problème inverse est ici traitée en utilisant une fonction de Matlab : à partir des TPSF et IRF mesurés, nous recherchons la TPSF vraie.

D.0.6.2 Résolution du problème inverse

Nous utilisons pour la résolution du problème inverse une instruction existant sous le langage Matlab : `fminsearch` (cf. <http://www.mathworks.com/access/helpdesk/help/toolbox/optim/ug/fminsearch.html>). Cette instruction utilise différentes méthodes qui permettent au cours d'itérations de minimiser un critère défini par l'utilisateur. Le critère χ^2 que nous choisissons de minimiser est le suivant :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left(\frac{\text{TPSF}_i^{\text{mesurée}} - \text{modèle}_i}{\sqrt{\text{TPSF}_i^{\text{mesurée}}}} \right)^2 \quad (\text{D.11})$$

avec le *modèle* défini de la façon suivante (les inconnues du problème sont encadrées) :

$$\begin{aligned} \text{modèle} &= \text{TPSF}_i^{\text{vraie}} * \text{IRF} \\ &= \left(\frac{\boxed{A}}{(4\pi\boxed{D}ct)^{3/2}} \exp\left(-\frac{r^2}{4\boxed{D}ct} - \boxed{\mu_a}ct\right) \right) * \text{IRF} \end{aligned} \quad (\text{D.12})$$

Les paramètres encadrés sont les paramètres optimaux qui minimisent la fonction d'erreur χ^2 :

$$(A, \mu_a, D) = \text{argmin}(\chi^2) \quad (\text{D.13})$$

Nous appelons donc la fonction `fminsearch` de la façon suivante :

$$[A, \mu_a, D] = \text{fminsearch}(\chi^2, [A_0, \mu_{a0}, D_0])$$

La fonction `fminsearch` part des paramètres initiaux $A_0, \mu_{a0}, et D_0$ et détermine les paramètres $[A, \mu_a, D]$ qui minimisent χ^2 .

Nous obtenons ainsi les paramètres μ_a , et μ'_s (par l'obtention de $D = \frac{1}{3(\mu_a + \mu'_s)}$) qui caractérisent notre milieu.

Nous présentons un exemple d'acquisition temporelle obtenu pour une longueur d'onde d'excitation λ_0 et la TPSF déduite (figure D.7). Cet exemple nous a permis d'obtenir les paramètres μ_a , et μ'_s à λ_0 . Un ensemble d'acquisitions pour différentes longueurs d'onde d'excitation nous permet de remonter aux paramètres $\mu_a(\lambda)$ et $\mu'_s(\lambda)$ et donc de connaître les caractéristiques du milieu dans lequel la lumière se propage.

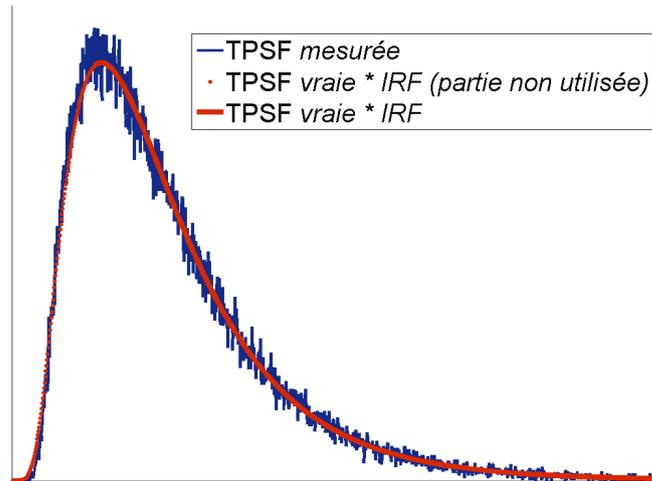


FIGURE D.7: La résolution du problème inverse est ici traitée en utilisant une fonction de Matlab : à partir des TPSF et IRF mesurés, nous recherchons la TPSF vraie.

ANNEXE E

Protocole d'expérimentation sur souris



Document de saisine
 Numéro d'enregistrement :

Animalerie où sera mis en oeuvre le protocole
 (coller son logo ou cocher la case)

UHTA ARCHAMPS
LER IAB CEA-IRTSV
LBFA LBFA-CUBE

Ce document et son analyse sont confidentiels.

Le document peut être transmis sous format électronique à l'adresse : UHTA@ujf-grenoble.fr
Toutefois, en cas de besoin de confidentialité absolue le document peut être transmis en version papier et en 15 exemplaires par courrier au président du comité.

Pour les protocoles soumis jusqu'au 20 du mois en cours, le comité rendra son avis dans le courant de la 1^{ère} semaine du mois suivant ; pour les autres protocoles, l'avis sera différé d'un mois. L'avis vous est rendu pour une période maximale de 3 ans.

Titre du protocole : Validation d'une méthode de séparation de sources fluorescentes dans le but d'éliminer le signal d'autofluorescence des tissus biologiques gênant la détection et localisation des tumeurs cancéreuses en imagerie optique de fluorescence.

LE RESPONSABLE DU PROTOCOLE

Nom et Prénom : Navarro Fabrice n° autorisation : 380816
 Laboratoire et équipe : CEA Léti Health SBSC/ LFCM
 spécialisation chirurgie : oui
 Coordonnées (téléphone & e-mail) : 17, rue de Martyrs F-38054 Grenoble Cedex 9
 Tél : +33 438780367
 e-mail : fabrice.navarro@cea.fr

LES EXPERIMENTATEURS

Lister les personnes impliquées en indiquant pour chacune d'entre elles, leur appartenance (laboratoire, équipe), leur niveau de formation à l'expérimentation animale (1, 2, étudiant ...), leur fonction (animalier, technicien, chercheur ...) et leur implication dans le protocole (soin aux animaux, injections, prélèvements, observations cliniques, euthanasie, chirurgie, soins opératoires)

Expérimentateur	Appartenance	Formation	Fonction	Implication
V. Jossierand	OPTIMAL IAB équipe 5	Niveau 1	Ingénieur Recherche	Implantation des tumeurs
M. Guidetti	OPTIMAL IAB équipe 5	Niveau 2	Technicienne	Surveillance des souris pendant la croissance tumorale
F. Navarro	CEA LETI HEALTH	Niveau 1	Chercheur	Imagerie de fluorescence

MOTIVATIONS DES EXPERIMENTATIONS

- ✓ **Domaines scientifiques** (cocher 2 items)

Physiologie	x Oncologie	x Pharmacologie
Toxicologie	Embryologie	Immunologie
Neurosciences	Bactériologie	x Autre imagerie

- ✓ **Objectif scientifique**

Résumer le projet scientifique en faisant apparaître l'(es) objectif(s), justifiant le recours à l'expérimentation animale

Dans le domaine de l'imagerie optique de fluorescence, nous cherchons à localiser précisément des tumeurs cancéreuses préalablement marquées par des fluorophores injectés au patient. Le patient est illuminé avec une source lumineuse, à une longueur d'onde optimale pour exciter les fluorophores qui alors émettent un signal de fluorescence permettant de les localiser. Il existe un signal de fluorescence constant quel que soit la profondeur des fluorophores, émis par les tissus biologiques qu'on appelle autofluorescence et auquel nous nous intéressons.

Pour de faibles profondeurs de tissus explorées, les fluorophores offrent des ratios tumeur/tissu sain suffisants, et permettent de détecter les tumeurs cancéreuses. Dans ces configurations, l'autofluorescence est négligeable. Dans le but de transférer ce mode d'imagerie vers le clinique, où les tissus biologiques explorés sont beaucoup plus épais (plusieurs centimètres, par exemple dans le sein ou la prostate), l'étude de la détection et de la localisation de fluorophores en profondeur est primordiale. Dans ce contexte, nous sommes confrontés à plusieurs difficultés : la décroissance exponentielle du signal de fluorescence avec la distance parcourue de la lumière dans les tissus diminue considérablement le ratio tumeur/tissu sain. Le signal d'autofluorescence jusque là négligeable devient alors gênant face à la baisse du signal d'intérêt, et doit être éliminé pour pouvoir obtenir une localisation précise des marqueurs.

Différentes simulations et études sur fantômes optiques ont permis la mise au point d'un algorithme de séparation de sources de fluorescence permettant d'éradiquer le signal d'autofluorescence gênant. Après quelques validations in vivo sur souris, avec capillaires, nous souhaitons lancer cette campagne de manip dans un premier temps pour confirmer la robustesse de notre méthode (avec des tumeurs sous-cutané uniques),.

Nous souhaitons également tester différents types de fluorophores sur ces tumeurs, dans une configuration déjà testée et validée, avec une seule tumeur sous-cutané.

Pour une détection plus complexe, un cas intermédiaire avec tumeur pulmonaire seulement est étudié. Enfin, nous voulons valider plusieurs nouveaux points sur notre méthode : notamment la séparation d'un même fluorophore à différentes profondeurs (pour s'approcher de cas de tumeurs en différents sites dans les cancers chez l'homme), d'où l'implantation de tumeurs pulmonaires et sous-cutanées simultanément sur plusieurs souris.

Le nombre de souris nécessaire a été calculé au plus juste en considérant les différents points que nous souhaitons mettre en avant, et qui ont été présentés précédemment.

- ✓ **Programmation des expérimentations**

Début : 22 septembre

Fin : 24 septembre

Durée d'une expérimentation :

Nombre de répétition du protocole : 1

- ✓ **Justification du choix du modèle animal** (vs. méthodes alternatives & autres espèces)
et du nombre d'animaux nécessaires (précisez les groupes dans la description du protocole)

Les modèles expérimentaux sont développés chez la souris nude qui est l'animal de laboratoire le plus adapté d'une part à l'imagerie optique (absence de poils) et d'autre part à la cancérologie du fait de sa capacité à tolérer les xénogreffes.

- espèce / souche ou lignée : souris NMRI nudes
- sexe : femelle - âge : 6-7 semaines - poids : 20-25 g
- nombre : 16
- origine (éleveur ou établissement d'expérimentation animale agréé) : JANVIER



LE PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Description CHRONOLOGIQUE du protocole incluant le lieu de stabulation, les procédures (invasives ou non) utilisées, et indiquant à chaque étape du protocole le niveau de **douleur** subi par l'animal (de 0 à 3 selon la classification jointe en annexe) et les **moyens** utilisés pour la combattre.

Joindre un **chronogramme** du niveau de contrainte (2 modèles en annexe)

Entretien des animaux

A leur arrivée, les souris sont hébergées par groupe de 4 dans l'animalerie nude de l'Institut Albert Bonniot.

Au moins 5 jours d'acclimatation sont laissés avant le début des expérimentations.

Implantation des tumeurs sous cutanées

Les souris sont placées sous anesthésie gazeuse (isoflurane 4% pour l'induction et 1.5% pour le maintien) sur un tapis chauffant à 37°C. 5 millions de cellules tumorales TS/Apc (carcinome mammaire murin) dans 200 µl de PBS sont injectées en sous-cutané sur le flanc. Les souris se réveillent spontanément quelques secondes après l'arrêt de l'anesthésie et sont maintenues dans l'animalerie le temps de la croissance tumorale (10 jours).

Implantation des tumeurs pulmonaires

Les souris vigiles sont placées dans un tube de contention sur un tapis chauffant à 38°C. 1 million de cellules tumorales TS/Apc (carcinome mammaire murin) dans 100 µl de PBS sont injectées par voie intraveineuse (veine caudale). Après l'injection les souris sont libérées du tube de contention et sont conservées sous surveillance 10 à 15 minutes sur le tapis chauffant avant d'être replacées dans leur cage. En effet la mortalité liée à l'injection de ces cellules tumorales par voie intraveineuse est de l'ordre de 25% et intervient dans les 10 minutes qui suivent l'injection.

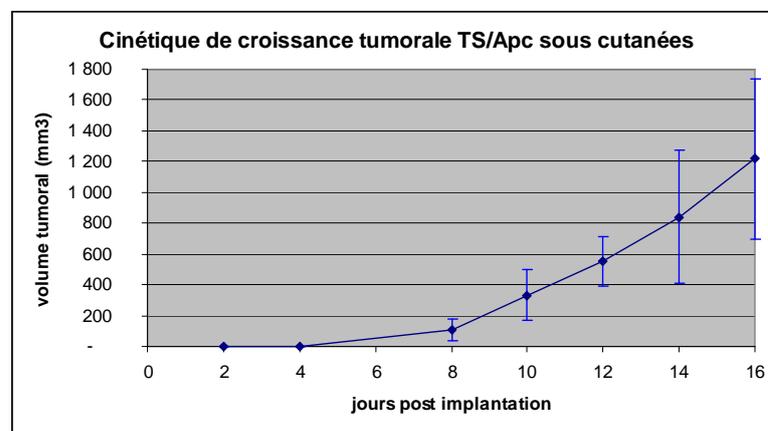
Les souris sont conservées dans l'animalerie le temps de la croissance tumorale (10 jours).

Suivi des animaux

Toutes les souris sont observées 2 fois par semaine par Mélanie Guidetti (technicienne niv 2) pendant toute la durée de la croissance tumorale.

Souris porteuses de tumeurs sous cutanées

La croissance tumorale du modèle TS/Apc sous cutané a été préalablement calibré par la plateforme OPTIMAL.



Les animaux sont utilisés pour l'imagerie à J10 post-implantation à un stade du développement tumoral où les tumeurs ont un volume de l'ordre de 300 mm³. Les souris sont donc faiblement incommodées par la présence des tumeurs.

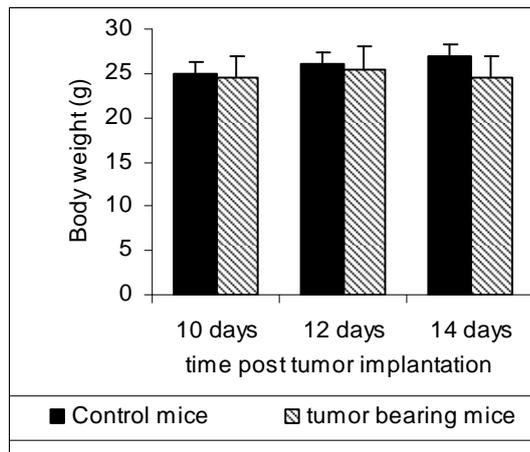
Toutefois si un animal montrait des signes de souffrance (isolement, manque d'appétit, prostration), l'euthanasie de l'animal serait réalisée par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse.

Souris porteuses de tumeurs pulmonaires

Il n'est pas possible de suivre l'augmentation de la taille des tumeurs pulmonaires c'est donc le poids des souris qui est choisi comme indicateur principal de l'état des souris.

L'évolution du poids corporel du modèle TS/Apc pulmonaire a été préalablement calibrée par la plateforme OPTIMAL.

Les souris sont pesées à J0, J5, J10, J12 et J14 post-implantation des tumeurs.



Le poids des souris porteuses de tumeurs pulmonaires augmentent de 4% entre J10 et J12 puis diminue de 6% entre J12 et J14. Les animaux sont utilisés pour l'imagerie entre J10 et J14 post implantation.

En aucun cas les souris ne dépasseront le stade J14, elles seront euthanasiées par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse. Toutefois si un animal montrait des signes de souffrance (isolement, manque d'appétit, prostration), l'euthanasie de l'animal serait réalisée par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse.

Imagerie *in vivo* de fluorescence

L'imagerie a lieu au CEA LETI.

