

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de
Docteur *es Science* de l'École Polytechnique
Spécialité : Physique

Par

Tal Jacob MARCIANO

**Étude de la transparence et de la perte de
transparence du tissu cornéen sain et
œdémateux et de l'interaction laser-tissu**

Jury composé de:

Émmanuel Beurepaire

Rémi Carminati

Benoît C.Forget

Philippe Gain

Pierre Marquet

Karsten Plamann

Stélios Tzortzakis

rapporteur

rapporteur

directeur de thèse

Préparée au

Laboratoire d'Optique Appliquée UMR 7605

« Le temps met tout en lumière », Thalès
"Nul ne saurait par temps devenir sage, s'il l'eût été dès l'abord
tout a fait : Quel artisan fut donc maître parfait, du premier
jour de son apprentissage ?", Guy du Faur de Pibrac

REMERCIEMENTS

Un travail de doctorat nécessite du temps, de la patience, de la détermination, de la passion. C'est une expérience unique. Chaque doctorat est une expérience unique. Il s'agit d'une rencontre entre un sujet ou une problématique scientifique, et des personnes. Différentes subjectivités, personnalités, sensibilités s'accordent pour construire un travail scientifique objectif et reconnu. La thèse est une vocation souvent murie pendant un master et dans laquelle on se lance avec fraîcheur, ambition, volonté. La thèse peut être également une épreuve parsemée d'obstacles divers. Mais la plupart du temps, on a la chance de faire la rencontre de quelques scientifiques et chercheurs de grande qualité qui conçoivent la science comme une vocation davantage que comme un simple métier, et qui contribuent à ce que cette expérience soit vécue comme un épanouissement et non une tâche. C'est alors seulement qu'on peut éprouver la satisfaction d'avoir contribué à sa mesure à la noble cause de la Science. J'ai la chance et le privilège d'avoir vécu cela, et je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes à qui je le dois, et que je nomme ici.

Je souhaite remercier d'abord Pierre Marquet et Philippe Gain qui me font l'honneur d'avoir accepté d'être mes rapporteurs pour ce travail de thèse. Je remercie chaleureusement tous les membres du Jury : Benoît Forget, Stelios Tzortzakis, Rémi Carminati, et Emmanuel Beaufrepaire, Karsten Plamann.

Je remercie particulièrement l'entreprise AXA et le fond international AXA pour la recherche pour la confiance dont ils ont fait preuve en m'accordant leur prestigieuse bourse de doctorat, ainsi que pour l'attention toute particulière qu'ils m'ont portée depuis l'obtention de la bourse et jusqu'à ce jour.

Je remercie également l'Ecole Doctorale de l'Ecole Polytechnique pour la bourse de doctorat qu'ils m'ont également accordée. Je remercie tous les membres de l'Ecole doctorale pour leur disponibilité, leur bienveillance, leur amabilité, leur humanité, et tout particulièrement Pierre Legrain son actuel directeur.

Je remercie mon directeur de thèse Karsten Plamann pour m'avoir accueilli dans son groupe et proposé de travailler sur un sujet pluridisciplinaire axé sur le champ biomédical qui m'est si cher. Je le remercie de m'avoir proposé durant ma thèse les différents projets et diverses collaborations extérieures tout en m'accordant une grande liberté scientifique.

Je remercie Benoît Forget de l'Université de Paris Descartes, pour les précieuses discussions scientifiques. Je le remercie surtout de m'avoir proposé de travailler sur l'holographie numérique et donné les moyens de le faire. Je le remercie également pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Je remercie tous les membres passés et présents du groupe. Donald Peyrot avant tout, qui m'a appris la manipulation du tissu et fait découvrir les sujets de recherche du groupe. Je le remercie pour les précieux et subtils conseils qu'il m'a prodigués après son départ du groupe et qui m'auront été utiles tout le long de cette thèse. Je remercie les anciens doctorant Florent Deloison et Caroline Crotti. Je remercie les anciens stagiaires du groupe Marie Cardinet, Maryam Al-Gabandi, Isabelle Tang, Imane Aloulou. Ce fut un plaisir de travailler avec eux, de les connaître. J'ai eu la chance d'encadrer le stage de certain d'entre eux, ce qui fut une expérience très agréable et enrichissante.

Je remercie Asad Hussain, dernier arrivé en date dans le groupe. Je suis certain que nous continuerons à échanger et discuter de nos idées et impressions par la suite quelque soit l'endroit où chacun de nous se trouvera. Bonne chance pour la suite et merci !

Je remercie Fatima Alahyane, ingénieur informatique du groupe pour sa disponibilité, sa bonne humeur en toute circonstance, son aide dans les programmes Labview, sa relecture du manuscrit.

Je remercie toutes les personnes de la cellule et de la mécanique et particulièrement Jean-Lou Charlie pour toutes les pièces et porte-échantillons construits, pour son amitié et sa gentillesse.

Je remercie Gaëlle Georges et Olivier Casadessus de l'Institut Fresnel. Des résultats importants de cette thèse ont été obtenus grâce à une collaboration avec eux. J'ai passé à Marseille un excellent moment et le travail avec eux a été non seulement productif mais également très agréable.

Je remercie Stelios Tzortzakis et Dimitris Papazoglou pour m'avoir reçu dans leur laboratoire à l'Institut de FORTH à Héraklion en Grèce. Le projet Laserlab que j'ai obtenu m'a permis d'utiliser leur dispositif d'holographie numérique en ligne pour étudier l'interaction laser-tissu. Je les remercie tous deux pour cette fructueuse collaboration, et pour leur implication permanente et active. J'ai découvert des scientifiques d'une très grande compétence et d'une grande simplicité. J'en garde un excellent souvenir.

Je remercie la Banque Française des Yeux pour toutes les cornées qu'elle nous a fournies, et particulièrement Isabelle Sourati pour sa gentillesse.

Je remercie Florent Aptel du Service d'Ophtalmologie CHU de Grenoble qui m'a permis d'assister à ses interventions chirurgicales de grande qualité au bloc opératoire. Je le remercie pour sa disponibilité à chaque fois que la demande en a été faite, et particulièrement je le remercie d'avoir relu certains des chapitres du manuscrit.

Je remercie très chaleureusement Michelle Savoldelli de l'Hotel Dieu qui, dans la bonne humeur, et surtout avec un très grand talent, nous a fourni les coupes histologiques et les images de microscopie électronique de cornées que nous avons étudiées. La collaboration avec Michelle a été non seulement particulièrement agréable et enrichissante, mais également essentielle à la compréhension et à l'analyse des phénomènes étudiés. Je lui dois une très grande partie des connaissances que j'ai pu acquérir sur la cornée humaine. Je la remercie également pour sa relecture attentive et très bénéfique de mon manuscrit de thèse, et pour tous les échanges constructifs que nous avons eus. Son enthousiasme communicatif en ce qui concerne la cornée est un vrai plaisir et un réel moteur.

