

# Tomographie optique diffuse de fluorescence de la souris

L. Hervé, A. Koenig, A. Da Silva, M. Berger, J. Boutet, J.M. Dinten, P. Peltié, P. Rizo

LETI-CEA Minatec, Département micro Technologies pour la Biologie et la Santé (DTBS), Grenoble

Lionel.herve@cea.fr

**Résumé** – Nous développons au CEA-LETI un tomographe optique de fluorescence pour petits animaux afin de caractériser de façon non invasive, les tumeurs marquées par un fluorophore. Comme les tissus biologiques ont des caractéristiques optiques très diverses, la reconstruction de la fluorescence nécessite la prise en compte des variations de coefficients optiques dans le milieu traversé. Ceci est réalisé par une reconstruction d'une carte des inhomogénéités optiques à partir des mesures d'excitation précédant la reconstruction de la distribution de fluorescence. Une campagne de validation sur fantôme montre, en accord avec des simulations, que les reconstructions de la fluorescence sont améliorées quantitativement et qualitativement lorsqu'on corrige des inhomogénéités optiques. Enfin, nous montrons que la méthode peut être utilisée pour le suivi du développement du cancer des poumons d'une souris.

**Abstract** – An optical fluorescence tomographer is being developed in the CEA-LETI in order to non invasively characterize tumors targeted by a fluorescence marker on living small animals. As biological tissues optical properties are highly heterogeneous, accurate fluorescence reconstructions must take them into account. It is achieved by reconstructing an optical heterogeneity map from the excitation measurements before doing the actual fluorescence distribution reconstruction. Validation experiments performed on a phantom show, accordingly to simulations, that the fluorescence reconstructions are improved quantitatively and qualitatively when the optical heterogeneity is taken into account. A follow up of lungs tumors of a living mouse shows the ability of the method to be applied for oncological studies.

## 1. Introduction

La tomographie optique de fluorescence dans les milieux diffus est une méthode qui permet d'obtenir des mesures fonctionnelles à faible coût sur les petits animaux [1]. Cette méthode consiste à injecter une molécule fluorescente fonctionnalisée pour cibler des cellules d'intérêt (typiquement des cellules cancéreuses), à acquérir des mesures optiques de transmission et de fluorescence, puis à reconstruire la distribution de fluorophores afin de localiser les cellules cancéreuses et de quantifier leur activité.

Comme les constituants biologiques ont des propriétés optiques très variées [2], la dynamique des signaux optiques mesurés dépend fortement de la nature des tissus traversés par la lumière. Le système doit donc être corrigé de ces hétérogénéités pour obtenir des reconstructions de la fluorescence justes. À partir de signaux optiques acquis en illumination continue (i.e non impulsionnelle, ni modulée en fréquence), la technique classique de correction consiste en la normalisation des signaux de fluorescence par les signaux d'excitation [3] (normalisation de Born) et à alors reconstruire comme si le milieu était homogène.

Dans notre laboratoire, nous avons développé un tomographe optique associé à une algorithmie de reconstruction qui prend en compte les inhomogénéités des tissus dans le modèle de propagation de la lumière [4]. Dans cet article, nous expliciterons cette méthode et

montrons qu'elle permet d'améliorer la qualité de la reconstruction. Pour cela, nous détaillerons d'abord la physique du système (modèle de propagation de la lumière et génération des signaux de détection), montrerons le principe de la reconstruction dans des milieux diffus homogènes, puis expliquerons comment cette méthode est corrigée lorsque le milieu sondé a des propriétés optiques hétérogènes. Ensuite, nous présentons des validations expérimentales sur fantôme et souris puis concluons.

## 2. Théorie

### 2.1 Propagation de la lumière dans le milieu et détection

La technique de tomographie optique de fluorescence [5] consiste en l'illumination du milieu sondé par un laser infrarouge (690nm) qui balaie une face de l'animal étudié et qui va exciter les marqueurs. Pour chaque position du laser, les signaux de fluorescence (780nm) et d'excitation sont mesurés en sortie du milieu (face opposée aux sources) par une caméra CCD.

Au vu des caractéristiques des matériaux biologiques dans la gamme de longueurs d'onde considérée, la propagation de la lumière est modélisée par l'équation de diffusion de Helmholtz (1) [6]:

$$(\nabla^2 + k^2(\mathbf{r}))\Phi(\mathbf{r}) = -S(\mathbf{r}) \quad (1)$$

où  $\mathbf{r}$  est la position dans le milieu,  $\Phi$  est la densité de photon,  $S$  est le terme source et  $k^2$  est la carte des hétérogénéités optiques qui caractérise l'atténuation de l'onde lumineuse dans le milieu.