Les séances d'imagerie optique de fluorescence débutent et se déroulent comme décrit ci-dessous :

1) Pesée de l'animal. **Niveau de douleur associé 0.**

2) Induction de l'anesthésie par voie gazeuse (isoflurane 4%) dans une cage d'induction, **niveau de douleur associé 0**

3) Détermination de l'auto-fluorescence de la souris sous le dispositif optique (voir **figure 1**), l'anesthésie (isoflurane 1.5%) est maintenue pour immobiliser la souris et la souris est placée sur une plaque chauffante (~37°C). A cette étape, il est possible qu'un cathéter renfermant le traceur à concentration connue soit provisoirement inséré par voie rectale pour calibrer la sensibilité du système optique, **niveau de douleur associé 0**

Figure 1 : Positionnement de la souris sous le dispositif optique

5) Injection dans la veine caudale latérale d'un volume de 200 µL de la solution isotonique de traceur fluorescent le plus dilué possible pour l'imagerie (typiquement 40 pmol de nanoparticules fluorescentes) sous maintien d'anesthésie gazeuse (isoflurane 1,5 %). La souris est toujours placée sur la plaque chauffante (~37°C), **niveau de douleur associé 0**

6) Imagerie (acquisition d'images) à différents temps après injection (15', 1h, 2h, 3h, 5h, 24h par exemple) dans le dispositif d'imagerie non invasif sous maintien d'anesthésie gazeuse. Entre chaque temps les souris sont réveillées et replacées dans leur cage dans une armoire ventilée chauffée (25°C) à 30-50% d'hygrométrie et possédant un éclairage à cycles jour/nuit automatisé, où elles bénéficient d'une surveillance accrue par les expérimentateurs..

Niveau de douleur associé 0.

7) Euthanasie par injection i.v. létale de doléthol 1µL/g ou de T61 0,6 mL/kg puis prélèvements de différents organes et collecte de sang par ponction cardiaque pour imagerie. La durée maximale d'un suivi par imagerie est généralement 4 jours post-injection du traceur.

Devenir des animaux :

Si les animaux sont euthanasiés, précisez la **méthode** (cf.[http:// www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf](http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf))

DOULEUR :

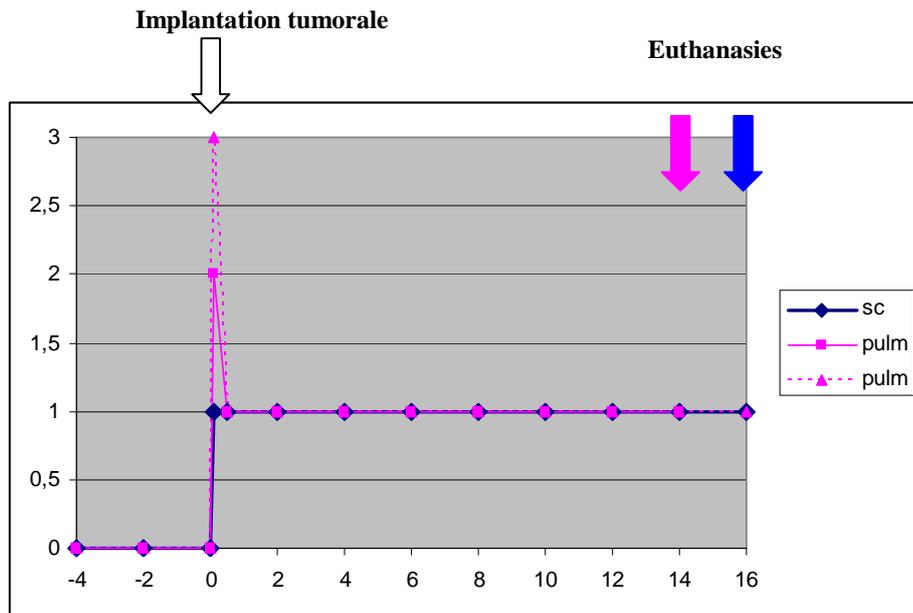
. Ce protocole occasionne-t-il une douleur ? OUI NON

- Si oui quel est le plus haut niveau anticipé (cf. **annexe douleur**)

- 0
- 1
- 2
- 3

POINT LIMITE : définition PRECISE des critères qui conduiront à interrompre précocement l'expérience et des procédures qui seront alors mises en œuvre

Pour les souris porteuses de tumeurs sous cutanées en aucun cas la taille de la tumeur ne dépassera 1500 mm³.
 Pour les souris porteuses de tumeurs pulmonaires en aucun cas la perte de poids corporelle ne dépassera 10%.



Date : 03/09/2010

Signature du responsable :



A N N E X E DOULEUR ET CONTRAINTES

(<http://ethique.ipbs.fr/sdv/SUISSE%20116104.pdf>)

Extrait :

a - niveau de contrainte ou de douleur anticipé

0- Nulle à minime :

(ex : prélèvement de sang, injection de substances par voie intraveineuse, intramusculaire, intrapéritonéale ou orale)

1- Minime à modéré : (ex : Cannulation, biopsie, contention prolongée)

2- Modéré à important :

(ex : Acte chirurgical nécessitant une anesthésie générale, (implantation...) induction de modification du comportement)

3- Important à intense :

(ex : Exposition à des agents nocifs, chirurgie invasive importante)

b - Signes indicatifs de gêne ou de douleur :

Activité/comportement :

- . Réduction des activités alimentaires et de toilettage
- . Anomalie du cycle veille/sommeil
- . Immobilité, prostration, apathie, agitation, agressivité
- . Léchage/auto-mutilation de la région douloureuse
- . Vocalisations inhabituelles

Modifications motrices ou de posture :

- . Boitement, retrait d'un membre

Modifications physiques :

- . Perte de poids, chute du pelage, température

Modifications végétatives :

- . Tachycardie ; halètement, dyspnée ;
- . jetage, salivation ; dilatation de la pupille



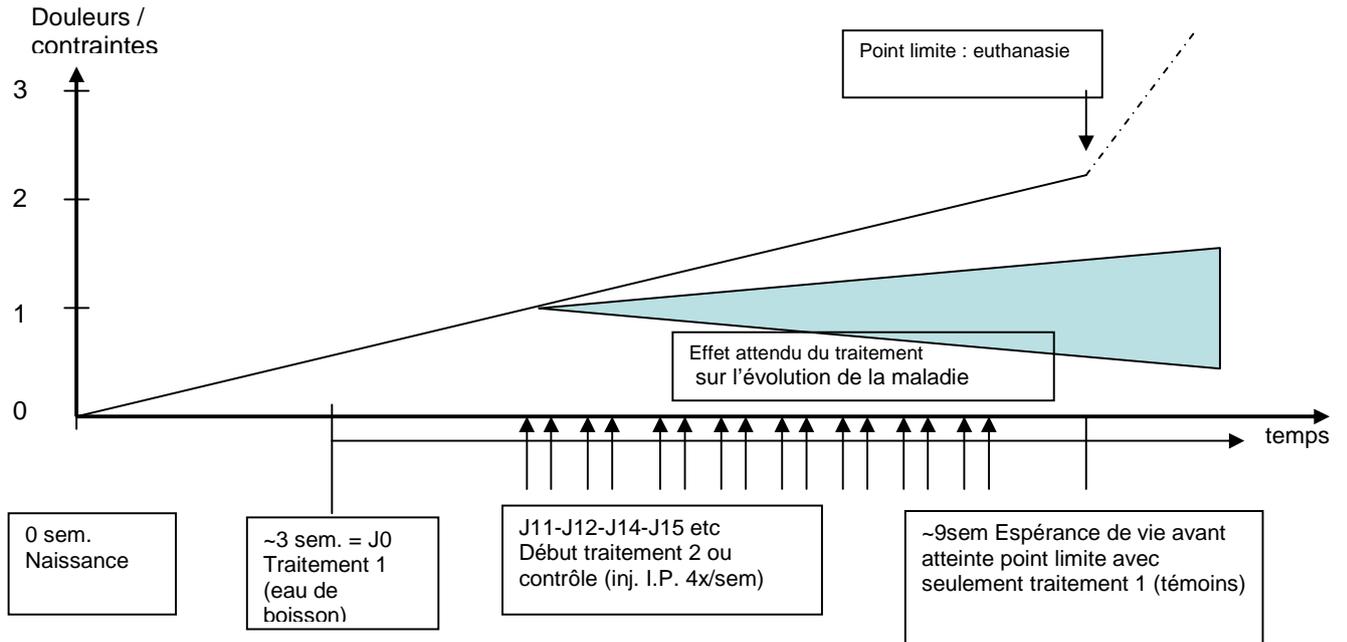
ANNEXE Chronogramme

Le schéma doit décrire chronologiquement les contraintes et interventions subies par les animaux, et situer le niveau de douleurs et de contraintes anticipées

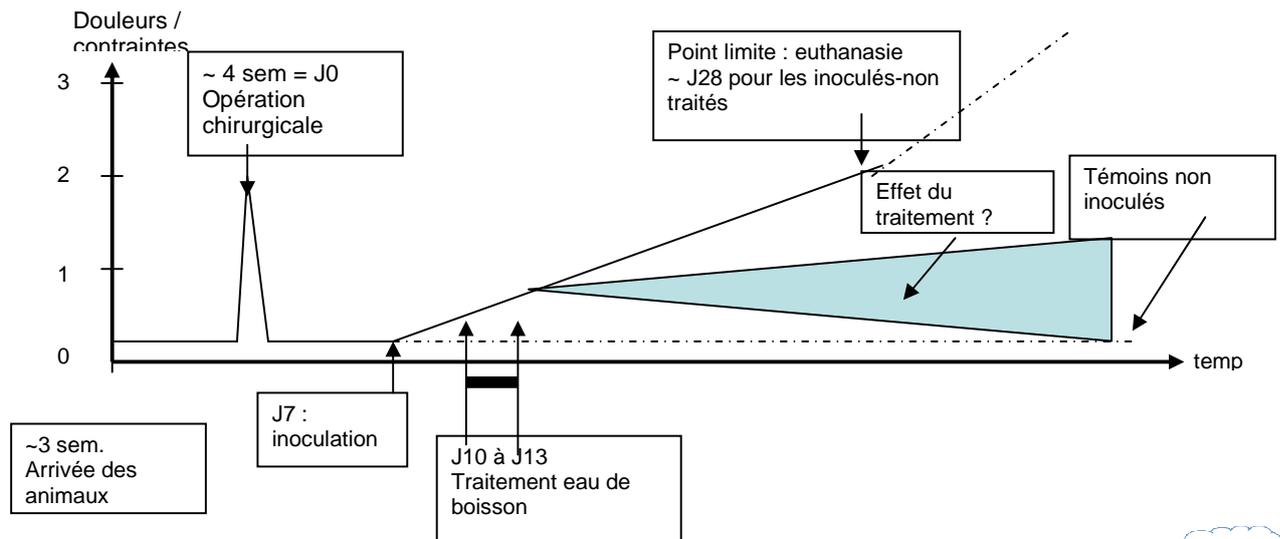
Les deux exemples ci-dessous sont fictifs, mais inspirés de protocoles réels. Le demandeur est libre de faire figurer sur son chronogramme tout élément qu'il juge significatif. La légende peut en particulier être plus élaborée, l'échelle des temps rigoureuse, le quadrillage apparent etc...

Exemple 1 : essai de traitement d'une maladie métabolique sur un modèle transgénique

Les animaux transgéniques meurent de la maladie vers l'âge de 9 semaines, donc il faut faire apparaître que la simple naissance de ces animaux n'est pas anodine et entraînera une mort non naturelle



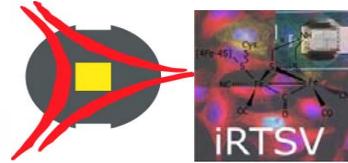
Exemple 2 : Traitement après castration d'une maladie infectieuse





Enregistré auprès du Comité National de Réflexion
Éthique sur l'Expérimentation Animale
Sous le numéro 12

Avis
Numéro d'enregistrement :
51_iRTSV-Leti-FNG-03



Titre du protocole

Validation d'une méthode de séparation de sources fluorescentes dans le but d'éliminer le signal d'autofluorescence des tissus biologiques gênant la détection et localisation des tumeurs cancéreuses en imagerie optique de fluorescence.

LE RESPONSABLE DU PROTOCOLE

Nom et Prénom : Navarro Fabrice n° autorisation : 380816 spécialisation chirurgie : oui
Laboratoire et équipe : CEA Léti Health SBSC/ LFCM
Coordonnées (téléphone & e-mail) : 17, rue de Martyrs F-38054 Grenoble Cedex 9
Tél : +33 438780367 **e-mail** : fabrice.navarro@cea.fr

Programmation des expérimentations

Début : 8 septembre 2010
Fin : 24 septembre 2010

Durée d'une expérimentation : 3 semaines
Nombre de répétition du protocole : 1

Choix du modèle animal et nombre d'animaux nécessaires

- espèce / souche ou lignée : souris NMRI nudes
- sexe : femelle - âge : 6-7 semaines - poids : 20-25 g
- nombre : 16
- origine (éleveur ou établissement d'expérimentation animale agréé) : JANVIER

DOULEUR :

plus haut niveau anticipé : 3

Avis motivé du comité :

Le protocole soumis est recevable. Le demandeur a répondu favorablement aux questions du comité, la programmation des expérimentations a été précisée et le protocole a été modifié concernant le niveau de douleur des animaux subissant l'implantation des tumeurs pulmonaires.

AVIS FAVORABLE

Date : 07/09/2010



ANNEXE F

Caractéristiques du Vert d'indocyanine

RESUME DES CARACTERISTIQUES DU PRODUIT

1. DENOMINATION

INFRACYANINE 25 mg/10 ml, poudre et solvant pour solution injectable

2. COMPOSITION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE

Vert d'Indocyanine monopic25,00 mg

Pour un flacon

1 ml de solution reconstituée contient 2,5 mg de vert d'indocyanine monopic.

Pour les excipients, voir rubrique 6.1.

3. FORME PHARMACEUTIQUE

Poudre et solvant pour solution injectable.

4. DONNEES CLINIQUES**4.1. Indications thérapeutiques**

Ce médicament est à usage diagnostique uniquement.

- étude des vaisseaux choroïdiens par angiographies oculaires en infra-rouge, en particulier pour la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA), la myopie dégénérative et les autres causes de néovascularisation choroïdiennes : chorioretinopathie idiopathique centrale, œdème maculaire, maladies inflammatoires de la choroïde, dégénération familiale et héréditaires et tumeurs choroïdiennes.
- détermination du débit sanguin hépatique et de la réserve fonctionnelle hépatique par des tests de clairance.
- mesure du volume sanguin circulant et du débit cardiaque ; la détermination non invasive est particulièrement recommandée chez le nouveau-né, le nourrisson et le patient en unité de soin intensif.

4.2. Posologie et mode d'administration

VOIE INTRAVEINEUSE DIRECTE.

Chez l'adulte, la dose totale injectée ne doit pas dépasser pas 0,5 mg/kg.

Lorsqu'il n'est pas à usage unique (verre), le matériel servant à l'injection doit être parfaitement stérile et rincé avec la solution servant à dissoudre le lyophilisat.

Etude des vaisseaux choroïdiens par angiographies oculaires en infra-rouge :

La dose administrée par patient dépend des caractéristiques du matériel utilisé : lumière d'excitation, filtres, système de détection. Cette dose est calculée à partir du poids du patient à raison de 0,25 à 0,5 mg/kg : en moyenne 0,35 mg/kg.

Les doses sont généralement les suivantes :

- angiographie numérisée avec détection par caméra infrarouge : 25 mg (10 ml) d'Infracyanine pour un patient de 70 kg.
- ophtalmoscope à balayage laser: 12,5 mg (5 ml) d'Infracyanine pour un patient de 70 kg.

Un volume de 4 ml de cette solution est injecté en bolus (en 5 secondes) pour réaliser le temps précoce de l'angiographie (0 - 6 minutes). A la 6ème minute injecter lentement le reste de la seringue. Un très faible volume de solution (0,1 ml ou moins) peut être injecté au temps tardif (20ème minute) pour le repérage des lésions relativement aux structures vasculaires.