Mes remerciements vont également à Jean-Marc Legeais de l'Hôpital Hôtel-Dieu à Paris pour avoir financé en partie mon voyage à la conférence ARVO aux Etats-Unis, pour

son intérêt à nos recherches et pour m'avoir invité à présenter mes recherches aux journées de la Cornée de l'Hôtel-Dieu.

Avec la soumission de cette thèse, c'est tout un parcours d'études universitaires qui s'achève. Je ne peux terminer celui-ci sans avoir une pensée pour toutes les personnes, les enseignants, les professeurs, que j'ai connus depuis mon enfance et qui par leur pédagogie, leur intelligence, leur culture, leur humanité, et plus que tout leur ouverture d'esprit, m'ont inspiré et donné le goût de l'étude, de la lecture, des sciences et de la recherche. Il est impossible de tous les nommer, mais de tous j'ai appris, et de tous je me souviens.

Les rapports humains, les rencontres et les inspirations qu'elles provoquent ne peuvent être négligés dans la réussite d'une thèse et je tiens à pleinement y associer toutes ces personnes susnommées à qui je dois aujourd'hui ce manuscrit.

Mais plus que tout, je tiens à remercier mes proches, amis et familles qui m'ont toujours soutenu, encouragé, et qui me comblent de bonheur au quotidien.

Mes amis, Johan, Ron, Harel, Sharon, David et les autres avec qui nous partageons tant !

Ma belle famille, ma belle sœur Sandra, mes beaux parents Robert et Denise Abitbol qui m'ont accueilli si spontanément dans leur famille comme un fils, qui m'ont soutenu pendant toute cette période et offert le plus beau cadeau : la main de leur fille Lise.

Mes très chères sœurs, Dana et Elinor, mon beau frère Gad, mes neveux Sacha et Lior pour leur présence, leur amour, leur complicité, leurs encouragements, leur confiance, leur intérêt et leur bienveillance. Pour tout ce qu'ils sont et représentent pour moi, et tout ce qu'ils m'ont apporté, je les remercie profondément.

Mes très chers parents, David et Sarah Marciano. Je ne saurais jamais écrire en quelques lignes ce que je leur dois, ce qu'ils m'ont apporté et continuent d'apporter. Ma plus grande frustration est la conscience de ne jamais pouvoir le leur rendre. Pour l'éducation et les valeurs qu'ils m'ont transmises, pour la confiance qu'ils m'ont toujours accordée, et le modèle qu'ils ont toujours constitué à mes yeux, je les remercie. Ils m'ont appris ce qu'aucune institution ne saurait faire. Ils m'ont donné le goût de l'étude, qu'ils ont toujours placé au

dessus de toute chose. Leur ouverture d'esprit, leur sensibilité, leur intelligence et la subtilité de leur être ne sont pas des qualités que l'on retrouve si naturellement réunies chez une même personne et j'ai conscience de la chance de les avoir comme parents, car je sais bien à mon âge que rien ne va de soi.

Ma très chère femme Lise. Notre mariage, est de loin ma plus belle réussite pendant cette thèse, et ma plus grande fierté. Lise m'a constamment soutenu. Plus que quiconque, elle a partagé au quotidien mes succès, mes joies, mais aussi mes difficultés, mes craintes et mes doutes pendant la durée de ce doctorat. Sa présence, son amour, m'ont permis de traverser tout cela avec sérénité et confiance. En partageant avec moi son amour de la science mais aussi de la littérature, de la musique, du cinéma, et de la pensée juive, elle constitue pour moi une source permanente d'épanouissement et une joie de tous les instants. Ces trois années, je le sais, n'ont pas toujours été faciles pour elle. Je la remercie pour sa patience et son courage. Avec ses encouragements, ses conseils, son écoute dénuée de préjugés mais pleine d'amour, elle a rempli un rôle central dans la réussite et l'accomplissement de cette thèse. Je la remercie pour tout ce qu'elle est car sans elle rien n'aurait été possible. Pour tout cela, je lui dédie cette thèse.

Sommaire

Remerciements	
Introduction	13
CHAPITRE I : Anatomie et fonction du segment antérieur de l'œil humain	21
1. Anatomie générale de l'œil	22
2. L'œil humain	23
2.1 Segment postérieur de l'œil	25
2.1.1 La membrane hyaloïde	25
2.1.2 L'humeur vitrée	25
2.1.3 La choroïde	26
2.1.4 La rétine	26
2.1.5 La sclère	27
2.2 Segment antérieur de l'œil	28
2.2.1 La cornée	29
2.2.2 L'iris	33
2.2.3 L'humeur aqueuse	33
2.2.4 Le cristallin	33
CHAPITRE II : Étude de la transparence cornéenne	37
1. Transparence cornéenne : État de l'art	38
1.1 Les différentes théories basées sur l'uniformité de l'indice de réfraction	39
1.1.1 Uniformité de l'indice de réfraction	39
1.1.2 Hydratation des fibrilles de collagène	39
1.1.3 Déshydratation du liquide interstitiel	40
1.1.4 Adaptation de l'indice de réfraction	40
1.2 Théorie du réseau cristallin	40
1.2.1 David Maurice	40

1.2.2	Autres théories du réseau cristallin	43
2	Structure de la cornée et diffusion	44
2.1	Ordre et diffusion	44
2.2	La cornée : un liquide photonique ?	48
2.	Imagerie de la cornée saine et œdémateuse	50
3.1	Structure de la cornée saine et œdémateuse	50
3.1.1	Coupes histologiques	52
3.2	Images OCT de cornées claire et œdémateuses	59
4.	Conclusion	60
 CHAPITRE III : Mesure de la diffusion de la cornée		65
1.	Mesures de la transmission directe et totale et calcul de la diffusion du tissu cornéen	66
1.1.	Montage expérimental	66
1.2.	Préparation des échantillons de cornées humaine	69
1.3.	Porte-échantillon	69
1.4.	Résultats	69
2.	Mesures de la figure de diffusion de la cornée par goniométrie	74
2.1.	Protocole expérimental et dispositifs de mesure	75
2.1.1	Préparation des tissus	75
2.1.2.	Goniomètre	75
2.1.3.	OCT	77
2.1.3.	Pachymétrie	78
2.2.	Mesures de diffusion : résultats	79
2.2.1	Espace réfléchi	79
2.2.2	Espace transmis T	82
2.2.2	Espace transmis t	84
2.3	Diffusion totale intégrée	86
2.3.1	Espace réfléchi	86
2.3.2	Espace transmis T	87
2.3.3	Espace transmis t [179°-181°] vers l'avant	89
2.4.	Images OCT: résultats	92

Conclusion	95
-------------------	-----------

CHAPITRE IV : Étude de la perte de cohérence spatiale d'un faisceau transmis à travers des cornées claires et œdémateuses par holographie numérique hors-axe	99
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