Étant donnée une carte d'hétérogénéités optiques, la résolution de (1) permet de calculer les fonctions de Green  $G(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$  du système qui donnent le flux en  $\mathbf{r}_2$  lorsqu'une source fonction de Dirac est utilisée en  $\mathbf{r}_1$ . Comme on le précisera dans la suite de cet article, nous n'avons besoin que d'un sous ensemble de fonctions  $G$ ,  $\{G(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_m), G(\mathbf{r}_m, \mathbf{r}_d), G(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d)\}$  où  $\mathbf{r}_s$  est la position de la  $s^{\text{ième}}$  source,  $\mathbf{r}_d$  est la position de la  $d^{\text{ième}}$  source et  $\mathbf{r}_m$  est la position de la  $m^{\text{ième}}$  maille du volume discrétisé considéré. Pour calculer ces valeurs de  $G$ , (1) est résolue par la méthode des différences finies pour chacune des positions de sources et de détecteurs. L'opérateur  $(\nabla^2 + k^2(\mathbf{r}))$  s'écrivant comme une matrice creuse avec 7 bandes est décomposé suivant la méthode  $L^*U$  ( $L$  étant une matrice triangulaire basse et  $U$  une matrice triangulaire haute) pour accélérer la résolution des systèmes d'équations. Pour 100 sources, 400 détecteurs et un volume discrétisé en 6000 éléments, le temps typique d'obtention du sous ensemble utile de fonctions  $G$  est typiquement de 10s sur un PC biprocesseur cadencé à 3GHz.

Avec les notations introduite ci-dessus, le signal d'excitation mesuré vaut  $U_{sd}^{ex} = \lambda G(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d)$ ,  $\lambda$  étant un facteur photométrique dépendant de la puissance laser et de l'efficacité de détection. Le signal de fluorescence pour cette même configuration source-détecteur et pour une distribution 3D d'efficacité de fluorescence  $X$  est :

$$U_{sd}^{fl} = \lambda \int_{\Omega} G(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}) X(\mathbf{r}) G(\mathbf{r}, \mathbf{r}_d) d\mathbf{r} \quad (2)$$

## 2.2 Reconstruction dans des milieux homogènes ou faiblement hétérogènes

Lorsque les propriétés optiques du milieu ne sont pas fortement hétérogènes comme dans le cas d'expériences sur certains fantômes, le modèle de propagation est calculé en prenant  $k^2(r)$  constant. Dans le cas de géométries simples (cylindres, parallélépipèdes, ...), on peut exprimer la fonction de Green grâce à une formule analytique. Sinon, on l'obtient en résolvant (1) numériquement. La reconstruction est corrigée des inhomogénéités en normalisant les mesures de fluorescence par les mesures d'excitation. La reconstruction de la fluorescence est ainsi obtenue en inversant le système discrétisé d'équations linéaires suivant (où  $m$  est un indice sur la position du maillage et  $\Delta V$  est le volume élémentaire):

$$\frac{U_{sd}^{fl}}{U_{sd}^{ex}} = \sum_m \frac{G(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_m) X(\mathbf{r}_m) G(\mathbf{r}_m, \mathbf{r}_d)}{G(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d)} \Delta V \quad (3)$$

## 2.3 Reconstruction dans le cas de milieu fortement inhomogène

Lorsque le milieu est fortement inhomogène, comme dans le cas des tissus biologiques, l'approche explicitée précédemment mène à des erreurs qualitatives et quantitatives sur les reconstructions de la fluorescence. Ainsi, pour améliorer cette reconstruction dans le cas des petits animaux, nous proposons de reconstruire la carte d'hétérogénéités optiques,  $k^2(r)$ , avant de reconstruire la fluorescence. Pour ce faire, nous utilisons la formule de Rytov :

$$\log\left(\frac{U_{sd}^{ex}}{\lambda G(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d)}\right) \approx - \frac{\sum_m G(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_m) (K_m^2 - k_m^2) G(\mathbf{r}_m, \mathbf{r}_d)}{G(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d)} \Delta V \quad (4)$$

où  $k^2$  est la carte des hétérogénéités optiques courante,  $K^2$  est celle du milieu réel,  $G$  est la fonction de Green obtenue à partir de  $k^2$ , et  $U_{sd}^{ex}$  est le signal d'excitation mesuré pour la position de source  $s$  et de détecteur  $d$ .