Etude du débit sanguin hépatique :

- Perfusion continue de 0,25 mg/min/m² de surface corporelle.
- Détermination de la réserve fonctionnelle hépatique : 0,5 mg/kg du poids en injection unique.
- La concentration plasmatique du colorant est calculée à intervalles réguliers soit directement à l'aide d'un lecteur de densité optique, soit après prélèvements de sang répété dans 20 minutes après l'injection unique d'Infracyanine. Le pourcentage d'épuration ou de rétention du colorant est ensuite déterminé.

Mesure du volume sanguin circulant et du débit cardiaque :

La dose varie suivant l'âge :

- adulte : de 5 mg (soit 2 ml d'une solution à 2,5 mg/ml) jusqu'à 20 mg (soit 8 ml d'une solution à 2,5 mg/ml)
- enfant : 2,5 mg (soit 1 ml d'une solution à 2,5 mg/ml)
- nourrisson : 0,2 mg/kg de poids.

Deux méthodes sont:

- La méthode de référence implique 5 prélèvements artériels chez l'adulte et 3 prélèvements artériels chez l'enfant.
- La méthode non-invasive utilise un spectrophotomètre pulsé et des capteurs transcutanés.

4.3. Contre-indications

Sans objet

4.4. Mises en garde spéciales et précautions particulières d'emploi

Mises en garde

Des réactions graves de type allergique (œdème de Quincke ou choc de type anaphylactique) ont été exceptionnellement rapportées après administration de vert d'indocyanine seul ou après administration concomitante de vert d'indocyanine et de fluorescéine. Ce risque impose la surveillance du malade au cours et au décours immédiat de l'injection de ces produits et la disposition à proximité de moyens nécessaires à la réanimation d'urgence.

4.5. Interactions avec d'autres médicaments et autres formes d'interactions

Association contre-indiquée :

+ **solutés de chlorure de sodium** : floculation de la solution.

4.6. Grossesse et allaitement

Grossesse

Il n'y a pas de données fiables de tératogénèse chez l'animal. En clinique, il n'existe pas actuellement de données suffisamment pertinentes pour évaluer un éventuel effet malformatif ou foetotoxique de l'Infracyanine lorsqu'il est administré pendant la grossesse. En conséquence, l'utilisation d'Infracyanine est déconseillée pendant la grossesse.

Allaitement

En l'absence de données, l'utilisation est déconseillée pendant l'allaitement.

4.7. Effet sur l'aptitude à conduire des véhicules et à utiliser des machines

L'attention est attirée, notamment chez les conducteurs de véhicules et les utilisateurs de machines, sur les risques de trouble de la vision attachés à l'emploi de ce médicament.

4.8. Effets indésirables

La plupart des effets indésirables signalés sont transitoires:

- effets peu fréquents : nausées transitoires, voire vomissements
- effets rares : malaise, bouffées de chaleur, hypersudation, réactions cutanées (rash cutané, urticaire ou prurit isolé).
- effets très rares : œdème de Quincke, choc de type anaphylactique après administration de vert d'indocyanine seule ou après administration concomitante de vert d'indocyanine et de fluorescéine.

Une coloration passagère des téguments est observée en cas d'injection para-veineuse accidentelle.

4.9. Surdosage

Sans objet

5. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES

5.1. Propriétés pharmacodynamiques

PRODUIT de CONTRASTE INTRA-VASCULAIRE (V : DIVERS)

Le vert d'Indocyanine est un colorant dont le spectre d'absorption présente un maximum aux alentours de 805nm avec réémission à 835 nm.

5.2. Propriétés pharmacocinétiques

Après injection intraveineuse, l'Infracyanine se fixe totalement aux protéines plasmatiques. Il demeure dans le compartiment intra-vasculaire, ce qui permet la détermination du débit sanguin cardiaque ou hépatique. Par ailleurs, l'absence de fuite du colorant à partir des vaisseaux choroïdiens permet leur visualisation par angiographie oculaire dans l'infrarouge.

Ce chromogène est alors capté par les hépatocytes et son élimination se fait totalement par voie biliaire sous forme inchangée sans cycle entéro-hépatique.

La demi-vie de l'Infracyanine chez le sujet sain est de $3,4 \pm 0,7$ minutes.

L'élimination est ralentie en cas de diminution de la masse hépatocytaire.

Par ailleurs, en cas d'obstruction des voies biliaires, le colorant apparaît dans la circulation lymphatique du foie.

Des études comparées de la concentration du pigment dans la circulation afférente et efférente de divers organes ont montré que la captation était négligeable au niveau des reins, des poumons et du liquide céphalo-rachidien.

Aucun passage de la barrière placentaire, par Infracyanine, n'a été mis en évidence lors des prélèvements de sang fœtal.

5.3. Données de sécurité précliniques

La DL50 de l'Infracyanine, par voie intraveineuse chez le rat et le lapin est de 50 mg/kg.

Les études de mutagenèse et de génotoxicité réalisées n'ont révélé aucune activité mutagène ou génotoxique.

Infracyanine est hémocompatible, n'a pas de pouvoir sensibilisant et a une bonne tolérance locale chez le lapin.

6. DONNEES PHARMACEUTIQUES

6.1. Liste des excipients

Solvant : glucose, eau pour préparations injectables.

6.2. Incompatibilités

En l'absence d'étude de compatibilité, ce médicament ne doit pas être mélangé avec d'autres médicaments. Infracyanine est incompatible avec les solutés de chlorure de sodium (floculation de la solution).

6.3. Durée de conservation

3 ans

La stabilité physicochimique du produit reconstitué a été démontrée pendant 6 heures à 25°C. Toutefois, du point de vue microbiologique, le produit doit être utilisé immédiatement. En cas d'utilisation non immédiate, les durées et conditions de conservation après reconstitution et avant utilisation relèvent de la seule responsabilité de l'utilisateur

6.4. Précautions particulières de conservation

A conserver à une température ne dépassant pas +25°C.

Conserver le flacon et l'ampoule dans l'emballage extérieur, à l'abri de la lumière et de l'humidité.

6.5. Nature et contenu de l'emballage extérieur

25 mg de poudre en flacon (verre type II) de 30 ml avec bouchon (bromobutyle) et 10ml de solvant en ampoule (verre type I).

6.6. Instructions pour l'utilisation, la manipulation et l'élimination

Infracyanine nécessite impérativement avant toute utilisation d'être dilué dans les 10 ml de solvant (solution glucosée à 5 %) afin d'obtenir une concentration de 2,5 mg/ml.

7. TITULAIRE DE L'AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHE

Laboratoires SERB

53, rue Villiers de l'Isle-Adam
75020 PARIS

8. PRESENTATION ET NUMERO D'IDENTIFICATION ADMINISTRATIVE

360 841-7 : 25 mg de poudre en flacon (verre) + 10 ml de solvant en ampoule (verre) : boîte de 1.

9. DATE DE PREMIERE AUTORISATION/DE RENOUVELLEMENT DE L'AUTORISATION

16 avril 2003

10. DATE DE MISE A JOUR DU TEXTE

14 novembre 2005

CONDITIONS DE PRESCRIPTION ET DE DELIVRANCE

Liste I.

Médicament soumis à prescription médicale.

Comparaison des méthodes d'élimination de l'autofluorescence sur un exemple particulier

Nous rappelons sur la figure G.1 les données V de fluorescence acquises par notre système sur souris *in vivo* sur laquelle un capillaire rempli de fluorophore a été placé en sous-cutané.

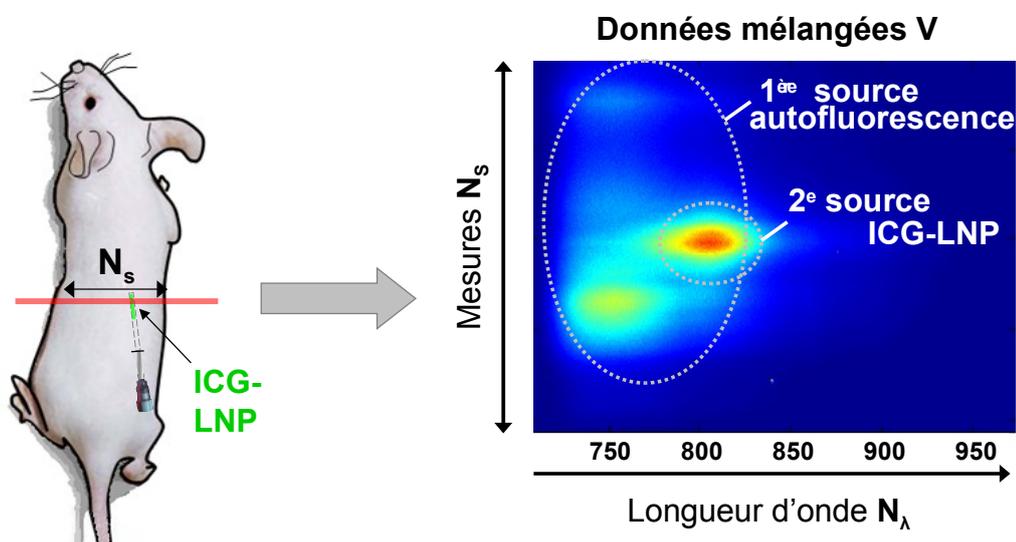


FIGURE G.1: *Un exemple simple d'acquisition sur souris avec capillaire fluorescent (ICG-LNP) est proposé pour tester différentes méthodes : nous utilisons ici les spectres de fluorescence acquis pour une position de la ligne d'excitation et de la ligne de détecteurs (gauche). Les N_s points de la ligne sont décomposés selon leur spectre en longueur d'onde (N_λ longueurs d'onde) (droite).*

Nous proposons ici des résultats plus détaillés des méthodes de séparation SVD, BPSS et FMN sur ces données.

G.0.7 La SVD

L'algorithme de SVD utilisé sur nos données est simplement l'algorithme existant sous le logiciel Matlab.

Nous avons tracé les valeurs singulières, organisées naturellement dans Σ par ordre décroissant (cf. figure G.2) : les trois premières valeurs singulières sont remarquables, nous pouvons ainsi nous intéresser aux trois premières sources orthogonales détectées. Les valeurs singulières suivantes sont à associer à l'espace bruit. (Si nous considérons que les 10 premières valeurs singulières obtenues nous permettent de remonter au signal total, en exprimant celles-ci en pourcentage, nous aurons : $\lambda_1 \simeq 75\%$, $\lambda_2 \simeq 19,4\%$, $\lambda_3 \simeq 1,7\%$, $\lambda_4 \simeq 1\%$ etc...) Seulement nous recherchons a priori uniquement de l'autofluorescence, et la fluorescence spécifique (qui devrait être la seconde source prépondérante). S'il n'y a que deux sources orthogonales et du bruit, nous devrions obtenir des valeurs remarquables pour les deux premières valeurs singulières, puis des valeurs négligeables pour les suivantes. Le signal associé à la troisième valeur singulière est dû à la compensation des parties de spectres négatives obtenues pour l'autofluorescence et la fluorescence spécifique des ICG-LNP.

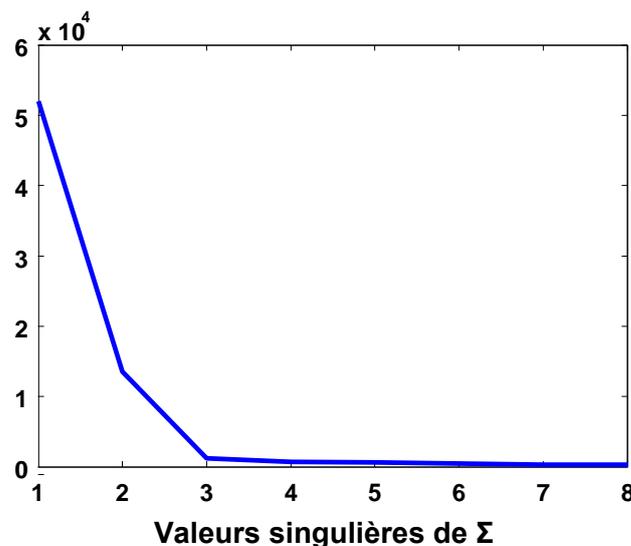


FIGURE G.2: Valeurs singulières de la matrice Σ après SVD sur l'image de départ

Le résultat obtenu pour les deux premières sources détectées est présenté sur la figure G.3 : nous obtenons d'une part l'image ne comprenant que l'autofluorescence, et l'image comprenant la fluorescence spécifique. L'algorithme fonctionne, mais l'image de fluorescence spécifique obtenue présente tout de même des artefacts : nous détectons un signal de fluorescence spécifique vrai, ainsi que quatre autres signaux de fluorescence aux quatre coins de l'image.

Nous pouvons tout de même nous intéresser aux résultats des 3^e et 4^e sources, bien que les valeurs singulières associées soient négligeables. Le résultat est décrit par la figure G.4 : les contributions des 3^e et 4^e sources sont de l'ordre du bruit.

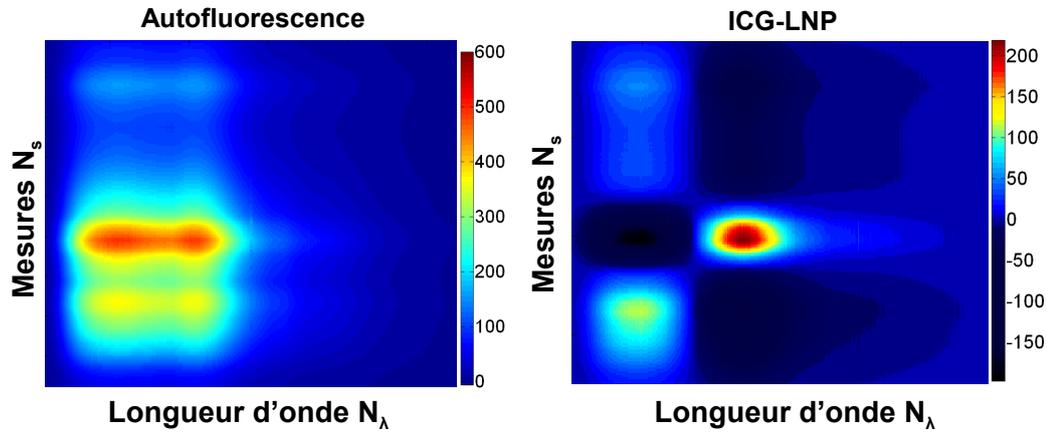


FIGURE G.3: Résultat après SVD sur l'image de départ : à gauche : autofluorescence détectée ($\lambda_1 \simeq 76\%$), à droite : fluorescence spécifique (ICG) détectée ($\lambda_2 \simeq 11\%$).