1.	Holographie numérique : État de l'art	100		
	1.1	Introduction	100	
	1.2	Technique holographique, évolution	100	
2.	Dispositif	103		
3.	Enregistrement et reconstruction Numérique	105		
	3.1	Enregistrement de l'hologramme	105	
	3.2	Holographie hors-axe et filtrage spatial	106	
	3.3	Filtrage temporel : holographie numérique hétérodyne	107	
		3.3.1. Principe	108	
		3.3.2. Filtrage temporel avec modulateurs acousto-optiques	110	
		3.3.3. Filtrage temporel avec un transducteur piézoélectrique	111	
	3.4.	Filtrage spatial et temporel, traitement numérique	111	
	3.5.	Reconstruction numérique par propagation de Fresnel	114	
	3.6.	Zéro padding	118	
4.	Mesure de la perte de cohérence à travers un milieu faiblement diffusant	121		
	3.1	Etat de l'art	121	
	3.2	Considérations théoriques	121	
	3.3	Résultats expérimentaux sur échantillons diffusants	123	
		3.3.1	Résultats sur Pastis	124
5.	Résultats sur des cornées présentant différents degrés d'œdème	132		
	4.1	Cohérence spatiale du champ diffusé et autocorrélation des fibrilles	132	
	4.2	Porte échantillon	134	

4.3	Résultats	135
	Conclusion	145
	CHAPITRE V : Étude de l'interaction entre un laser à impulsions ultra-brèves et le tissu cornéen	151
1.	Interaction d'un laser à impulsions ultra-brèves avec le tissu	153
1.1	Ionisation induite par un laser femtoseconde	155
1.2	Propagation non-linéaire des impulsions ultra-brèves	158
1.2.1	Effet Kerr	159
1.2.2	Changement d'indice du fait de la génération de plasma	162
1.2.3	Considérations pratiques pour la chirurgie cornéenne	163
2.	Image de la propagation non-linéaire d'une impulsion femtoseconde par holographie numérique	165
2.1	Dispositif d'holographie numérique « En-ligne » pompe-sonde	166
2.2	Traitement numérique	168
3	Résultat obtenus sur une solution de collagène et des cornées de porcs	172
3.1	Solution de collagène	172
3.2	Cornée de porc	177
4	Conclusion	181
	CONCLUSION	185
	ANNEXES	189
	Curriculum Vitae et liste de publications	209

Introduction

Contexte

La population globale, depuis le milieu du vingtième siècle connaît en effet un vieillissement progressif, du fait d'une part de l'allongement de la durée de la vie avec les progrès de la médecine et de la gériatrie, d'autre part du fait du « papy boom ». Ce phénomène est également accentué par une baisse de la natalité (le « baby flap » succède au « baby boom ») du fait du recul progressif de l'âge moyen du premier enfant, de la maternité planifiée grâce à la contraception, de la crise économique, du coût élevé de l'enfant dans une famille, de l'évolution des mœurs et de la société dans son ensemble. L'indice de dépendance (c'est-à-dire le rapport entre la population de moins de 20 ans et de 60 ans et plus et la population dont l'âge est compris entre 20 et 59 ans) est un indicateur de ce phénomène. Cet indice est un peu au dessus de 20% aux États-Unis, autour de 27% pour la zone euro, et 28% pour le Japon. En 2050, l'indice de dépendance sera pour ces zones géographiques, respectivement de 46%, 60% et 70%¹. Si cet effet de vieillissement a de nombreuses raisons, il a également de nombreuses conséquences économiques et sociales. L'ophtalmologie en santé publique se doit de prévenir la cécité, soigner les maladies ophtalmologiques dans cette population de plus en plus vieillissante. Pour les patients aveugles n'ayant pu être guéri, il s'agit de les aider dans leur quotidien afin d'améliorer leur condition de vie. De plus en plus de patients souffrent de pathologies telles que la cataracte, le glaucome, et les nombreuses autres pathologies nécessitant une greffe de cornée. La greffe de cornée par exemple est de loin la greffe de tissu la plus fréquente. En France, 4000 patients en bénéficient chaque année². Dans l'ensemble de l'Union Européenne ce chiffre est de 40 000. Un nombre équivalent de greffe de cornée se fait également aux Etats-Unis. Les indications de greffes de cornée sont le plus souvent dues à une opacification du tissu pouvant être causée par des infections diverses, des traumatismes, ou un dysfonctionnement de l'endothélium. D'autres indications peuvent également exister, comme pour le cas du kératocône. Le groupe Optique-Photonique-Santé (OPS) du Laboratoire d'Optique Appliqué s'intéresse

¹ L'énigme économique posée par une population vieillissante, Robert Ayres pour World Watch Institute, 2005

² Rapport médical et scientifique du prélèvement et de la greffe en France. Agence de biomédecine, 2012.

de près à cette thématique. Depuis plusieurs années, il travaille avec ses différents partenaires industriels, cliniques et académiques à l'élaboration de nouveaux lasers chirurgicaux à impulsions ultra-brèves avec des longueurs d'ondes adaptées aux tissus du segment antérieur de l'œil, et plus particulièrement la cornée aussi bien saine que pathologique. En effet, la plupart des lasers cliniques à impulsions ultra-courtes actuellement sur le marché possèdent des longueurs d'onde centrées autour de 1 μm . Or, lorsqu'ils sont utilisés dans la procédure de greffe de cornée, leur faisceau est fortement atténué par la traversée d'un tissu œdémateux. Afin de réduire cette diffusion optique et augmenter la profondeur de pénétration, le groupe et ses partenaires ont développé des lasers à impulsions femtosecondes centrés à la longueur d'onde de 1,65 μm où les cornées présentent une fenêtre de relative transparence du tissu selon les mesures spectrométriques réalisées. C'est dans ce contexte que j'ai été invité pour mon travail de thèse à étudier de manière plus approfondie la transparence et la perte de transparence du tissu cornéen et certains aspects de l'interaction laser-tissu. Le tissu cornéen est principalement constitué de fibrilles de collagène de diamètre d'une trentaine de nanomètres et d'indice de réfraction supérieur à celui du milieu interstitiel environnant. Ces fibrilles de collagène agissent donc *a priori* comme des diffuseurs de la lumière dans la cornée. Dans le cas de la cornée saine, ces fibrilles de collagène sont organisées selon un certain ordre, ce qui explique la transparence du tissu. La présence d'un œdème provoque une perturbation de cet ordre et induit une perte de transparence du tissu. De plus, avec l'augmentation de l'œdème, on observe l'apparition de zones micrométriques dénuées de fibrilles de collagène que l'on appelle lacs et qui pourraient être à l'origine d'un niveau de diffusion supplémentaire.