Comme  $G$  est fonction de  $k^2$ , le système (4) n'est pas linéaire. Sa résolution demande la mise à jour des fonctions  $G$  au cours du processus de résolution. Le schéma "à bascule" suivant est proposé: 1) on se donne une carte  $k^2$  initiale (celle constante qui minimise  $\varepsilon = \|U_{sd}^{ex} - \lambda G(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d)\|$ ), 2) on calcule la fonction  $G$  du système en résolvant numériquement (1), 3) les fonctions  $G$  étant tenues constantes, on résout en  $k^2$  le système linéaire (4) par ART (Algebraic Reconstruction Technique, 5 itérations avec un paramètre de relaxation fixé à 0,1) puis on repart de 2). En réitérant les étapes 2) et 3) une dizaine de fois, on observe une convergence de la carte reconstruite. Cela conduit à un temps de reconstruction des hétérogénéités optiques d'environ 10 minutes sur un PC biprocesseur cadencé à 3GHz.

Une fois la carte des hétérogénéités optiques obtenue, la reconstruction de la fluorescence s'obtient par l'inversion du système d'équation linéaire (3) ou (5):

$$U_{sd}^{fl} = \lambda \sum_m G(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_m) X(\mathbf{r}_m) G(\mathbf{r}_m, \mathbf{r}_d) \Delta V \quad (5)$$

Dans notre implémentation, cette reconstruction s'obtient par 15 itérations d'ART avec un paramètre de relaxation fixé à 0.1 et dure typiquement 1 minute.

## 3. Validations expérimentales

### 3.1 Validations sur fantôme

L'approche présentée a été validée sur un fantôme (fig 1) présentant des similarités avec le cas d'un examen sur poumons cancéreux de souris de part les caractéristiques suivantes: propriétés optiques du matériau (atténuation linéique  $\mu_a = 0.16 \text{ cm}^{-1}$ , coefficient de diffusion réduit  $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$ , correspondant à  $k^2 \approx 5 \text{ cm}^{-2}$ ), épaisseur totale de 15 mm et présence d'une région (cylindre creusé et rempli d'une solution d'Intralipid, d'encre et de fluorophores) fluorescente et très atténuante  $k^2 = 60 \text{ cm}^{-2}$ .

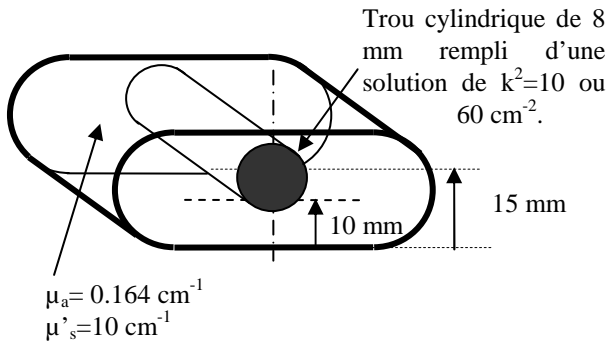


Figure 1 : Description du fantôme utilisé pour la validation expérimentale. Son épaisseur (15mm) et ses coefficients optiques sont proches de ceux d'un petit animal. Il possède une région atténuante (ou non) et fluorescente.

Les figures 2 et 3 présentent les reconstructions de la fluorescence du cylindre lorsque l'on utilise la méthode de correction des hétérogénéités exposée dans cet article (figure 2) ou lorsque l'on n'effectue pas cette correction (utilisation de la formule (3) avec des fonctions de Green « homogènes », figure 3).

Du point de vue qualitatif, si l'on compare le diamètre et la régularité de la reconstruction du cylindre fluorescent, on voit que la méthode corrigée (figure 2) produit des reconstructions de meilleure qualité que ceux de la méthode de normalisation de Born. Du point de vue quantitatif, nous avons étudié la somme de la fluorescence reconstruite suivant la solution utilisée pour remplir le trou cylindrique et suivant la méthode de correction. Sur la figure 4, les quatre points isolés montrent que la fluorescence reconstruite dépend moins de l'atténuation du cylindre dans le cas où la propagation de la lumière est corrigée. Ces résultats sont confortés par des simulations dans les mêmes conditions (géométrie du fantôme, géométrie de l'acquisition, caractéristiques optiques des matériaux, paramètres de reconstruction) qui montrent l'évolution des résultats de reconstruction en fonction de l'atténuation du cylindre et de la méthode de correction employée (en trait plein).