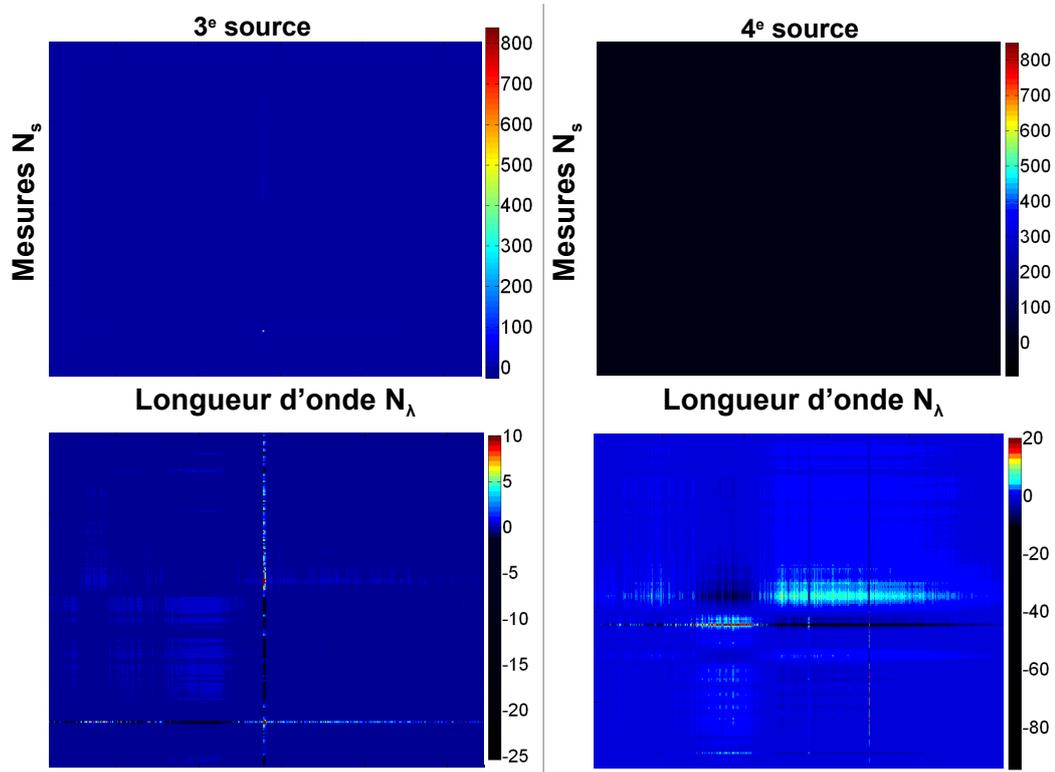


FIGURE G.4: Résultat après SVD sur l'image de départ : troisième et quatrième sources détectées. En haut, le contraste est choisi de telle sorte que les résultats des 3^e et 4^e sources soient comparables à ceux des deux premières sources. En bas, le contraste correspond simplement aux valeurs maximales des 3^e et 4^e sources.

Enfin nous présentons les deux sous-espaces signal et bruit obtenus : le sous-espace bruit prend en compte les deux premières valeurs singulières non-négligeables comme le suggèrent les résultats de la matrice Σ obtenue après SVD, le reste du signal étant

attribué au bruit (voir figure G.5).

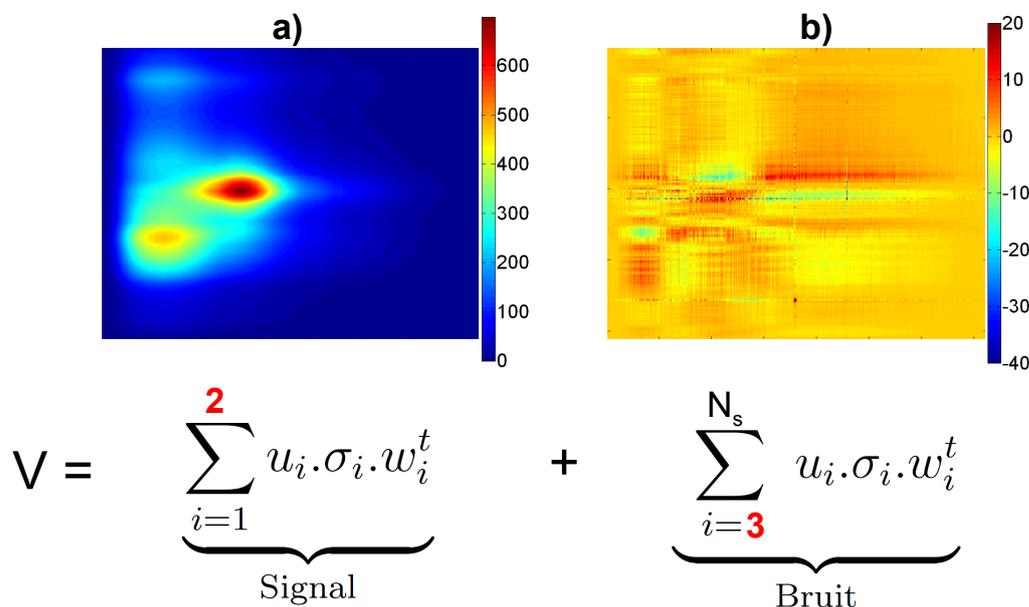


FIGURE G.5: Sous-espaces signal et bruit obtenus après SVD sur les données V .

G.0.8 Méthode séparation bayésienne de sources positives (BPSS)

L'algorithme proposé par Moussaoui *et al.* met à jour alternativement à chaque itération r l'estimation de la source \hat{s}^{r+1} en utilisant la dernière estimation de A , puis l'estimation \hat{A}^{r+1} en se basant sur la dernière estimation de s , etc... L'algorithme est détaillé dans le papier sur ce sujet [Moussaoui 04]. Aucune initialisation des matrices A et S n'est requise au départ.

Nous avons pu tester l'algorithme de BPSS mis au point par Moussaoui sur l'exemple présenté précédemment.

Les matrices A et S , obtenues après convergence, sont présentées figure G.6, tandis que les représentations des contributions séparées sont présentées sur la figure G.7.

Comme nous l'avons déjà présenté dans la partie sur cette méthode, la convergence est très longue (ici environ une heure), mais le résultat est satisfaisant sur cet exemple : Les spectres sont proches des spectres attendus, la contrainte de positivité permet d'obtenir des spectres et leurs pondérations dans le milieu cohérents. Les résultats seront comparés plus en détail après l'essai de l'algorithme de FMN sur ces mêmes données.

G.0.9 La FMN

L'algorithme de FMN est un algorithme itératif, dont les étapes sont les suivantes : dans un premier temps, les deux matrices A et S doivent être définies. Comme Gobinet [Gobinet 06, Gobinet 04], nous utilisons ici des matrices aléatoires non-négatives.

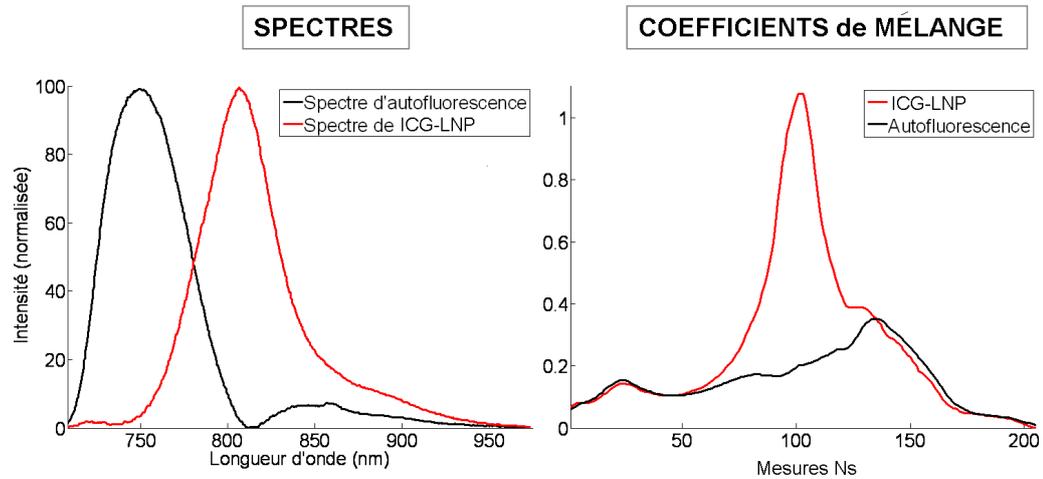


FIGURE G.6: Résultat après BPSS sur l'acquisition test : spectres de fluorescence (à gauche) et coefficients de mélange (à droite) obtenus

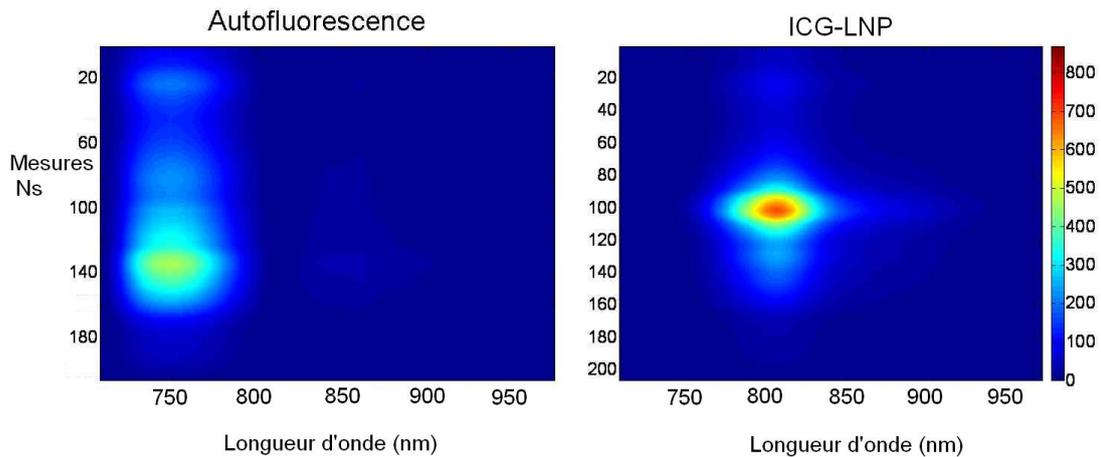


FIGURE G.7: Résultat après BPSS sur l'acquisition test : les sources de fluorescence ont été séparées. À gauche : l'autofluorescence, à droite : la fluorescence spécifique (nanoparticules lipidiques chargées en ICG (ICG-LNP))

Dans un second temps, la fonction de coût est minimisée en appliquant les lois de mise à jour multiplicatives de Lee et Seung [Lee 01] (cf. 4.15 et 4.16) décrites précédemment, qui permettent de mettre à jour à tour de rôle les matrices A et S .

Après convergence, la matrice S est composée de deux spectres, présentés figure G.8 à gauche ; les coefficients de mélange (matrice A) sont présentés figure G.8 à droite. Enfin nous représentons les contributions des deux sources de fluorescence séparément : la première représentant la contribution d'ICG-LNP (Figure G.9, à gauche) et la seconde la contribution d'autofluorescence résultante (Figure G.9, à droite).

Après FMN, la contribution des ICG-LNP est correctement isolée de l'autofluores-

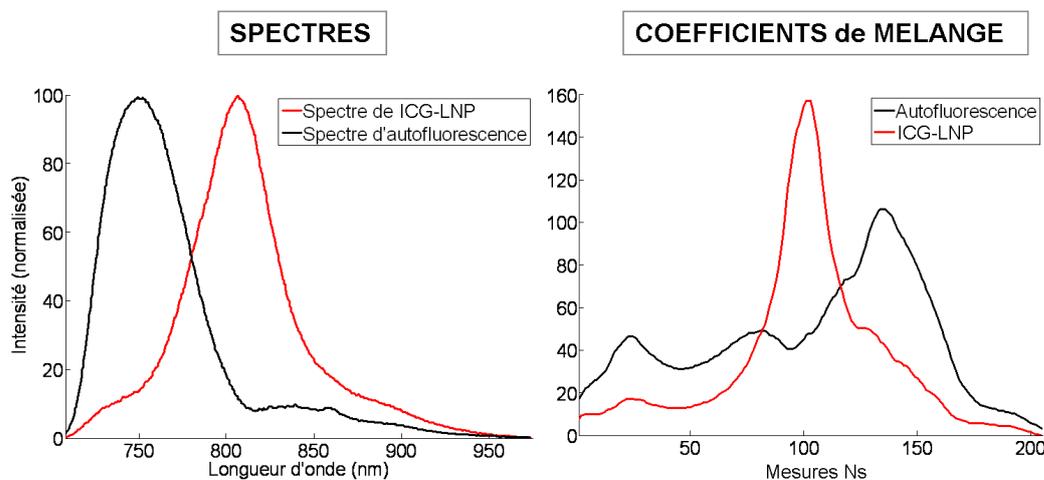


FIGURE G.8: Résultat après FMN sur l'image de départ : spectres de fluorescence (à gauche) et coefficients de mélange (à droite) obtenus

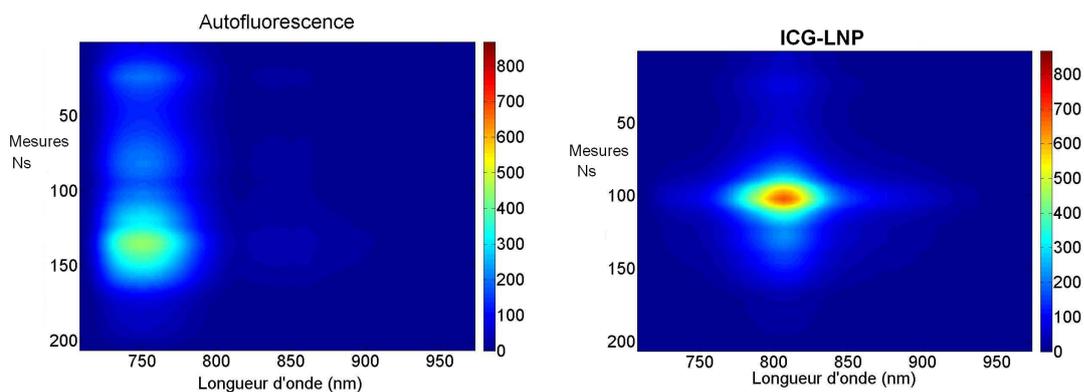


FIGURE G.9: Résultat après FMN sur l'image de départ : les sources de fluorescence ont été séparées. À gauche : l'autofluorescence, à droite : la fluorescence spécifique (nanoparticules lipidiques chargées en ICG (ICG-LNP))

cence, bien que leur spectres de fluorescence se chevauchent. Les spectres obtenus sont encore plus proches des spectres recherchés que ceux obtenus par BPSS. La pondération des sources dans le milieu est également cohérente avec la réalité.

Les résultats obtenus par BPSS et FMN sont comparables, à cela près que les coefficients de mélange obtenus par la méthode BPSS présentent un inconvénient : nous remarquons sur la figure G.6 que des coefficients de mélange de l'autofluorescence sont attribués aux ICG-LNP, soulignant que la séparation de spectres n'a pas été totalement efficace. Ceci est d'ailleurs confirmé sur les spectres obtenus par BPSS (figure G.6 à gauche) : le spectre d'autofluorescence en noir affiche des valeurs quasiment nulles vers 820 nm, longueur d'onde du pic de ICG-LNP, en rouge. L'allure du spectre d'autofluorescence ainsi obtenue, avec un creux à 820 nm, est fautive, et la partie « manquante » de l'autofluorescence à cette longueur d'onde a été attribuée à tort à la fluorescence des ICG-LNP. Cette erreur existe à moindre mesure également sur le résultat obtenu par

FMN.

Enfin, l'algorithme de BPSS a tourné plusieurs heures avant de converger, contre quelques secondes pour l'algorithme de FMN. Cependant nous nous basons sur les résultats obtenus sur une seule expérience, mais selon les cas étudiés, il se pourrait que la BPSS s'avère plus efficace.

Nous avons tout de même choisi de privilégier la méthode FMN, principalement en nous basant sur la facilité d'implémentation et le temps de convergence, et avons proposé de développer de nouveaux algorithmes régularisés propres à nos problèmes qui améliorent les résultats sur nos données.

Régularisation sur l'initialisation : démonstration du Théorème 1

Nous proposons la démonstration du Théorème 1 dans cette annexe.