Objectifs

Au début de ma thèse, l'état de l'art des connaissances du groupe sur l'optique de la cornée saine et œdémateuse reposait sur certaines considérations théoriques ainsi que sur les résultats d'une méthode de mesure de la transparence spectrale qui permettait de faire une distinction binaire entre les photons non diffusés (restant dans un angle solide réduit proche de l'axe optique), et les photons diffusés. Par cette méthode, une fenêtre de relative transparence optique au sein de laquelle la diffusion est fortement réduite a pu être identifiée. Ces résultats ont permis le développement avec nos partenaires industriels, académiques et cliniques, de nouvelles sources lasers optimisées pour la chirurgie de la cornée. Les résultats des expériences chirurgicales sur tissu ont en effet montré une nette amélioration de la découpe du tissu et de la profondeur de pénétration du faisceau dans le tissu sain et œdémateux.

L'objet principal de ce travail de thèse est d'approfondir l'optique du tissu au-delà des simples considérations nécessaires au développement de nouvelles sources lasers. C'est la première thèse du groupe à s'intéresser à l'optique du tissu.

Les objectifs de la thèse sont :

- La mesure de la figure de diffusion en champ lointain du tissu sain et œdémateux et la caractérisation de la diffusion optique de la cornée ;
- La réalisation d'un dispositif permettant la mesure de la perte de cohérence d'un faisceau se propageant dans la cornée, et l'application de ces mesures aux greffons de cornée ;
- L'établissement de liens entre les modifications de la structure de la cornée au niveau nanométrique et micrométrique engendrées par le développement d'un œdème et les résultats des mesures optiques ;
- L'étude de certains phénomènes de propagation non-linéaire d'impulsions ultra-brèves dans le tissu.

Plan de thèse

Cette thèse est structurée en cinq chapitres distincts.

Le chapitre I contient une description anatomique de l'œil humain et plus particulièrement de la cornée et de son ultrastructure.

Le chapitre II met en perspective l'état de l'art en ce qui concerne les modèles liant l'ultra- et la microstructure de la cornée aux propriétés de transparence de celle-ci. L'évolution de l'ultrastructure et notamment de la perte de l'ordre local des structures tissulaires avec le développement de l'œdème est illustrée par des images de cornées à différents états pathologiques. Ces images ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration avec l'hôpital Hôtel-Dieu de Paris, ainsi que d'une collaboration avec l'Institut Fresnel de Marseille. Ces images complémentaires permettent de mettre en avant un double comportement, d'une part l'évolution de l'ordre local des fibrilles de collagène avec l'apparition de l'œdème, d'autre part l'apparition dans le cas de cornées très œdémateuses, de structures micrométriques correspondant à des régions dénuées de fibrilles de collagène.

Le chapitre III présente les résultats de diffusions obtenues par des mesures spectrales dans le cadre du travail postdoctoral de Donald Peyrot. Ces résultats sont approfondis par des mesures de la figure de diffusion de cornées saines et œdémateuses réalisées sur plusieurs longueurs d'onde. J'ai réalisé ces mesures lors d'un séjour expérimental à l'Institut Fresnel de Marseille avec qui nous avons collaboré. Ces mesures ont pu confirmer que la diffusion optique dépendait fortement de l'état de l'œdème de la cornée. On a pu constater que la figure de diffusion se rétrécit pour des longueurs d'onde plus importantes et la rétrodiffusion est diminuée. De plus, la dépendance de la diffusion à la longueur d'onde est plus prononcée pour des cornées proches de l'épaisseur physiologique. Ces résultats ont été comparés avec des images OCT de cornées réalisées pour différentes épaisseurs du tissu.

Le chapitre IV est consacré au dispositif d'holographie numérique que j'ai conçu et mis en place au cours de ce travail de thèse. Il commence par présenter le dispositif d'holographie numérique hors-axe réalisé ainsi que les différents programmes de reconstruction du front d'onde réalisés. Après cette première partie, je montre que ce

dispositif peut être utilisé comme un nouveau moyen permettant de mesurer la perte de cohérence d'un faisceau traversant un milieu diffusant. Ce nouveau dispositif de mesure de l'intensité mutuelle d'un champ perturbé est d'abord calibré à l'aide de solutions de pastis à différentes concentrations. Cette méthode est ensuite utilisée afin de mesurer la perte de cohérence d'un faisceau traversant la cornée claire et œdémateuse. Ce chapitre montre qu'il existe une corrélation importante entre l'épaisseur du tissu et la perte de cohérence du faisceau le traversant. Il démontre, de plus, que cette perte de cohérence peut être directement liée à la corrélation spatiale des fibrilles de collagène au sein du tissu.

Le chapitre V est consacré à un projet d'étude de l'interaction laser-tissu. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un séjour expérimental à l'Institut IESL-FORTH³ Héraklion en Grèce avec qui nous collaborons. Un dispositif d'holographie numérique en ligne pompe-sonde a été utilisé pour imager la propagation d'une impulsion unique dans une solution de collagène ainsi que dans une cornée de porc. C'est la première fois, à notre connaissance, que de telles mesures ont été réalisées sur le tissu cornéen. Cette étude offre des perspectives très intéressantes pour l'étude de l'interaction laser-cornée.

En annexes, on pourra trouver une partie consacrée à un projet d'optimisation de la mesure semi-quantitative de la transparence de greffons de cornée qui a été réalisée dans le cadre de cette thèse en continuité avec des travaux précédents réalisés au sein du groupe.

³ "Institute of Electronic Structure & Laser – Foundation for Research & Technology – Hellas"

CHAPITRE I : Anatomie et fonction du segment antérieur de l'œil humain

L'œil est l'organe dont le sens est la vision. Il permet de capter et traduire en information sensorielle les ondes électromagnétiques se trouvant dans le domaine spectral du visible⁴. Il traduit la lumière en énergie chimique, puis électrique. Le signal est traduit par le cortex occipital en perception sensorielle. L'œil, en somme permet de percevoir le monde et d'interagir avec lui. Il traduit en image sensorielle le monde qui nous entoure. Grâce à l'œil, nous pouvons mieux appréhender le monde, le découvrir mais aussi le façonner.

La vue permet non seulement l'observation, mais également la retranscription, la création. C'est par l'utilisation privilégiée de ce sens que l'homme a pu réaliser ses accomplissements les plus importants. La vue est à l'origine de l'écriture, de l'art, et donc de la conversion de la découverte en connaissance. Toute civilisation humaine se définissant par ces deux techniques, il est difficile d'imaginer une société dénuée de vision. Il est difficile d'imaginer un monde sans vision, une transmission sans vision, un avenir sans vision.

Ce n'est pas un hasard si l'œil, à travers les sociétés humaines et les siècles, revêt une symbolique d'une richesse inouïe. « Que la lumière soit ! » est dans l'hexaméron de la tradition judéo-chrétienne l'impératif nécessaire à toute entrée en scène, à la mise en perspective de ce qui va suivre.

L'œil est non seulement l'organe qui met en relation l'homme avec le monde qui l'entoure, mais également l'homme avec son semblable.