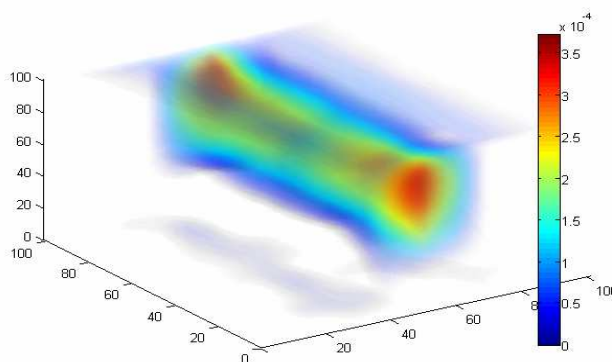


Figure 2 : Reconstruction de la fluorescence avec la méthode corrigée dans le cas où le cylindre est rempli d'atténuant.

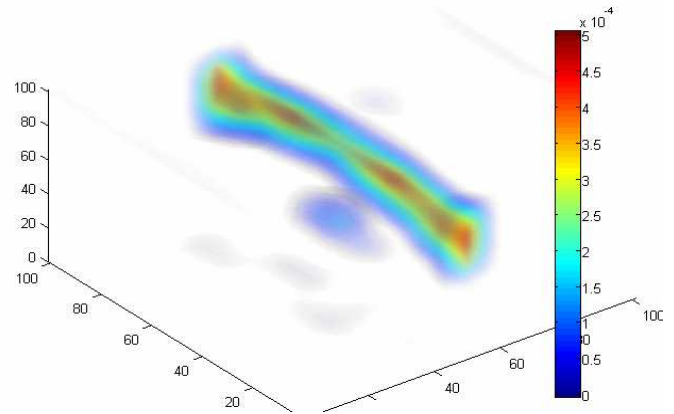


Figure 3 : Reconstruction de la fluorescence dans le cas non corrigé et où le cylindre est rempli d'atténuant.

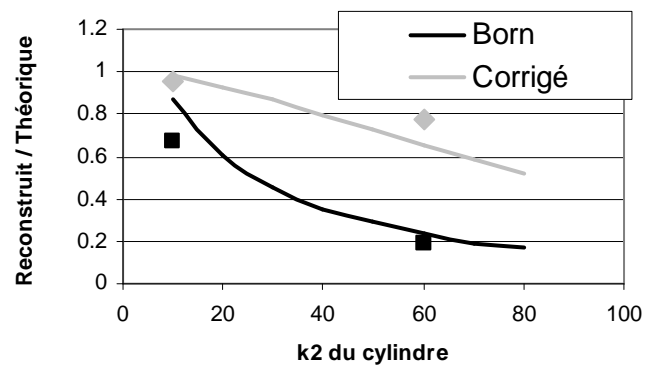


Figure 4 : Résultats quantitatifs des reconstructions dans le cas de l'utilisation de la méthode corrigée ou non avec la région fluorescente atténuante ou non. Valeurs simulées (courbes) et valeurs expérimentales (points)

### 3.2 Validation sur souris

Finalement, nous avons effectué un examen sur une souris du type « nude » malade d'un cancer des poumons à 10, 12 et 14 jours après greffage du cancer.

Les cellules cancéreuses ( $10^6$  de cellules TSA/pc dans 100  $\mu$ l PBS) sont injectées en intraveineuse par la veine caudale 10 jours avant l'examen. Pour effectuer l'examen, la souris est anesthésiée par voie gazeuse et placée dans un support où elle est maintenue entre deux plaques de verre. Au préalable (3 heures avant acquisition des images), la souris est injectée d'un marqueur de cancer fluorescent (injection intraveineuse de 10 nmoles de RAFT-(cRGD)<sub>4</sub>-Alexa700) (200  $\mu$ l). Ce marqueur est connu pour reconnaître le récepteur « integrin  $\alpha_v\beta_3$  » surexprimé dans les cellules TSA/pc [7]. La zone scannée fait à peu près 2cm<sup>2</sup> et est centrée sur les poumons. Les images sont acquises au pas de 2 mm en x et y. Pour les reconstructions, seuls les détecteurs en contact avec la plaque supérieure du support sont utilisés. Le volume de reconstruction est échantillonné au pas de 2 mm en x et y et de 1 mm en z, ce qui représente à peu près un volume de 11x11x14 voxels.