Théorème 1 *La fonction F_2 est non-croissante, sous les lois de mise à jour suivantes :*

$$S_{p\lambda} \leftarrow S_{p\lambda} \frac{(A^t V + D_\alpha S_0)_{p\lambda}}{(A^t A S + D_\alpha S)_{p\lambda}} \quad A_{np} \leftarrow A_{np} \frac{(V S^t)_{np}}{(A S S^t)_{np}} \quad (\text{H.1})$$

avec :

$$F_2 = (V - A S)^t (V - A S) + (S - S_0)^t D_\alpha (S - S_0) \quad (\text{H.2})$$

où S_0 est l'initialisation de la matrice S , et $D_\alpha = \text{diag}[\alpha_1 \alpha_2 \dots \alpha_p]$ est une matrice diagonale qui contient les P paramètres α_p de régularisation associés aux P spectres de la matrice $(S - S_0)$.

Définition $G(s, s^i)$ est une fonction auxiliaire pour $F_2(s)$ si les conditions

$$G(s, s^i) \geq F_2(s) \quad \text{et} \quad G(s, s) = F_2(s) \quad (\text{H.3})$$

sont satisfaites (voir figure H.1).

Cette définition est utile pour l'introduction du lemme suivant :

Lemme 1 *Si G est une fonction auxiliaire pour F_2 , alors F_2 ne croît pas sous la condition suivante :*

$$s^{i+1} = \text{argmin}_s G(s, s^i) \quad (\text{H.4})$$

Ce lemme est illustré sur le schéma H.1 et a été démontré dans [Lee 01]. En définissant la fonction auxiliaire G de F_2 telles que définies plus haut, les lois de mise à jour présentées dans le théorème 1 découlent naturellement du Lemme 1.

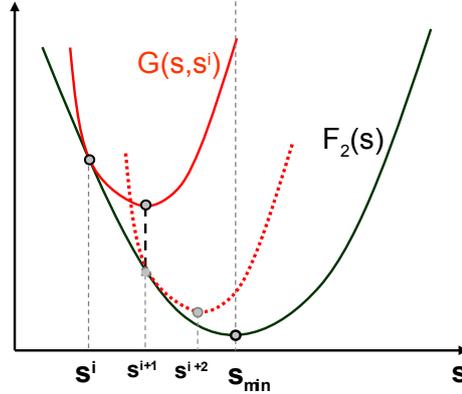


FIGURE H.1: Minimiser la fonction auxiliaire $G(s, s^i) \geq F_2(s)$ garantit que $F_2(s^{i+1}) \leq F_2(s^i)$ pour $s^{i+1} = \operatorname{argmin}_s G(s, s^i)$

Lemme 2 Si $K1(s^i)$ est la matrice diagonale

$$K1_{ab}(s^i) = \frac{\delta_{ab}(A^t A s^i + \alpha \times s^i)_a}{s_a^i}$$

alors, en posant $\Delta s = (s - s^i)$:

$$G(s, s^i) = F_2(s^i) + \Delta s^t \nabla F_2(s^i) + \frac{1}{2} \Delta s^t K1(s^i) \Delta s$$

est une fonction auxiliaire pour

$$F_2(s) = \frac{1}{2} \sum_i (v_i - \sum_a A_{ia} s_a)^2 + \frac{\alpha}{2} \sum_a (s_a - s_a^0)^2$$

Démonstration du Lemme 2 $G(s, s^i)$ est une fonction auxiliaire pour $F_2(s)$ si elle vérifie les conditions explicitées précédemment (H.3). Ainsi, si $G(s, s) = F_2(s)$ est évident, il reste à prouver que $G(s, s^i) \geq F_2(s)$.

Si $\nabla F_2(s^i)$ est le gradient de F_2 et H est la matrice hessienne de F_2 (soit la matrice carrée de ses dérivées partielles secondes) :

$$F_2(s) = F_2(s^i) + \Delta s^t \nabla F_2(s^i) + \frac{1}{2} \Delta s^t H(F_2) \Delta s \quad (\text{H.5})$$

Avec :

$$\begin{aligned} F_2(s^i) &= \frac{1}{2} \|v - A s^i\|^2 + \frac{\alpha}{2} \|s^i - s_0^i\|^2 \\ &= \frac{1}{2} (v - A s^i)^t (v - A s^i) + \frac{\alpha}{2} (s^i - s_0^i)^t (s^i - s_0^i) \\ \nabla F_2(s^i) &= A^t (A s^i - v) + \alpha (s^i - s_0^i) \\ H_{ij}(F_2) &= \frac{\delta^2 F_2}{\delta s^i \delta s^j} = \begin{pmatrix} \frac{\delta^2 F_2}{\delta s^{i^2}} & \frac{\delta^2 F_2}{\delta s^i \delta s^j} \\ \frac{\delta^2 F_2}{\delta s^j \delta s^i} & \frac{\delta^2 F_2}{\delta s^{j^2}} \end{pmatrix} = A^t A + \alpha I \end{aligned} \quad (\text{H.6})$$

Nous obtenons enfin :

$$\begin{aligned}
G(s, s^i) - F_2(s) &= F_2(s^i) + \Delta s^t \nabla F_2(s^i) + \frac{1}{2} \Delta s^t K1(s^i) \Delta s \\
&\quad - F_2(s) - \Delta s^t \nabla F_2(s) - \frac{1}{2} \Delta s^t H(F_2) \Delta s \\
&= \frac{1}{2} \Delta s^t (K1(s^i) - H(F_2)) \Delta s \\
&= \frac{1}{2} \Delta s^t (K1(s^i) - A^t A - \alpha I) \Delta s
\end{aligned} \tag{H.7}$$

D'où l'équivalence suivante :

$$G(s, s^i) \geq F_2(s) \iff \Delta s^t (K1(s^i) - A^t A - \alpha I) \Delta s \geq 0 \tag{H.8}$$

Prouvons alors la positivité du terme $\Delta s^t (K1(s^i) - A^t A - \alpha I) \Delta s$:

$$\begin{aligned}
\Delta s^t (K1(s^i) - A^t A - \alpha I) \Delta s &= \sum_{ab} \Delta s_a (K1(s) - A^t A - \alpha I)_{ab} \Delta s_b \\
&= \sum_{ab} \Delta s_a \left(\frac{\delta_{ab} (A^t A s^i + \alpha \times s^i)_a}{s_a^i} - (A^t A - \alpha I)_{ab} \right) \Delta s_b \\
&= \sum_{ab} \Delta s_a \left(\frac{\delta_{ab} (\sum_c \sum_d (A_{da} A_{dc} s_c^i) + \alpha \times s_a^i)}{s_a^i} - \sum_d A_{da} A_{db} - \alpha \delta_{ab} \right) \Delta s_b \\
&= \sum_{a,c,d} A_{da} A_{dc} \left(\Delta s_a \Delta s_a \frac{s_c^i}{s_a^i} - \Delta s_a \Delta s_c \right) + \sum_a \Delta s_a \left(\frac{\alpha \times s_a^i}{s_a^i} - \alpha \right) \Delta s_a \\
&= \frac{1}{2} \sum_{a,c,d} A_{da} A_{dc} \left(\Delta s_a \Delta s_a \frac{s_c^i}{s_a^i} - \Delta s_a \Delta s_c + \Delta s_c \Delta s_c \frac{s_a^i}{s_c^i} - \Delta s_c \Delta s_a \right) + 0 \\
&= \frac{1}{2} \sum_{a,c,d} A_{da} A_{dc} \left(\Delta s_a \left(\frac{s_c}{s_a} \right)^{\frac{1}{2}} - \Delta s_c \left(\frac{s_a}{s_c} \right)^{\frac{1}{2}} \right)^2 \geq 0
\end{aligned} \tag{H.9}$$

■

En découle la démonstration du Théorème 1 :

Démonstration du Théorème 1 Le Lemme 1 donne : $s^{i+1} = \operatorname{argmin}_s G(s, s^i)$.

Puisque :

$$\begin{aligned}
\forall a, \frac{\delta G(s, s^i)}{\delta s_a^i} &= (\nabla F_2(s))_a + (K1(s) \Delta s)_a = 0 \\
\implies \Delta s &= -K1(s)^{-1} \nabla F_2(s)
\end{aligned} \tag{H.10}$$

nous obtenons :

$$\forall a, s_a^{i+1} - s_a^i = - \sum_b K1_{ab}(s^i)^{-1} \times (A^t (A s^i - v) + \alpha (s^i - s_0^i))_b \tag{H.11}$$

Ce qui nous donne enfin la loi de mise à jour de s suivante :

$$S^{(i+1)} = S^{(i)} \frac{A^t V + \alpha S_0}{A^t A S^{(i)} + \alpha S^{(i)}} \quad (\text{H.12})$$

■

Notons qu'en inversant les rôles de S et A dans les Lemmes 1 et 2, nous pouvons démontrer de la même façon que F ne croît pas sous la loi de mise à jour équivalente pour A . Dans le cas qui nous intéresse, la contrainte sur la distance entre l'initialisation et le résultat final n'a pas d'intérêt en ce qui concerne la matrice de pondération A (de plus initialisée de façon aléatoire), et s'appliquera seulement à la matrice des spectres S .

Second exemple d'élimination de l'autofluorescence sur souris avec une tumeur réelle marquée par de l'IR800

Nous proposons un second exemple d'élimination de l'autofluorescence des tissus sur une souris injectée avec de l'IR800 (200 μl à 50 μM). Nous imageons l'animal 4h, 24h et 48h après injection, comme présenté figures I.1-a, I.1-b et I.1-c. Une fois de plus, le marqueur IR800 ne se fixe pas spécifiquement dans la souris mais circule dans tout le corps, et s'accumule particulièrement dans les reins et la vessie.

Nous appliquons l'algorithme de FMN aux différentes acquisitions. Pour le résultat 4h après l'injection, le signal d'autofluorescence est très faible comparé aux signaux spécifique et non spécifique du marqueur. Afin d'éliminer tout de même un peu d'autofluorescence (et principalement au niveau des intestins), l'algorithme \mathbf{FMN}_{ri} avec contrainte sur l'initialisation est choisi. Un modèle du spectre d'autofluorescence des tissus de souris (obtenu lors de précédentes expériences sur souris non injectées) est utilisé, et le coefficient de régularisation qui contraint le spectre d'autofluorescence à se rapprocher de son initialisation est fixé à 10^2 (réglage empirique). Pour les autres acquisitions (à 24h et 48h), l'algorithme \mathbf{FMN}_{pdm} à initialisations à départs multiples et parcimonie (en général réglé à 0,5 pour une valeur de parcimonie neutre) est utilisé.

Les résultats obtenus sont présentés figures I.1-d, I.1-e et I.1-f : la FMN a principalement pour effet ici de supprimer l'autofluorescence des intestins de l'animal, ce qui permet d'isoler la tumeur de l'abdomen de la souris. Les contrastes sont améliorés pour chaque acquisition (de 0,3 à 0,36 à 4h, de 0,22 à 0,52 à 24h, et de 0,22 à 0,52 à 48h), et le plus bas contraste obtenu après FMN (figure I.1-f à 0,31) reste supérieur au meilleur contraste avant séparation (figure I.1-a à 0,3).

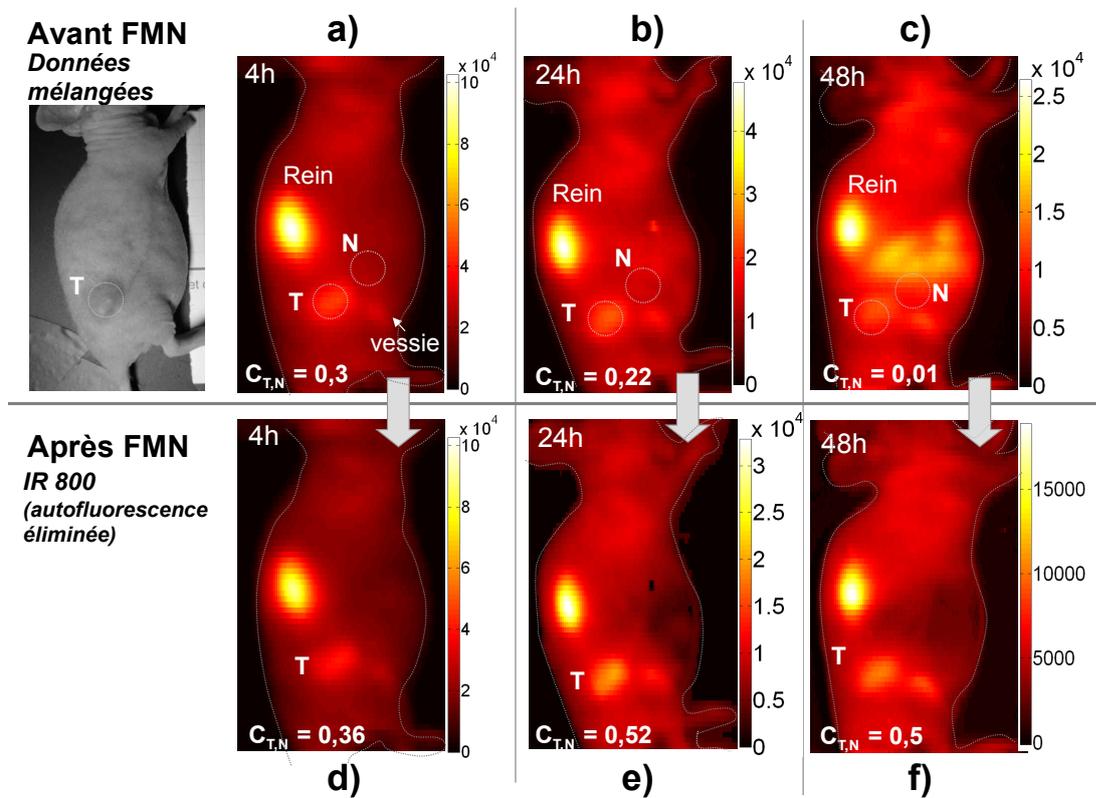


FIGURE I.1: *Expérience sur souris avec une tumeur sous-cutanée marquée par de l'IR800 (200 μ l à 50 μ M). Acquisitions obtenues à 4 h (a), 24 h (b) et 48 h (c) après injection des marqueurs. Résultats de la séparation de spectres (d, e et f) et amélioration du contraste $C_{T,N}$.*

Liste des publications et communications

Les résultats présentés dans ce manuscrit de thèse ont fait l'objet de publications, et ont été présentés à plusieurs congrès nationaux et internationaux. Nous détaillons nos différentes contributions dans les paragraphes suivants.

I.0.10 Revues à comité de lecture

1. "Non negative Matrix Factorization : a blind spectra separation method for *in vivo* fluorescent optical imaging"
Montcuquet A.-S., Hervé L., Navarro F., Dinten J.-M., Mars J.I. *Journal of Biomedical Optics*, **Paru**.
2. "In vivo fluorescence spectra unmixing and autofluorescence removal improvement by sparse Non-negative Matrix Factorization"
Montcuquet A.-S., Hervé L., Navarro F., Dinten J.-M., Mars J.I. *Soumis à IEEE transactions on Biomedical Engineering*, **En révision**.

I.0.11 Congrès internationaux

1. "Multi-site and multi-depth *in vivo* cancer localization enhancement after autofluorescence removal"
Montcuquet A.-S., Hervé L., Dinten J.-M., Mars J.I. *Proc. to BIOS congress, SPIE Photonics West*, San Francisco, USA, January 2011.
2. "New Non-negative Matrix Factorization algorithm with sparsity constraints and application to *in vivo* spectrally resolved data unmixing"
Montcuquet A.-S., Hervé L., Navarro F., Dinten J.-M., Mars J.I. *Proc. to the World Molecular Imaging Congress (WMIC)*, Kyoto, Japan, September 2010.
3. "*In vivo* autofluorescence and specific fluorescence unmixing by Non-negative Matrix Factorization"
Montcuquet A.-S., Hervé L., Josserand V., Dinten J.-M., Mars J.I. *Proc. to the World Molecular Imaging Congress (WMIC)*, Kyoto, Japan, September 2010.