Dans ce chapitre je présenterai l'anatomie de l'œil en accordant une attention particulière à la cornée. Cette présentation sera contextualisée dans le cadre des travaux de recherche de ma thèse et plus largement de ceux du groupe de recherche auquel j'ai appartenu.

⁴ C'est-à-dire dont la longueur d'onde se situe entre 400 et 780 nanomètres

1. Anatomie générale de l'œil

Nous avons défini en introduction l'œil comme étant l'organe permettant de procurer la perception visuelle. Il est intéressant alors de se demander ce qu'est réellement la perception visuelle et comment on la définit. Dans l'ensemble du monde animal, l'évolution a engendré un grand nombre d'organes visuels d'une importante diversité fonctionnelle et structurelle (figure 1). Si on réunit toute cette diversité sous la même appellation d' « œil », c'est que le point commun entre ces différents organes est l'interaction de ceux-ci avec la lumière dans le but de créer un stimulus. L'information, cependant, est traitée différemment selon les différents types d'yeux.

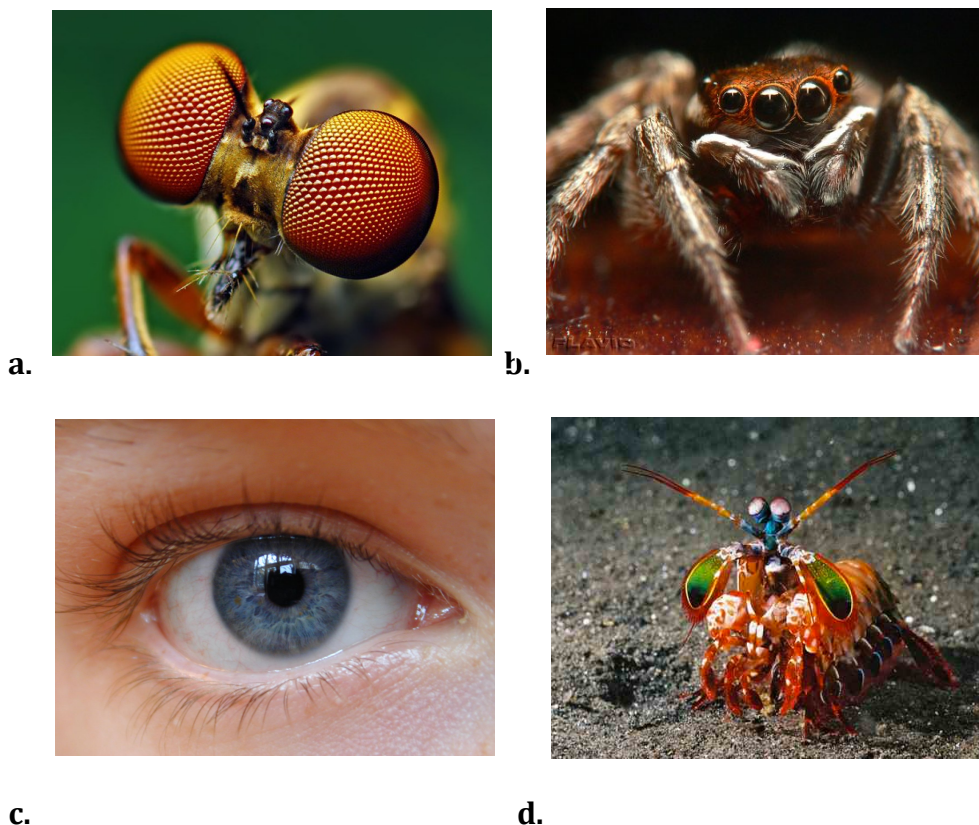


Figure 1. Différents types d'yeux, (a) œil composé ou à facette de mouche formé de la juxtaposition de centaines d'«ommatidies» lui conférant un champ de vision très large ; (b) yeux multiples d'une araignée ; (c) œil humain, (d) les yeux d'un crustacé stomatopoda considérés comme les plus complexes du monde animal. En plus d'être capable de reconnaître la distance et la profondeur des objets, ils sont capables de distinguer une très grande variété de couleurs, de voir la lumière polarisée ou de détecter la lumière fluorescente.

Les plus primitifs parmi ces yeux sont capables de distinguer les ombres, ou les directions. Les plus évolués quant à eux, tel l'œil humain, pourront distinguer les formes, les niveaux d'intensité et les couleurs, et retranscrire des images complexes. Dans cette thèse qui s'inscrit dans un contexte biomédical important, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'œil humain pour nous attarder ensuite plus longuement sur la cornée humaine qui constitue le sujet de notre étude.

2. L'œil humain

L'œil humain est souvent considéré comme étant l'organe le plus complexe de l'organisme. Il est constitué d'un globe creux globalement sphérique relié au système nerveux central par le nerf optique. Le globe oculaire a un volume d'environ $6,5\text{cm}^3$, un poids de 7 grammes, un diamètre global de 24 mm avec, sur sa face antérieure, une protubérance semi-sphérique constituée par la cornée qui a un rayon d'environ 8 mm. On distingue pour le globe oculaire trois tuniques venant se superposer l'une dans l'autre : la tunique cornéosclérale, la tunique uvéale et la tunique rétinienne (figure 2).

- La tunique cornéosclérale est une tunique rigide, la plus externe de l'œil. C'est une membrane fibreuse principalement constituée de collagène qui donne sa forme sphérique au globe oculaire. Ainsi que son nom l'indique, elle est composée de la sclère ou « blanc de l'œil », tissu opaque englobant les autres et leur conférant une protection. La sclère est également un site d'insertion des muscles oculomoteurs et un site d'entrée et de sortie des vaisseaux sanguins de l'œil. La cornée est la deuxième composante de cette tunique. C'est un tissu transparent situé sur le pôle crânial de la sclère. La cornée, avasculaire, assure la collecte de la lumière et joue un rôle de réfraction de celle-ci. Elle constitue une des deux lentilles du globe oculaire. À la frontière sclérotique-cornée (limbe cornéen) adhère la conjonctive.

- La tunique uvéale est la tunique intermédiaire entre la tunique cornéosclérale et la tunique rétinienne. Elle joue trois rôles essentiels : un rôle de vascularisation de l'œil, un rôle d'accommodation, et enfin un rôle de contrôle du flux lumineux entrant dans l'œil. La tunique uvéale est composée de la choroïde, qui est une couche vascularisée qui joue le rôle nourricier de l'œil, de l'iris dont le sphincter permet de faire varier le diamètre et

contrôler la quantité de lumière entrant, et du corps ciliaire, composé de muscles lisses qui maintiennent et modifient la forme du cristallin et d'un épithélium qui produit l'humeur aqueuse.

- La tunique rétinienne, constituée de la rétine, a pour rôle de transformer l'influx lumineux en signal nerveux grâce aux photorécepteurs. C'est au niveau de la rétine que se joue le rôle le plus important dans le processus de la vision puisqu'elle va déterminer la résolution de l'œil, la distinction des couleurs et des ombres.