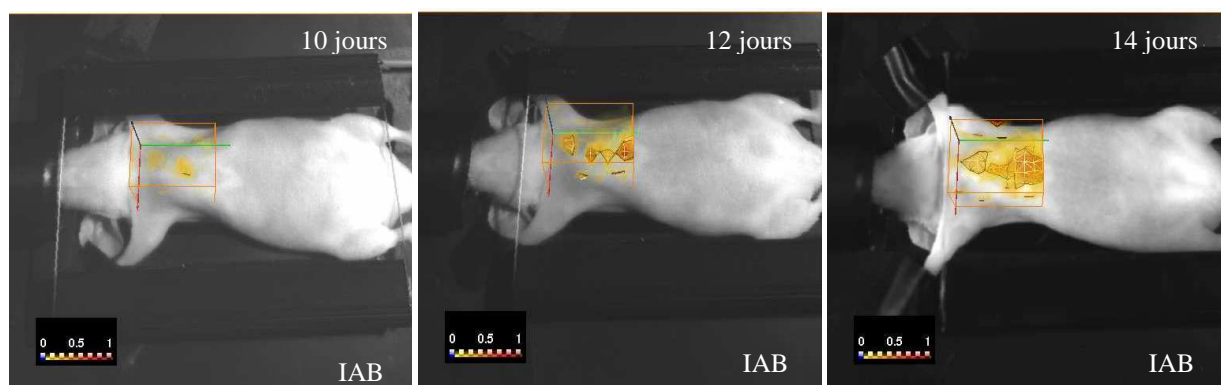


Figure 5 : Reconstruction 3D de la fluorescence superposée à la photographie de la souris. à 10, 12 et 14 jours après greffage du cancer.

La méthode corrigée est bien adaptée à ce cas car les poumons marqués sont des régions à la fois très atténuantes, inhomogènes et fluorescentes. Sur la figure 4, on voit que la fluorescence reconstruite augmente bien avec le développement du cancer et que la méthode permet de suivre son évolution. Les volumes reconstruits sont superposés à l'image de blanc de la souris et présentés dans la même dynamique.

Nous avons vérifié sur trois souris saines issues du même modèle injectées deux fois avec le marqueur fluorescent à deux jours d'intervalle que l'injection multiple ne provoquait pas l'accroissement de la fluorescence détectée. L'accroissement observé sur la souris malade est donc bien dû à des raisons biologiques. De plus la quantité de fluorescence reconstruite pour une souris saine est à peu près deux fois moindre que pour une souris malade à 10 jours.

L'observation des poumons après dissection de la souris malade confirme bien le développement d'un cancer dans la zone pumorale.

#### 4. Conclusion

Nous avons présenté un algorithme adapté à la reconstruction de la fluorescence dans des milieux diffus de propriétés optiques fortement hétérogènes. Des validations expérimentales sur fantôme montrent l'impact de cette correction sur la reconstruction de la fluorescence. Enfin, nous avons montré comment cette technique s'applique sur la mesure du développement du cancer du poumon chez la souris.

#### Remerciements

Nous remercions V. Josserand de Animage (Bron, France) pour avoir préparé et assuré les expérimentations animales.

Ce travail a été en partie financé par le Cancéropôle CLARA, la RTB et l'ANR.

#### Références

- [1] R. Weissleder, V. Ntziachristos, « Shedding light onto live molecular targets », *Nature Medicine* 9(1), 123-128 (2003).
- [2] W. F. Cheong, S. A. Prahl, and A. J. Welch, « A Review of the Optical Properties of Biological Tissues », *IEEE J. Quantum Electronics* 26, 2166-2185 (1990)
- [3] A. Soubret, J. Ripoll, V. Ntziachristos, « Accuracy of fluorescent tomography in presence of heterogeneities: Study of the normalized Born ratio », *IEEE Med. Imag.* 24(10), 1369-1376 (2005).
- [4] L. Hervé, A. Koenig, A. Da Silva, M. Berger, J. Boutet, J.-M. Dinten, P. Peltié, P. Rizo, « Non Contact Fluorescence Diffuse Optical Tomography of Heterogeneous Media, Applied optics », en impression
- [5] V. Ntziachristos, R. Weissleder, « Experimental three-dimensional fluorescence reconstruction of diffuse media by use of a normalized Born approximation », *Optics Letters* 26(12), 893-895 (2001).
- [6] S R Arridge, « Optical tomography in medical imaging », *Inverse Problems* 15, R41-R93 (1999).
- [7] D. Boturyn, J.-L. Coll, E. Garanger, MC Favrot, P. Dumy, « Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis », *J Am Chem Soc*, 126(18), pp5730-9, May 2004.
- [8] A. Koenig, L. Hervé, Lionel, A. da Silva, J.-M. Dinten, J. Boutet, M. Berger, I. Texier, P. Peltié, P. Rizo, V. Josserand, J.-L. Coll, « Whole body small animal examination with a diffuse optical tomography instrument », *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 571 (1-2) 56-59, 2007