4. "Non-Negative Matrix Factorization under sparsity constraints to unmix *in vivo* spectrally resolved acquisitions"
Montcuquet A.-S., Hervé L., Dinten J.-M., Mars J.I. Proc. to the 2nd workshop on hyperspectral image and signal processing : "evolution in remote sensing, IEEE, Reykjavik, ICELAND, June 2010.
5. "Non-Negative Matrix Factorization to unmix several fluorescence spectra and remove the autofluorescence from *in vivo* spectrally resolved acquisitions"
Montcuquet A.-S., Hervé L., Navarro F., Dinten J.-M., Mars J.I. *Proc. to Biomedical Optics (BIOMED) OSA*, Miami, USA, April 2010.
6. "Non Negative Matrices Factorization to remove the autofluorescence and improve 3D reconstructions"
Montcuquet A.-S., Hervé L., Dinten J.-M., Mars J.I. *Proc. to Biomedical Optics (BIOMED) OSA*, Miami, USA, April 2010.
7. "Non-negative Matrix Factorization : a blind sources separation method applied to optical fluorescence spectroscopy and multiplexing"
Montcuquet A.-S., Hervé L., Dinten J.-M., Mars J.I. *Proc. to Biomedical Optics BIOS congress, SPIE Photonics West*, San Francisco, USA, January 2010. *Proc. SPIE-OSA Biomedical Applications of Light Scattering IV, Vol. 7573, 757314*
8. "Non-negative Matrix Factorization applied to optical fluorescence spectroscopy : a blind sources separation method to unmix autofluorescence and specific fluorescence"
Montcuquet A.-S., Hervé L., Dinten J.-M., Mars J.I. *Proc. to World Molecular Imaging Congress*, Montreal, CANADA, September 2009.
9. "Non-negative matrix factorization : a blind sources separation method to unmix fluorescence spectra"
Montcuquet A.-S., Hervé L., Guyon L., Dinten J.-M., Mars J.I. *Proc. to 1st workshop on hyperspectral image and signal processing : evolution in remote sensing (IEEE Conferences 10.1109, 5289009)*, Grenoble, FRANCE, August 2009.

I.0.12 Congrès nationaux

1. "Séparation de spectres et amélioration de la FDOT en imagerie optique de fluorescence *in vivo* par Factorisation en Matrices Non-négatives"
Montcuquet A.-S., Hervé L., Navarro F., Dinten J.-M., Mars J.I. *4^e édition des Journées Imagerie Optique Non Conventiennelle, Gdr Isis et Ondes*, Paris, Mars 2010.
2. "Application de la factorisation en matrices non-négatives à l'élimination de l'autofluorescence des tissus biologiques"
Montcuquet A.-S., Hervé L., Dinten J.-M., Mars J.I. *Actes du XXIII^{ème} Colloque GRETSI*, Dijon, Septembre 2009.
3. "Élimination de l'autofluorescence des tissus par Factorisation en Matrices Non-négatives"
Montcuquet A.-S., Hervé L., Navarro F., Dinten J.-M., Mars J.I. *3^e édition des*

Journées Imagerie Optique Non Conventiionnelle, Gdr Isis et Ondes, Paris, Mars 2009.

I.0.13 Brevets

1. "Fluorescence acquisition processing by Non-negative Matrix Factorization" **Montcuquet A.-S.**, Hervé L., Mars J.I. Brevet français DD11178
2. "Autofluorescent optical phantom and associate process " **Montcuquet A.-S.** Brevet français DD11726
3. Correction of biological tissues autofluorescence by Non-negative Matrix Factorization, Laidevant A., **Montcuquet A.-S.**, Dinten J.-M. Brevet français DD12030, Rédaction en cours

Bibliographie

- [Abdallah 04] A. Abdallah & M. D. Plumbley. *Polyphonic transcription by non-negative sparse coding of power spectra*. pages 318–325, 2004.
- [Adali 09] T. Adali, C. Jutten, J. M. Romano & A. K. Barros. *Independent Component Analysis and Signal Separation*. Lecture Notes in computer Science. Springer, 03 2009. Département Images et Signal.
- [Alacam 8] B. Alacam, B. Yazici, X. Intes, S. Nioka & B. Chance. *Pharmacokinetic-rate images of indocyanine green for breast tumors using near-infrared optical methods*. *Physics in Medicine and Biology*, vol. 53, no. 4, pages 837–859, 2008.
- [Albrecht-Buehler 7] G. Albrecht-Buehler. *Autofluorescence of live purple bacteria in the near infrared*. *Experimental Cell Research*, vol. 236, no. 1, pages 43–50, 1997.
- [Arridge 95] S. R. Arridge & M. Schweiger. *Photon-measurement density functions. Part 2 : Finite-element-method calculations*. *Applied Optics*, vol. 34, no. 34, page 8026, 1995.
- [Arridge 99] S. R. Arridge. *Optical tomography in medical imaging*. *Inverse Problems*, vol. 15, pages R41–R93, 1999.
- [Baker 66] K.-J. Baker. *Binding of sulfobromophtalein (BSP) sodium and indocyanine green (ICG) by plasma alpha1 lipoproteins*. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, vol. 122, no. 4, pages 957–&, 1966.
- [Bar-Shalom 03] R. Bar-Shalom & et al. *Clinical Performance of PET/CT in Evaluation of Cancer : Additional Value for Diagnostic Imaging and Patient Management*. *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 44, no. 8, pages 1200–1209, 2003.
- [Beer 08] A. J. Beer & M. Schwaiger. *Imaging of integrin alpha v beta 3 expression*. *Cancer and metastasis reviews*, vol. 27, no. 4, pages 631–644, 2008.

- [Berezin 07] M. Y. Berezin, H. Lee, W. Akers & S. Achilefu. *Near infrared dyes as lifetime solvatochromic probes for micropolarity measurements of biological systems*. Biophysical Journal, vol. 93, no. 8, pages 2892–2899, 2007.
- [Berne 7] O. Berne, C. Joblin, Y. Deville, J. D. Smith, M. Rapacioli, J. P. Bernard, J. Thomas, W. Reach & A. Abergel. *Analysis of the emission of very small dust particles from Spitzer spectro-imagery data using blind signal separation methods*. Astronomy & Astrophysics, vol. 469, no. 2, pages 575–586, 2007.
- [Berne 9] O. Berne, C. Joblin, A. Tielens, Y. Deville, M. Puigt, R. Guidara, S. Hosseini, G. Mulas & J. Cami. *Source separation algorithms for the analysis of hyper-spectral observations of very small interstellar dust particles*. In 1st workshop on Hyperspectral image and Signal Processing : evolution in remote sensing, pages 29–32. IEEE Geosci & Remote Sensing Soc, 2009. 1st Workshop on Hyperspectral Image and Signal Processing - Evolution in Remote Sensing, Grenoble, FRANCE, AUG 26-29, 2009.
- [Berry 07] M. W. Berry, M. Browne, A. N. Langville, V. P. Pauca & R. J. Plemmons. *Algorithms and applications for approximate nonnegative matrix factorization*. Computational Statistics and Data Analysis, vol. 52, no. 1, pages 155–173, 2007.
- [Bertin 9] N. Bertin, C. Fevotte & R. Badeau. *A Tempering approach for Itakura-Saito Non-negative Matrix Factorization with application to music transcription*. vol. 1- 8, pages 1545–1548, 2009. IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing, 2009.
- [Bertin 0] N. Bertin, R. Badeau & E. Vincent. *Enforcing Harmonicity and Smoothness in Bayesian Non-Negative Matrix Factorization Applied to Polyphonic Music Transcription*. IEEE Transactions on audio speech and language processing, vol. 18, no. 3, pages 538–549, 2010.
- [Bertin 09] N. Bertin. *Les factorisations en matrices non-négatives. Approches contraintes et probabilistes, application à la transcription automatique de musique polyphonique*. PhD thesis, Ecole Nationale Supérieure des Télécommunications, 2009.
- [Beyer 00] T. Beyer, D. W. Townsend, T. Brun, P. E. Kinahan, M. Charron, R. Roddy, J. Jerin, J. Young, L. Byars & R. Nutt. *A combined PET/CT scanner for clinical oncology*. Journal of Nuclear Medicine, vol. 41, no. 8, pages 1369–1379, 2000.
- [Billinton 01] N. Billinton & A. W. Knight. *Seeing the Wood through the Trees : A review of techniques for distinguishing Green Fluorescent Protein from Endogenous Autofluorescence*. Analytical Biochemistry, vol. 291, no. 2, pages 175 – 197, 2001.

- [Boturyn 04] D. Boturyn, J. L. Coll, E. Garanger, M. C. Favrot & P. Dumy. *Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis*. Journal of the american chemical society, vol. 126, no. 18, pages 5730–5739, 2004.
- [Bouchard 07] M. B. Bouchard, S. A. MacLaurin, P. J. Dwyer, J. Mansfield, R. Levenson & T. Krucker. *Technical considerations in longitudinal multispectral small animal molecular imaging*. Journal of Biomedical Optics, vol. 12, no. 5, 2007.
- [Boutet 09] J. Boutet, L. Herve, M. Debourdeau, L. Guyon, P. Peltie, J.-M. Dinten, L. Saroul, F. Duboeuf & D. Vray. *Bimodal ultrasound and fluorescence approach for prostate cancer diagnosis*. Journal of Biomedical Optics, vol. 14, no. 6, 2009.
- [Brault 01] D. Brault, B. Aveline, O. Delgado & M.-T. Martin. *Chlorin-type photosensitizers photochemically derived from vinyl porphyrins*. Photochemistry and Photobiology, vol. 73, no. 4, pages 331–338, 2001.
- [Bro 7] R. Bro. *PARAFAC : Tutorial and applications*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, vol. 38, no. 2, pages 149–171, 1997.
- [Bro 8] R. Bro & N. D. Sidiropoulos. *Least squares algorithms under unimodality and non-negativity constraints*. Journal of Chemometrics, vol. 12, no. 4, pages 223–247, 1998.
- [Case 67] K.M. Case & P.F. Zweifel. *Linear transport theory*. Addison-Wesley Educational Publishers Inc., US, 1967.
- [Cerussi 01] A. E. Cerussi, A. J. Berger, F. Bevilacqua, N. Shah, D. Jakubowski, J. Butler, R. F. Holcombe & B. J. Tromberg. *Sources of absorption and scattering contrast for near-infrared optical mammography*. Academic Radiology, vol. 8, no. 3, pages 211–218, 2001.
- [Chandrasekhar 43] S. Chandrasekhar. *Stochastic Problems in Physics and Astronomy*. Rev. Mod. Phys., vol. 15, no. 1, pages 1–89, 1943.
- [Chen 05] Z. Chen & A. Cichocki. *Nonnegative matrix factorization with temporal smoothness and/or spatial decorrelation constraints*. Preprint, 2005.
- [Cheong 90] W. F. Cheong, S. A. Prahl & A. J. Welch. *A review of the optical properties of biological tissues*. IEEE Journal of Quantum Electronics, vol. 26, no. 12, pages 2166–2185, 1990.
- [Cichocki 7] A. Cichocki & R. Zdunek. *Multilayer nonnegative matrix factorization using projected gradient approaches*. International Journal of Neural Systems, vol. 17, no. 6, pages 431–446, 2007.
- [Cichocki 02] A. Cichocki & S.-I. Amari. *Adaptive Blind Signal and Image Processing : Learning Algorithms and Applications*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, 2002.

- [Cichocki 06a] A. Cichocki, R. Zdunek & S. Amari. Independent component analysis and blind signal separation, volume 3889, pages 32–39. Springer Berlin / Heidelberg, 2006.
- [Cichocki 06b] A. Cichocki, R. Zdunek & S. Amari. *New algorithms for non-negative matrix factorization in applications to blind source separation*. In Proceeding to IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing, volume 5, pages V–V, 2006.
- [Cichocki 09] A. Cichocki, S. Amari, A.-H. Phan & R. Zdunek. Nonnegative matrix and tensor factorizations : Applications to exploratory multi-way data analysis and blind source separation. Wiley-Blackwell, Chichester, UK, 2009.
- [Comon 92] P. Comon. Higher-Order Statistics, chapitre Independent Component Analysis, pages 29–38. Elsevier, 1992.
- [Comon 10] P. Comon & C. Jutten. Handbook of blind source separation : Independent component analysis and applications. Academic Press, 2010.
- [Comon 4] P. Comon. *Independent Component Analysis, a new concept?* Signal Processing, vol. 36, no. 3, pages 287–314, 1994.
- [Cronin 04] P.J. Cronin, P.J. Miller, S.D. Fantone & D. Orband. *Multispectral imaging system*, November 30 2004. US Patent 6,825,930.
- [Cronin 05] P. Cronin & P. J. Miller. *Spectral imaging*, September 18 2005. US Patent App. 11/522,745.
- [Cutler 31] M. Cutler. *Transillumination of the breast*. Annals of surgery, 1931.
- [D’Amico 98] A.-V. D’Amico, R. Cormack, C.-M. Tempany, S. Kumar, G. Topulos, H.-M. Kooy & C.-N. Coleman. *Real-time magnetic resonance image-guided interstitial brachytherapy in the treatment of select patients with clinically localized prostate cancer*. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, vol. 42, no. 3, pages 507–515, 1998.
- [De Grand 06] A. M. De Grand, S. J. Lomnes, D. S. Lee, M. Pietrzykowski, S. Ohnishi, T. G. Morgan, A. Gogbashian, R. G. Laurence & J. V. Frangioni. *Tissue-Like Phantoms for Near-Infrared Fluorescence Imaging System Assessment and the Training of Surgeons*. Journal of biomedical optics, vol. 11, no. 1, 2006.
- [De Lathauwer 94] L. De Lathauwer, B. De Moor & J. Vandewalle. *Blind source separation by higher-order singular value decomposition*. Proceedings of EURASIP European Signal Processing Conference (EUSIPCO), vol. 1, pages 175–178, 1994.
- [De Veld 03] D. C. G. De Veld, M. Skurichina, M. J. H. Witjes, R. P. W. Duin, D. J. C. M. Sterenborg, W. M. Star & J. L. N. Roodenbur. *Autofluorescence Characteristics of Healthy Oral Mucosa at Different Anatomical Sites*. Lasers in Surgery and Medicine, vol. 32, pages 367 – 376, 2003.