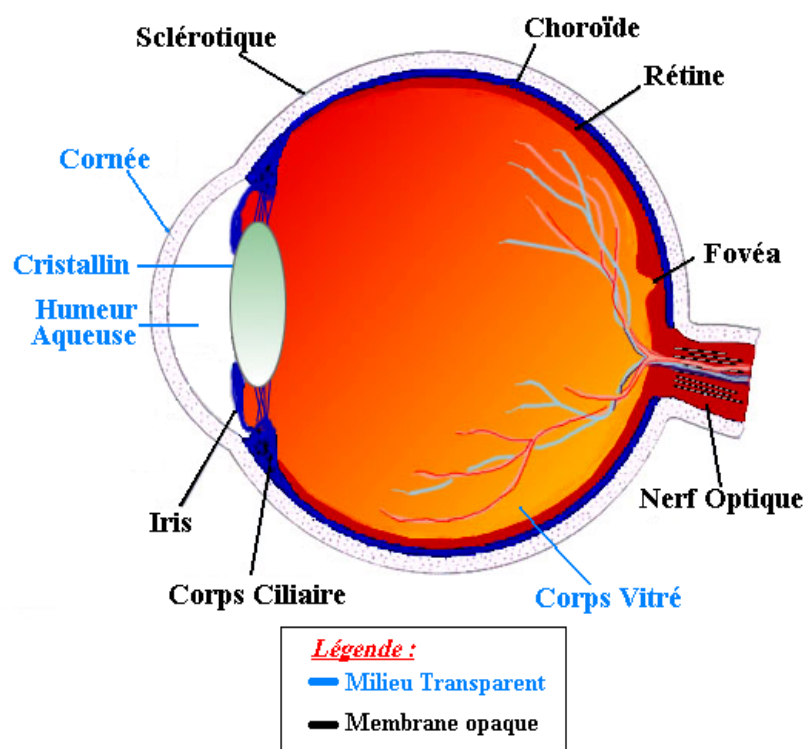


Figure 2 L'œil humain et la superposition de ses trois tuniques, de la plus externe à la plus interne : la tunique cornéosclérale, la tunique uvéale et la tunique rétinienne.

On peut également distinguer la partie antérieure de l'œil comprenant la cornée, l'humeur aqueuse, le cristallin, l'iris, le corps ciliaire, du corps postérieur de l'œil comprenant le corps vitré, la rétine, la choroïde et la sclère. Cette distinction, simple de par la division de l'œil en deux régions, est également fonctionnelle. En effet, le segment antérieur comprend une succession d'éléments optiques permettant de recueillir la

lumière et de la focaliser au niveau de la rétine. Les caractéristiques optiques de ses composants sont résumées dans le tableau 1. C'est au niveau du segment postérieur, grâce notamment à la rétine, que s'opère le processus de transduction (conversion en énergie chimique puis électrique) à l'origine de la vision. L'information visuelle est alors transmise au cerveau grâce au nerf optique.

Structure	Rayon de courbure antérieur	Rayon de courbure postérieur	Pouvoir de focalisation	Indice de réfraction
Cornée	7,8 mm	6,8 mm	2/3	1,377
Humeur aqueuse	----	----	----	1,337
Cristallin	10 mm	6 mm	1/3	1,413
Humeur vitrée	----	----	----	1,336

Tableau 1. Caractéristiques optiques du segment antérieur de l'œil comprenant la cornée, l'humeur aqueuse, le cristallin et l'humeur vitrée [2].

2.1 Segment postérieur de l'œil

Le segment postérieur, qui englobe les deux tiers postérieurs du globe oculaire, contient la membrane hyaloïde, ainsi que la rétine, la choroïde, la sclère, le corps vitré et le nerf optique, plus en arrière.

2.1.1 La membrane hyaloïde

La membrane hyaloïde, est une membrane transparente constituée d'une couche de collagène et contenant l'humeur vitrée. On distingue anatomiquement les parties antérieure et postérieure de la membrane hyaloïde. La partie postérieure sépare la rétine du corps vitré, et la partie antérieure le corps vitré du cristallin [1].

2.1.2 L'humeur vitrée

L'humeur vitrée, également appelée, corps vitré, corps hyalin ou simplement « le vitré », est une substance transparente et gélatineuse remplissant la cavité oculaire postérieure au cristallin. Elle constitue un des quatre dioptries de l'œil. Elle est formée de 98% d'eau et remplit 90% du volume oculaire. Sa composition est très proche de celle de

la cornée (75% d'eau), mais elle ne contient que peu de cellules (principalement des phagocytes). Elle est dénuée de vaisseaux sanguins, et contient des sels, un type de collagène appelé vitrosine, des glycosaminoglycanes, et du collagène de type II. L'humeur vitrée est produite par des cellules rétinienne. Son indice de réfraction est de 1,336 [3].

Elle a un rôle double : assurer la rigidité de l'œil et maintenir la rétine contre la paroi de l'œil. La vitrée absorbe également les rayonnements ultra-violet, protégeant ainsi la rétine d'une éventuelle surexposition. De ce fait, elle rend le système nerveux insensible à la rhodopsine, pigment sensible à l'ultraviolet.

L'humeur vitrée, comme la cornée - nous le verrons par la suite - est maintenue transparente par la disposition particulière des fibrilles de collagène qui la constituent. Celles-ci présentent un certain ordre du fait de la répulsion électrostatique des fibrilles. Avec l'âge, cette répulsion tend à diminuer, ce qui entraîne un amoncellement des fibrilles et une perte partielle de transparence de l'humeur.

2.1.3 La choroïde

La choroïde est l'une des couches de la paroi du globe oculaire. Elle se situe entre la sclère et la rétine. Elle est aussi connue pour être la couche vascularisée du globe oculaire. Plus large dans la partie postérieure (environ 2mm) que dans les autres (1mm), la choroïde assure la nutrition et l'oxygénation de l'iris et des photorécepteurs se trouvant à la surface de la rétine. Sa structure contient des pigments lui conférant une couleur brune, ce qui lui permet d'agir comme une chambre noire. Elle protège également l'œil d'un point de vue thermique en empêchant une grande partie des rayonnements extérieurs de pénétrer.