- [De Veld 05] D. C. G. De Veld. *Autofluorescence spectroscopy for the classification of oral lesions*. PhD thesis, University of Groningen, 2005.
- [Dehghani 03] H. Dehghani, B. W. Pogue, S. P. Poplack & K. D. Paulsen. *Multiwavelength three-dimensional near-infrared tomography of the breast : initial simulation, phantom, and clinical results*. *Applied Optics*, vol. 42, no. 1, pages 135–145, 2003.
- [Demoment 01a] G. Demoment & J. Idier. *Approche bayésienne pour les problèmes inverses*, chapitre Introduction, pages 25–39. Hermès, 2001.
- [Demoment 01b] G. Demoment & J. Idier. *Approche bayésienne pour les problèmes inverses*, chapitre 1, pages 41–56. Hermès, 2001.
- [Demos 05] S. G. Demos, R. Bold, R. V. White & R. Ramsamooj. *Investigation of near-infrared autofluorescence imaging for the detection of breast cancer*. *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of*, vol. 11, no. 4, pages 791–798, 2005.
- [Dempster 77] A. P. Dempster, N. M. Laird, D. B. Rubin *et al.* *Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm*. *Journal of the Royal Statistical Society*, vol. 39, no. 1, pages 1–38, 1977.
- [Desmettre 00] T. Desmettre, J. M. Devoisselle & S. Mordon. *Fluorescence Properties and Metabolic Features of Indocyanine Green (ICG) as Related to Angiography*. *Survey of Ophthalmology*, vol. 45, no. 1, pages 15 – 27, 2000.
- [Deville 7] Y. Deville & M. Puigt. *Temporal and time-frequency correlation-based blind source separation methods. Part I : Determined and underdetermined linear instantaneous mixtures*. *Signal Processing*, vol. 87, no. 3, pages 374–407, 2007.
- [Deville 10] Y. Deville, C. Jutten & R. Vigario. *Overview of source separation applications*. Academic Press (Elsevier), 2010.
- [Devoisselle 98] J. M. Devoisselle, S. Soulie-Begu, S. Mordon, T . Desmettre & H. Maillols. *A preliminary study of the in vivo behaviour of an emulsion formulation of indocyanine green*. *Lasers in medical science*, vol. 13, no. 4, pages 279–282, 1998.
- [Dhillon 06] I. Dhillon & S. Sra. *Generalized nonnegative matrix approximations with Bregman divergences*. *Advances in neural information processing systems*, vol. 18, pages 283–290, 2006.
- [Dolphin 78] D. Dolphin. *The porphyrins, volume ii. structure and synthesis, part b*. Academic Press, 1978.
- [Ducros 09] N. Ducros. *Tomographie optique de fluorescence dans les milieux diffusants : apport de l'information temporelle*. PhD thesis, Université Claude Bernard - Lyon 1, 2009.
- [Fang 09] Q. Fang, S. A. Carp, J. Selb, G. Boverman, Q. Zhang, D. B. Kopans, R. H. Moore, E. L. Miller, D. H. Brooks & D. A. Boas. *Combined*

- Optical Imaging and Mammography of the Healthy Breast : Optical Contrast Derived From Breast Structure and Compression*. IEEE Transactions on Medical Imaging, vol. 28, no. 1, pages 30–42, 2009.
- [Flock 92] S. T. Flock, S. L. Jacques, B. C. Wilson, W. M. Star & M.-J. C. Vangemert. *Optical properties of intralipid - a phantom medium for light propagation studies*. Lasers in Surgery and Medicine, vol. 12, no. 5, pages 510–519, 1992.
- [Foillard 08] S. Foillard. *Synthèse de Nouveaux Vecteurs Peptidiques pour la Thérapie Anti-Cancéreuse et l'Imagerie Tumorale*. PhD thesis, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2008.
- [Fournier 06] L. S. Fournier, V. Lucidi, K. Berejnoi, T. Miller, S. G. Demos & R. C. Brasch. *In-vivo NIR autofluorescence imaging of rat mammary tumors*. Opt. Express, vol. 14, no. 15, pages 6713–6723, 2006.
- [Frangioni 03] J. V. Frangioni. *In vivo near-infrared fluorescence imaging*. Current Opinion in Chemical Biology, vol. 7, no. 5, pages 626 – 634, 2003.
- [Funovics 04] M. A. Funovics, R. Weissleder & U. Mahmood. *Catheter-based in vivo imaging of enzyme activity and gene expression : Feasibility study in mice*. Radiology, vol. 231, no. 3, pages 659–666, 2004.
- [Gao 05] H. Gao, T.-H. Li, K. Chen, W. G. Li & X. Bi. *Overlapping spectra resolution using non-negative matrix factorization*. Talanta, vol. 66, no. 1, pages 65 – 73, 2005.
- [Garanger 05] E. Garanger. *Conception, Synthèse et Caractérisation de Nouveaux Systèmes de Guidage et de Vectorisation pour la Cancérologie*. PhD thesis, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2005.
- [Gerbrands 1] J.-J. Gerbrands. *On the relationships between SVD, KLT and PCA*. Pattern Recognition, vol. 14, no. 1-6, pages 375–381, 1981.
- [Ghadially 60] F. N. Ghadially. *Red fluorescence of experimentally induced and human tumours*. J. Pathol Bacteriol, vol. 80, pages 345–351, 1960.
- [Gillenwater 98] A. Gillenwater, R. Jacob, R. Ganeshappa, B. Kemp, A. K. El-Naggar, J. L. Palmer, G. Clayman, M. F. Mitchell & R. Richards-Kortum. *Noninvasive Diagnosis of Oral Neoplasia Based on Fluorescence Spectroscopy and Native Tissue Autofluorescence*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, vol. 124, no. 11, pages 1251–1258, 1998.
- [Gioux 10] S. Gioux, H. S. Choi & J. V. Frangioni. *Image-Guided Surgery using Invisible Near-Infrared Light : Fundamentals of Clinical Translation*. Molecular Imaging, page In press, 2010.
- [Gobinet 04] C. Gobinet, E. Perrin & R. Huez. *Application of Nonnegative Matrix Factorization to fluorescence spectroscopy*. In Proceeding EU-SIPCO, pages 6–10, 2004.
- [Gobinet 06] C. Gobinet. *Application de techniques de séparation de sources à la spectroscopie Raman et à la spectroscopie de fluorescence*. PhD thesis, URCA Reims, 2006.

- [Gobinet 07] C. Gobinet, V. Vrabie, A. Tfyali, O. Piot, R. Huez & M. Manfait. *Pre-processing and Source Separation methods for Raman spectra analysis of biomedical samples*. In Engineering in Medicine and Biology Society, 29th Annual International Conference of the IEEE, pages 6207–6210, 2007.
- [Gobinet 08] C. Gobinet, V. Vrabie, O. Piot & M. Manfait. *Prétraitements et méthodes de séparation de sources pour l'analyse des spectres Raman issus d'échantillons biologiques*. IRBM, vol. 29, no. 1, pages 13 – 19, 2008.
- [Goutayer 10] M. Goutayer, F. Navarro & I. Texier-Nogues. *Emulsion fluorescente de vert d'indocyanine*, 2010.
- [Guinebretière 06] J. M. Guinebretière. *Cancers canauxaires et lobulaires : Quelles sont les différences pour l'anatomo-cyto-pathologiste ?* Springer Paris, 2006.
- [Hall 08] E. J. Hall & D. J. Brenner. *Cancer risks from diagnostic radiology*. British Journal of Radiology, vol. 81, no. 965, pages 362–378, 2008.
- [Halpern 01] E. J. Halpern, M. Rosenberg & L. G. Gomella. *Prostate cancer : Contrast-enhanced US for detection*. Radiology, vol. 219, no. 1, pages 219–225, 2001.
- [Hamza 06] A. B. Hamza & D. J. Brady. *Reconstruction of reflectance spectra using robust nonnegative matrix factorization*. IEEE Transactions on Signal Processing, vol. 54, no. 9, pages 3637–3642, 2006.
- [Hansen 94] P. Hansen. *Regularization tools : A Matlab package for analysis and solution of discrete ill-posed problems*. Numerical Algorithms, vol. 6, pages 1–35, 1994. 10.1007/BF02149761.
- [Harris 87] D. M. Harris & J. Werkhaven. *Endogenous Porphyrin Fluorescence in Tumors*. Lasers in Surgery and Medicine, vol. 7, no. 6, pages 467–472, 1987.
- [Haskell 94] R. C. Haskell, L. O. Svaasand, T. T. Tsay, T. C. Feng, M. S. McAdams & B. J. Tromberg. *Boundary conditions for the diffusion equation in radiative transfer*. J. Opt. Soc. Am. A, vol. 11, pages 11–10, 1994.
- [Haugland 96] R.-P. Haugland. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 9th ed. Molecular Probes Inc., Eugène, OR, 1996.
- [He 8] Z. He, S. Me, L. Zhang & A. Cichocki. *A note on Lewicki-Sejnowski gradient for learning overcomplete representations*. Neural Computation, vol. 20, no. 3, pages 636–643, 2008.
- [He 07] Z. He & A. Cichocki. *An Efficient K-Hyperplane Clustering Algorithm and Its Application to Sparse Component Analysis*. ISNN '07 : Proceedings of the 4th international symposium on Neural Networks, pages 1032–1041, 2007.

- [Hebden 01] J. C. Hebden, H. Veenstra, H. Dehghani, E. M. C. Hillman, M. Schweiger, S. R. Arridge & D. T. Delpy. *Three-dimensional time-resolved optical tomography of a conical breast phantom*. Applied Optics, vol. 40, no. 19, pages 3278–3287, 2001.
- [Hendee 03] W. R. Hendee & E. R. Ritenour. Medical imaging physics. John Wiley & Sons, 2003.
- [Henry 87] R. C. Henry. *Current factor analysis receptor models are ill-posed*. Atmospheric Environment (1967), vol. 21, no. 8, pages 1815 – 1820, 1987.
- [Hosseini 9] S. Hosseini, Y. Deville & H. Saylani. *Blind separation of linear instantaneous mixtures of non-stationary signals in the frequency domain*. Signal Processing, vol. 89, no. 5, pages 819–830, MAY 2009.
- [Hoyer 04] P. O. Hoyer. *Non-negative matrix factorization with sparseness constraints*. The Journal of Machine Learning Research, vol. 5, pages 1457–1469, 2004.
- [Hoyt 06] C. C. Hoyt. *Systems and methods for in-vivo optical imaging and measurement*, Dec. 2006. US Patent App. 11/295,140.
- [Hung 91] J. Hung, S. Lam, J. C. Leriche & B. Palcic. *Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue*. Lasers in surgery and medicine, vol. 11, no. 2, pages 99–105, 1991.
- [Hyvärinen 00] A. Hyvärinen & E. Oja. *Independent component analysis : algorithms and applications*. Neural Networks, vol. 13, no. 4-5, pages 411 – 430, 2000.
- [Inaguma 99] M. Inaguma & K. Hashimoto. *Porphyrin-like Fluorescence in Oral Cancer*. Cancer, vol. 86, pages 2201 – 2211, 1999.
- [Ishimaru 77] A. Ishimaru. *Theory and Application of Wave Propagation and Scattering in Random Media*. IEEE Proceedings, vol. 65, pages 1030–1061, 1977.
- [Jemal 09] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu & M. J. Thun. *Cancer Statistics, 2009*. CA-A Cancer Journal for Clinicians, vol. 59, no. 4, pages 225–249, 2009.
- [Jin 07] Z. H. Jin, V. Jossierand, S. Foillard, D. Boturyn, P. Dumy, M. C. Favrot & J. L. Coll. *In vivo optical imaging of integrin alphaV-beta3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors*. Molecular Cancer, vol. 41, no. 6, pages 1–9, 2007.
- [Jolliffe 02] I. T. Jolliffe. Principal component analysis. Springer, 2002.
- [Jutten 87] C. Jutten. *Calcul neuromimétique et traitement du signal : analyse en composantes indépendantes*. PhD thesis, 1987.
- [Juzenas 01] P. Juzenas, V. Iani, S. Bagdonas, R. Rotomskis & J. Moan. *Fluorescence spectroscopy of normal mouse skin exposed to 5-aminolaevulinic acid and red light*. Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology, vol. 61, no. 1-2, pages 78 – 86, 2001.

- [Kasha 50] M. Kasha. *Characterization of electronic transitions in complex molecules*. Disc Faraday Soc, vol. 9, pages 14–19, 1950.
- [Khan 8] A. A. Khan, V. Vrabie, G. D’Urso & J. I. Mars. *SVD based automated dike monitoring system using DTS data*. pages 1867–1872, 2008. 34th Annual Conference of the IEEE-Industrial-Electronics-Society,.
- [Khan 08] A. A Khan, V. Vrabie, J. I. Mars, A. Girard & G. Durso. *A source separation approach for extraction of leakages in Dikes using Thermometric Data*. IEEE Sensors Journal, vol. 8, no. 7, pages 1118–1129, 2008.
- [Kim 08] H. Kim & H. Park. *Non-negative matrix factorization based on alternating non-negativity constrained least squares and active set method*. SIAM Journal on Matrix Analysis and Applications, vol. 30, no. 2, pages 713–730, 2008.
- [König 92] K. König, A. C. Rueck & H. Schneckenburger. *Fluorescence detection and photodynamic activity of endogenous protoporphyrin in human skin*. Optical Engineering, vol. 31, no. 7, pages 1470–1475, 1992.
- [König 94] K. König, H. Schneckenburger, J. Hemmer, B. J. Tromberg & R. W. Steiner. *In-vivo fluorescence detection and imaging of porphyrin-producing bacteria in the human skin and in the oral cavity for diagnosis of acne vulgaris, caries, and squamous cell carcinoma*. Advances in Laser and Light Spectroscopy to Diagnose Cancer and Other Diseases, vol. 2135, no. 1, pages 129–138, 1994.
- [Koenig 8] A. Koenig, L. Herve, V. Josserand, M. Berger, J. Boutet, A. Da Silva, J.-M. Dinten, P. Peltie, J.-L. Coll & P. Rizo. *In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography*. Journal of Biomedical Optics, vol. 13, no. 1, 2008.
- [Koenig 10] A. Koenig, A. Planat-Chrétien, J.-G. Coutard, L. Hervé, L. Lecordier, M. Brambilla & J.-M. Dinten. *Development of a bi-modality XCT : fDOT instrument*. Proceeding SPIE BIOS, Multimodal Biomedical Imaging V, vol. 7557, no. 1, pages 9–16, 2010.
- [Koldovsky 8] Z. Koldovsky, J. Malek, P. Tichavsky, Y. Deville & S. Hosseini. *Extension of EFICA algorithm for blind separation of piecewise stationary non Gaussian sources*. In IEEE International conference on acoustics, speech and signal processing, volume 1–12, pages 1913–1916, 2008.
- [Laidevant 06] A. Laidevant. *Méthodes optiques résolues en temps pour la tomographie de fluorescence dans les milieux diffusants*. PhD thesis, Université Joseph Fourier, 2006.
- [Lakowicz 92] J. R. Lakowicz, H. Szmazinski, K. Nowaczyk & M.-L. Johnson. *Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH*.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 89, no. 4, pages 1271–1275, 1992.
- [Lakowicz 93] J. R. Lakowicz & H. Szmajda. *Fluorescence lifetime-based sensing of pH, CA-2(+), K⁺ and glucose*. Sensors and Actuators B-chemical, vol. 11, no. 1-3, pages 133–143, 1993.
- [Lakowicz 99] J.R. Lakowicz. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, 1999.
- [Lamy 05] P.-J. Lamy, F. Comte & Eberlé M.-C. *Combined role of tumor markers and 18fluoro-deoxyglucose-positron emission tomography (18FDG-PET) in follow-up of cancer patients*. Bulletin du Cancer, vol. 92, no. 10, pages 858–864, 2005.
- [Landsman 6] M.-L. J. Landsman, G. Kwant, G. A. Mook & W. G. Zijlstra. *Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green*. Journal of Applied Physiology, vol. 40, no. 4, pages 575–583, 1976.
- [Le Bihan 4] N. Le Bihan & J. I. Mars. *Singular value decomposition of quaternion matrices : a new tool for vector-sensor signal processing*. Signal Processing, vol. 84, no. 7, pages 1177–1199, JUL 2004.
- [Le Bihan 06] N. Le Bihan, V. Vrabie & J. I. Mars. *Multi-Dimensional Seismic Data Decomposition by Higher Order SVD and Unimodal ICA*. In Signal Processing for Remote Sensing, chapitre 5, pages 75 – 100. CRC Press, 2006.
- [Leblond 10] F. Leblond, S. C. Davis, P. A. Valdés & B. W. Pogue. *Pre-clinical whole-body fluorescence imaging : Review of instruments, methods and applications*. Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology, vol. 98, no. 1, pages 77 – 94, 2010.
- [Lee 99] D. D. Lee & H. S. Seung. *Learning the parts of objects by non-negative matrix factorization*. Nature, vol. 401, no. 6755, pages 788–791, 1999.
- [Lee 01] D. D. Lee & H. S. Seung. *Algorithms for Non-negative Matrix Factorization*. Advances in neural information processing systems, vol. 13, pages 556–562, 2001.
- [Leff 08] D. R. Leff, O. J. Warren, L. C. Enfield, A. Gibson, T. Athanasiou, D. K. Patten, J. Hebden, G. Z. Yang & A. Darzi. *Diffuse optical imaging of the healthy and diseased breast : A systematic review*. Breast Cancer Research and Treatment, vol. 108, no. 1, pages 9–22, 2008.
- [Levenson 05] R. Levenson & P. J. Cronin. *Spectral imaging of biological samples*, May 6 2005. WO Patent 2005/040769 A2.
- [Levenson 06] R. Levenson & C.C. Hoyt. *Systems and methods for in-vivo optical imaging and measurement*, December 6 2006. US Patent App. 11/295,701.