2.1.3 La rétine

La rétine constitue la tunique interne de l'œil. Surtout, c'est l'organe sensible de la vision : il va capter l'information visuelle et la traduire en information sensorielle. La rétine occupe 75% de la face interne du globe oculaire. C'est une membrane transparente pluristratifiée d'environ un demi-millimètre d'épaisseur. La rétine est caractérisée par la présence des photorécepteurs qui vont capter le signal lumineux et le transformer en signal sensoriel. Dans la partie postérieure, se trouve une zone apparaissant sous forme

de tâche jaune, d'environ 2mm et que l'on appelle la macula. C'est la zone de la rétine composée d'une forte concentration de cônes, c'est-à-dire de photorécepteurs responsables de la vision diurne. Ils sont composés de trois sortes, chacune étant sensible à une longueur d'onde (rouge, vert et bleu). Au centre de la macula, se trouve une zone caractérisée par une petite dépression que l'on nomme fovéa et qui est entièrement composée de cônes serrés les uns contre les autres. Cette zone donne l'acuité maximale de l'œil. La papille est la région d'émergence du nerf optique dépourvue de photorécepteurs. Dans la zone périphérique à la macula, on retrouve les bâtonnets (figure 3), autre type de photorécepteurs. Ils sont de forme allongée et on en dénombre 130 millions environ dans l'œil. Ils possèdent une grande sensibilité à la lumière et sont responsables de la vision de nuit. Ils possèdent une faible perception aux couleurs et aux détails et ne sont reliés qu'à une fibre unique du nerf optique.

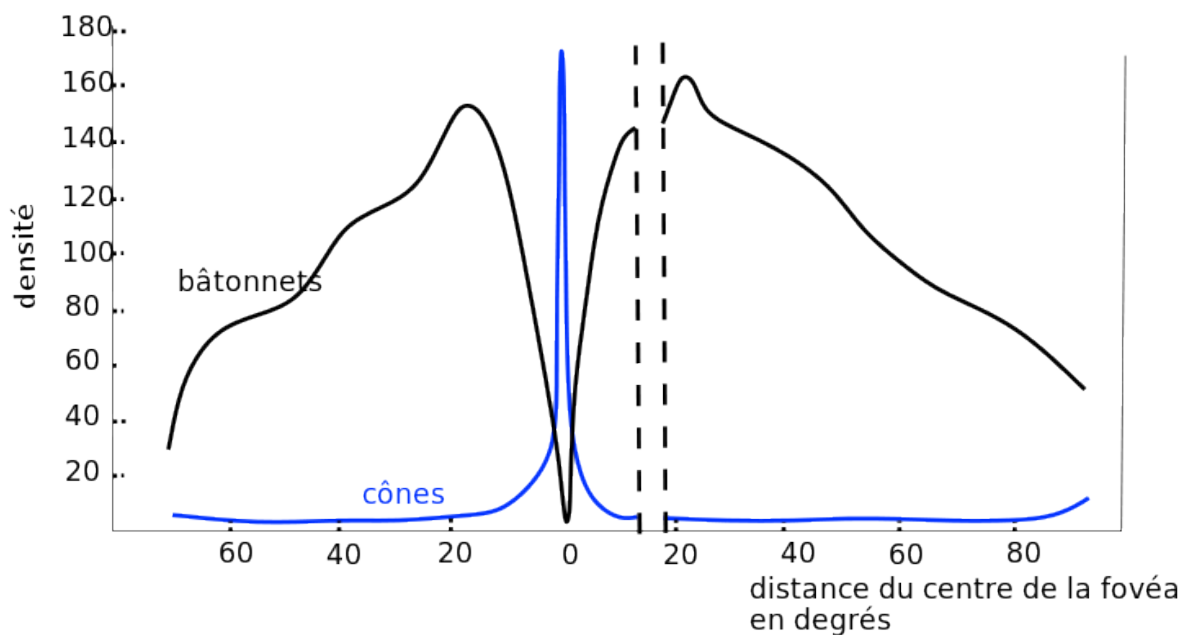


Figure 3. Répartition des cônes et des bâtonnets sur la rétine. On observe une forte concentration de cônes responsables de l'acuité visuelle au niveau de la fovéa, et une plus forte concentration de bâtonnets à la périphérie.

2.1.4 La sclère

La sclère, ou sclérotique, et communément appelée « blanc de l'œil » est la membrane blanche, opaque et rigide, de structure tendineuse d'une épaisseur d'environ 1 mm d'épaisseur. Elle contient la pression interne de l'œil tout en le protégeant des agressions

mécaniques extérieures. Elle forme 4/5^{ème} de la surface du globe oculaire. Dans sa partie postérieure, elle est traversée par le nerf optique. La structure de la sclère est très proche de celle de la cornée et sera décrite plus en détail au paragraphe 3.

2.2 Segment antérieur de l'œil

Le segment antérieur de l'œil comprend la cornée, l'iris, le cristallin et l'humeur aqueuse (figure 4). La partie antérieure de la sclère peut également, selon les références, faire partie du segment antérieur. Notre description va principalement se focaliser sur la cornée dans la mesure où c'est le tissu sur lequel se sont portés l'essentiel des travaux et résultats figurant dans cette thèse.