- [Levenson 08] R. Levenson & P. J. Cronin. *Spectral imaging of deep tissue*, Jan. 2008. US Patent 7,321,791.
- [Li 6a] Y.-Q. Li, S.-I. Amari, A. Cichocki, D.-W. C. Ho & S.-L. Xie. *Under-determined blind source separation based on sparse representation*. IEEE Transactions on Signal Processing, vol. 54, no. 2, pages 423–437, 2006.
- [Li 6b] Y.-Q. Li, A. Cichocki & S.-I. Amari. *Blind estimation of channel parameters and source components for EEG signals : A sparse factorization approach*. IEEE Transactions on Neural Networks, vol. 17, no. 2, pages 419–431, 2006.
- [Lin 07] C.-J. Lin. *Projected Gradient Methods for Non-negative Matrix Factorization*. Neural Computation, vol. 19, no. 10, 2007.
- [Maclaren 10] J. Maclaren, O. Speck, D. Stucht, P. Schulze, J. Hennig & M. Zaitsev. *Navigator Accuracy Requirements for Prospective Motion Correction*. Magnetic Resonance in Medicine, vol. 63, no. 1, pages 162–170, 2010.
- [MacLaurin 06] S. A. MacLaurin, M. Bouchard, P. Dwyer, R. Levenson, J. Mansfield & T. Krucker. *Reduction of Skin and Food Autofluorescence in Different Mouse Strains through Diet Changes*. Rapport technique, 2006.
- [Marchesini 89] R. Marchesini, A. Bertoni, S. Andreola, E. Melloni & A. Sichirollo. *Extinction and absorption coefficients and scattering phase functions of human tissues in vitro*. Applied Optics, vol. 28, pages 2318–2324, 1989.
- [Mars 4] J. I. Mars, F. Glangeaud & J. L. Mari. *Advanced signal processing tools for dispersive waves*. Near Surface Geophysics, vol. 2, no. 4, Sp. Iss. SI, pages 199–210, 2004.
- [Mars 04] J. I. Mars, J. L. Lacoume, J. L. Mari & Glangeaud F. *Traitement du signal pour géologues et géophysiciens*, vol 3 : Techniques avancées. Editions technip, 2004.
- [Meikle 5] S. R. Meikle, P. Kench, M. Kassiou & R. B. Banati. *Small animal SPECT and its place in the matrix of molecular imaging technologies*. Physics in Medicine and Biology, vol. 50, no. 22, pages R45–R61, 2005.
- [Merrih Bayat 10] F. Merrih Bayat, M. Babaie Zadeh & C. Jutten. *Using Non-Negative Matrix Factorization for Removing Show-Through*. Latent Variable Analysis and Signal Separation (LVA-ICA 2010), vol. 6365, pages 482–489, 09 2010. Département Images et Signaux.
- [Mobley 03] J. Mobley & T. Vo-Dinh. *Optical properties of Tissue*. In Tuan Vo-Dinh, editeur, Biomedical Photonics Handbook, pages 2–1–2–75. CRC Press, 2003.

- [Mordon 8] S. Mordon, J. M. Devoisselle, S. Soulie-Begu & T. Desmettre. *Indocyanine green : Physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo*. *Microvascular Research*, vol. 55, no. 2, pages 146–152, 1998.
- [Moussaoui 04] S. Moussaoui, D. Brie, O. Caspary & A. Mohammad-Djafari. *A Bayesian method for positive source separation*. In *IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing, 2004. Proceedings.(ICASSP'04)*, volume 5, 2004.
- [Moussaoui 05a] S. Moussaoui. *Séparation de sources non-négatives. Application au traitement des signaux de spectroscopie*. PhD thesis, Université Henri Poincaré, Nancy 1, 2005.
- [Moussaoui 05b] S. Moussaoui, D. Brie & J. Idier. *Non-negative source separation : range of admissible solutions and conditions for the uniqueness of the solution*. In *Proceeding to IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, volume 5, pages 289–292, March 2005.
- [Navarro 09] F. P. Navarro, M. Berger, M. Goutayer, S. Guillermet, V. Josserand, P. Rizo, F. Vinet & I. Texier. *A novel indocyanine green nanoparticle probe for non invasive fluorescence imaging in vivo*. *Progress in biomedical optics and imaging*, vol. 10, no. 30, pages 1–10, 2009.
- [Ntziachristos 01] V. Ntziachristos & R. Weissleder. *Experimental three-dimensional fluorescence reconstruction of diffuse media by use of a normalized Born approximation*. *Optical Letters*, vol. 26, no. 12, pages 893–895, 2001.
- [Ntziachristos 04] V. Ntziachristos, E.A. Schellenberger, J. Ripoll, D. Yessayan, E. Graves, A. Bogdanov, L. Josephson & R. Weissleder. *Visualization of antitumor treatment by means of fluorescence molecular tomography with an annexin V-Cy5. 5 conjugate*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, no. 33, page 12294, 2004.
- [O'Grady 8] P. D. O'Grady & B. A. Pearlmutter. *Discovering speech phones using convolutive non-negative matrix factorisation with a sparseness constraint*. *Neurocomputing*, vol. 72, no. 1-3, Sp. Iss. SI, pages 88–101, DEC 2008.
- [Oja 4] E. Oja & M. Plumbley. *Blind separation of positive sources by globally convergent gradient search*. *Neural Computation*, vol. 16, no. 9, pages 1811–1825, 2004.
- [Onizawa 03] K. Onizawa, N. Okamura, H. Saginoya & H. Yoshida. *Characterization of autofluorescence in oral squamous cell carcinoma*. *Oral Oncology*, vol. 39, pages 150–156(7), 2003.
- [Ouedraogo 10] W. Ouedraogo, A. Souloumiac & C. Jutten. *Non-negative Independent Component Analysis Algorithm Based on 2D Givens Ro-*

- tations and a Newton Optimization. vol. 6365, pages 522–529, 09 2010. Département Images et Signal.
- [Paatero 94] P. Paatero & U. Tapper. *Positive matrix factorization : A non-negative factor model with optimal utilization of error estimates of data values*. *Environmetrics*, vol. 5, no. 2, pages 111–126, 1994.
- [Paatero 97] P. Paatero. *Least squares formulation of robust non-negative factor analysis*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 37, no. 1, pages 23–35, 1997.
- [Pascual-Montano 06] Alberto Pascual-Montano, Pedro Carmona-Saez, Monica Chagoyen, Francisco Tirado, Jose M. Carazo & Roberto D. Pascual-Marqui. *bioNMF : a versatile tool for non-negative matrix factorization in biology*. *BMC Bioinformatics*, vol. 7, no. 1, pages 366–375, 2006.
- [Patterson 89] M. S. Patterson, B. Chance & B. C. Wilson. *Time resolved reflectance and transmittance for the non-invasive measurement of tissue optical properties*. *Applied Optics*, vol. 28, no. 12, pages 2331–2336, 1989.
- [Pauca 04] V. P. Pauca, F. Shahnaz, M. W. Berry & R. J. Plemmons. *Text mining using non-negative matrix factorizations*. In *Proceedings of the Fourth SIAM International Conference on Data Mining*, pages 452–456. Soc Ind & Appl Math, 2004.
- [Pauca 06] V. P. Pauca, J. Piper & R. J. Plemmons. *Nonnegative matrix factorization for spectral data analysis*. *Linear Algebra and its Applications*, vol. 416, no. 1, pages 29–47, 2006.
- [Plumbley 2] M. Plumbley. *Conditions for nonnegative independent component analysis*. *IEEE Signal Processing Letters*, vol. 9, no. 6, pages 177–180, 2002.
- [Plumbley 3] M. D. Plumbley. *Algorithms for nonnegative independent component analysis*. *IEEE Transactions on Neural Networks*, vol. 14, no. 3, pages 534–543, 2003.
- [Plumbley 4] M. D. Plumbley. *Optimization using Fourier expansion over a geodesic for non-negative ICA*. *Independent Component Analysis and Blind Signal Separation*, vol. 3195, pages 49–56, 2004. 5th International Conference on Independent Component Analysis and Blind Signal Separation (ICA).
- [Pu 09] Y. Pu, W. B. Wang, B. B. Das & R. R. Alfano. *Time-resolved spectral wing emission kinetics and optical imaging of human cancerous and normal prostate tissues*. *Optics Communications*, vol. 282, no. 21, pages 4308–4314, 2009.
- [Puigt 5] M. Puigt & Y. Deville. *Time-frequency ratio-based blind separation methods for attenuated and time-delayed sources*. *Mechanical Systems and Signal Processing*, vol. 19, no. 6, pages 1348–1379, 2005.

- [Razkin 06] J. Razkin, V. Josserand, D. Boturyn, Z. Jin, P. Dumy, M. Favrot, J. L. Coll & I. Texier. *Activatable fluorescent probes for tumour-targeting imaging in live mice*. ChemMedChem, vol. 1, no. 10, pages 1069–1072, 2006.
- [Rodet 09] T. Rodet, F. Orieux, J.-F. Giovannelli & A. Abergel. *Data inversion for hyperspectral objects in astronomy*. 2009.
- [Rudin 03] M. Rudin & R. Weissleder. *Molecular imaging in drug discovery and development*. Nature reviews drug discovery, vol. 2, no. 2, pages 123–131, 2003.
- [Sajda 03] P. Sajda, S. Du & T. Brown. *Recovery of constituent spectra in 3d chemical shift imaging using Nonnegative Matrix Factorization*. Proceedings of SPIE, Wavelets : Applications in Signal and Image Processing, vol. 5207, pages 321–331, 2003.
- [Sajda 04] P. Sajda, S. Du, T. R. Brown, R. Stoyanova, D. C. Shungu, X. Mao & L. C. Parra. *Nonnegative matrix factorization for rapid recovery of constituent spectra in magnetic resonance chemical shift imaging of the brain*. IEEE transactions on medical imaging, vol. 23, no. 12, pages 1453–1465, 2004.
- [Saxena 03] V. Saxena, M. Sadoqi & J. Shao. *Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution*. Journal of pharmaceutical sciences, vol. 92, no. 10, 2003.
- [Schottelius 09] M. Schottelius, B. Laufer, H. Kessler & H.-J. Wester. *Ligands for Mapping alpha(v)beta(3)-Integrin Expression in Vivo*. Accounts of Chemical Research, vol. 42, no. 7, pages 969–980, 2009.
- [Schrading 08] S. Schrading & C.-K. Kuhl. *Mammographic, US, and MR imaging phenotypes of familial breast cancer*. Radiology, vol. 246, no. 1, pages 58–70, 2008.
- [Smaragdis 7] P. Smaragdis. *Convolutional speech bases and their application to supervised speech separation*. IEEE Transactions on audio speech and language processing, vol. 15, pages 1–12, 2007.
- [Soubret 06] A. Soubret & V. Ntziachristos. *Fluorescence molecular tomography in the presence of background fluorescence*. Physics in Medicine and Biology, vol. 51, no. 16, pages 3983–4001, 2006.
- [Texier 09] I. Texier, M. Goutayer, A. Da Silva, L. Guyon, N. Djaker, V. Josserand, E. Neumann, J. Bibette & F. Vinet. *Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging*. Journal of Biomedical Optics, vol. 14, no. 5, 2009.
- [Troy 04] T. Troy, D. Jekic-McMullen, L. Sambucetti & B. Rice. *Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models*. Molecular Imaging, vol. 3, no. 1, pages 9–23, 2004.

- [Tuchin 07] V.-V. Tuchin. *Tissue optics : Light scattering methods and instruments for medical diagnosis*. SPIE Press, 2007.
- [Urano 08] Y. Urano, D. Asanuma, Y. Hama, Y. Koyama, T. Barrett, M. Kamiya, T. Nagano, T. Watanabe, A. Hasegawa, P. L. Choyke *et al.* *Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes*. *Nature medicine*, vol. 15, no. 1, pages 104–109, 2008.
- [Vandelest 95] C. Vandelest, E. Versteeg, J. H. Veerkamp & T. H. Vankuppevelt. *Elimination of autofluorescence in immunofluorescence microscopy with digital image-processing*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 43, no. 7, pages 727–730, 1995.
- [Villa 09] A. Villa, J. Chanussot, C. Jutten, J. A. Benediktsson & S. Mousaoui. *On the use of ICA for hyperspectral image analysis*. In *IEEE IGARSS - International Geoscience and Remote Sensing Symposium*, page CD rom proceedings, 2009.
- [Vrabie 04] V. D. Vrabie, J. I. Mars & J. L. Lacoume. *Modified singular value decomposition by means of independent component analysis*. *Signal Processing*, vol. 84, no. 3, pages 645 – 652, 2004.
- [Vrabie 06] V. Vrabie, N. Lebihan & J. I. Mars. *Multicomponent wave separation using HOSVD-Unimodal ICA subspace Method*. *Geophysics*, vol. 71, no. 5, pages V133–V143, 2006.
- [Wagnières 98] GA Wagnières, WM Star & BC Wilson. *In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications*. *Photochemistry and photobiology*, vol. 68, no. 5, page 603, 1998.
- [Washizawa 6] Y. Washizawa & A. Cichocki. *On-line K-plane clustering learning algorithm for sparse component analysis*. *IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing*, vol. 1, no. 13, pages 5539–5542, 2006. 31st IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing, Toulouse, FRANCE, MAY 14-19, 2006.
- [Weagle 88] G. Weagle, P. E. Paterson, J. Kennedy & R. Pottier. *The nature of the chromophore responsible for naturally occurring fluorescence in mouse skin*. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B : Biology*, vol. 2, pages 313–320, 1988.
- [Weissleder 99] R. Weissleder, C. H. Tung, U. Mahmood & A. Bogdanov. *In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes*. *Nature biotechnology*, vol. 17, pages 375–378, 1999.
- [Wood 08] D. Wood, G. Feke, D. Vizard & R. Papineni. *Refining epifluorescence imaging and analysis with automated multiple-band flat-field correction*. *Rapport technique, Nature methods*, 2008.
- [Xu 03] W. Xu, X. Liu & Y. Gong. *Document clustering based on non-negative matrix factorization*. In *Proceedings of the 26th annual*

international ACM SIGIR conference on Research and development in informaion retrieval, pages 267–273, 2003.

- [Xu 08] H. Xu, C. Kuo & B. Rice. *Improved Sensitivity by Applying Spectral Unmixing Prior to Fluorescent Tomography*. Proceeding to Biomedical Optics BIOMED, page paper BMC1, 2008.
- [Xu 09] H. Xu & B. W. Rice. *In-vivo fluorescence imaging with a multivariate curve resolution spectral unmixing technique*. Journal of Biomedical Optics, vol. 14, no. 6, page 064011, 2009.
- [Yuan 04] B.-H. Yuan, N.-G. Chen & Q. Zhu. *Emission and absorption properties of indocyanine green in Intralipid solution*. Journal of Biomedical Optics, vol. 9, no. 3, pages 497–503, 2004.