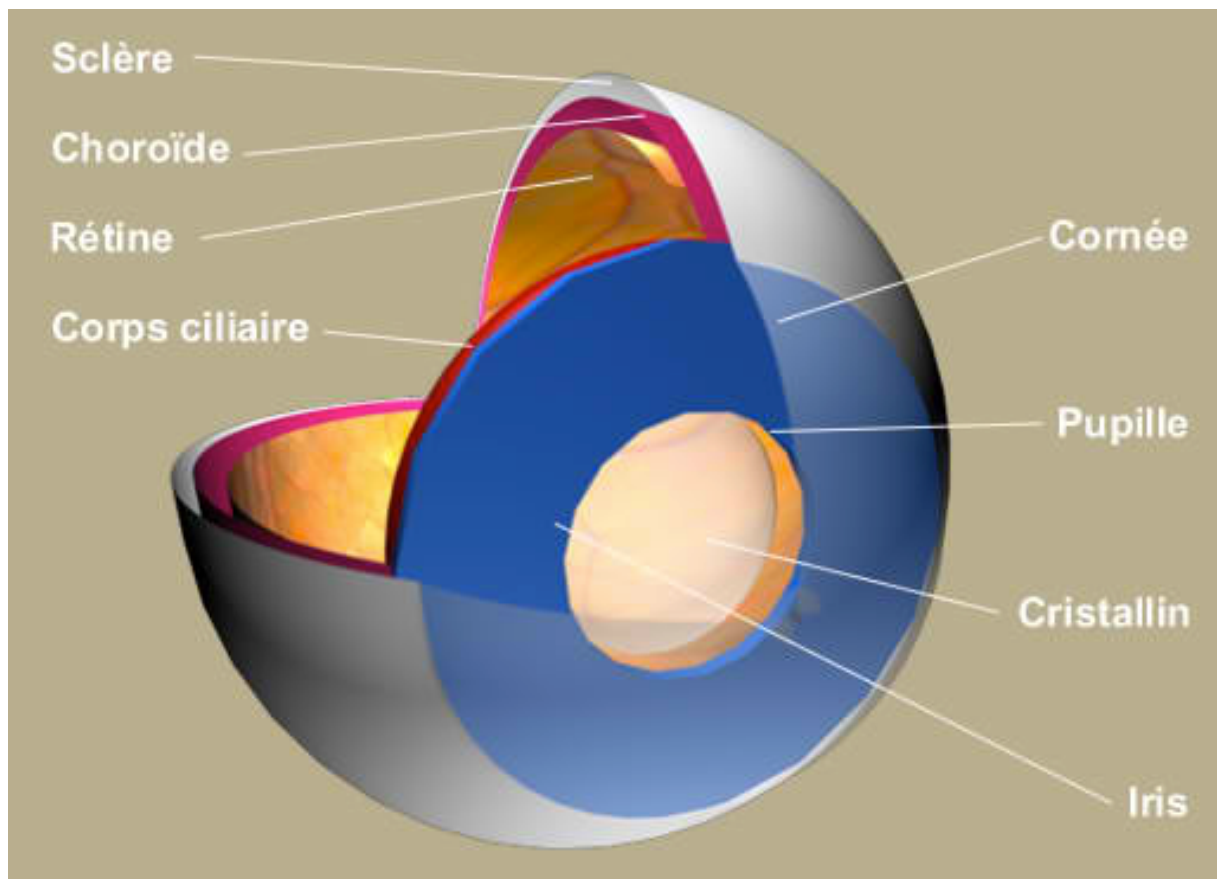


Figure 4. Segment antérieur de l'œil.

2.2.1 La cornée

La cornée est le tissu transparent et avasculaire se trouvant sur la face antérieure du globe oculaire. Elle est en forme de calotte asphérique légèrement saillante. Elle constitue le premier élément réfractif de l'œil, comptant pour 2/3 du dioptré oculaire. Elle couvre 1/5^{ème} de la surface de l'œil, possède un diamètre moyen chez l'adulte de 11mm, avec une épaisseur augmentant progressivement du centre (550 microns) à la périphérie (environ 1mm). Ses rayons de courbure antérieure et postérieure sont présentés dans le tableau 1 de ce chapitre. Le taux d'hydratation de la cornée est supérieur à 85%.

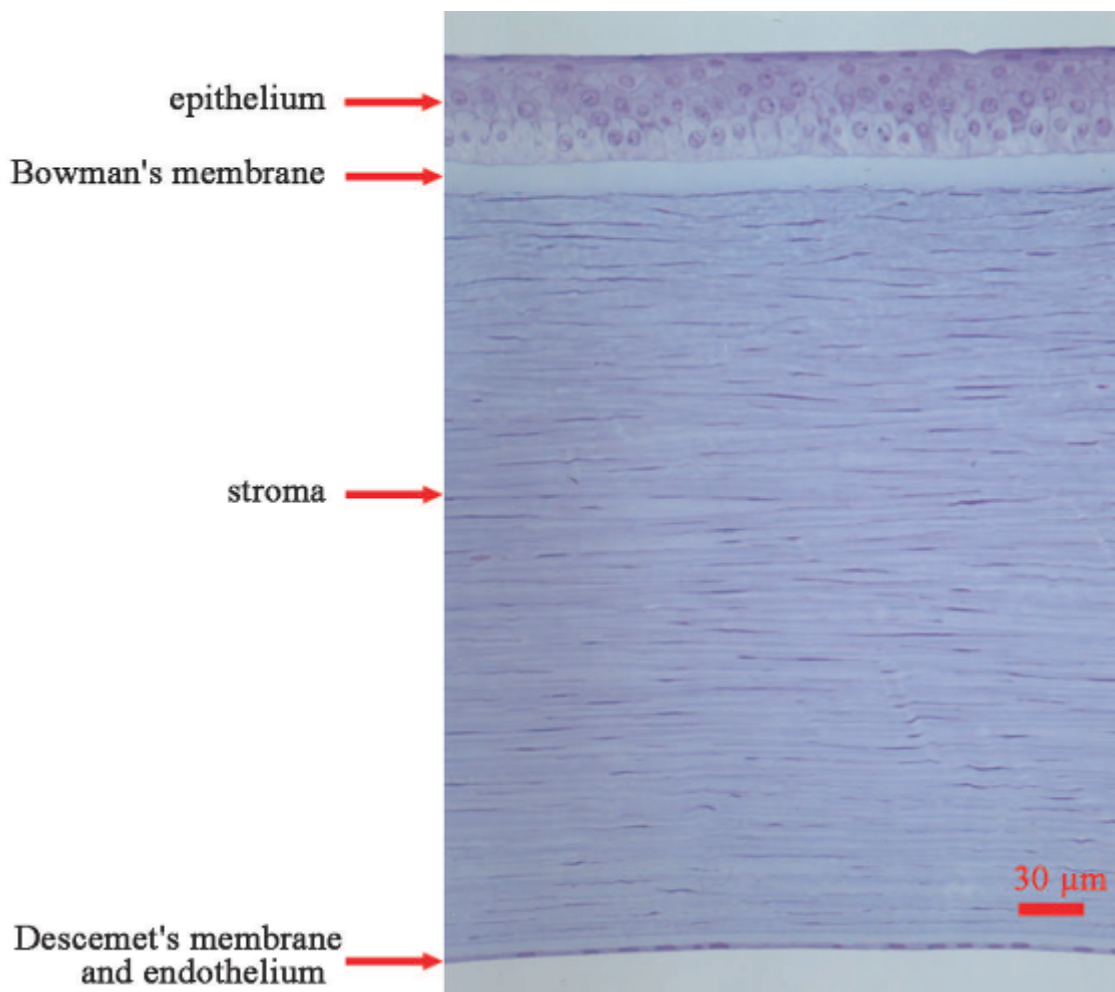


Figure 5. Coupe semi-fine d'une cornée humaine colorée au bleu de toluidine. On distingue les cinq couches successives décrites dans le texte.

La cornée avasculaire, est fortement innervée, ce qui la rend sensible à tout contact. Premier tissu de l'œil en contact avec l'extérieur, elle forme une barrière à l'entrée des molécules exogènes. Son énergie métabolique lui est conférée par le film lacrymal de la

conjonctive, ainsi que de l'humeur aqueuse. Elle est uniquement vascularisée au niveau de la conjonction cornéo-sclérale, au niveau des boucles du limbe irriguées par les vaisseaux de la choroïde et de la conjonctive.

La cornée est formée de 5 couches successives, 3 couches cellulaires, et 2 couches membranaires (figure 5). De la face externe vers l'humeur aqueuse, on compte : l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma cornéen, la membrane de Descemet et finalement l'endothélium.

- **L'épithélium** est formé de 5 à 7 couches de cellules. La couche basale est fortement attachée au stroma par les hémidesmosomes. Il possède un rôle de barrière et permet l'étalement du film lacrymal. Les cellules de l'épithélium se renouvellent en permanence grâce à la couche de cellules souches se trouvant en périphérie de la cornée dans le limbe. Il faut compter une année pour le renouvellement complet de l'épithélium cornéen.
- **La membrane de Bowman** a une épaisseur de 8 à 14 micromètres à la partie centrale de la cornée. Elle se situe entre la membrane basale de l'épithélium et le stroma cornéen. C'est une couche de collagène diffus qui ne se renouvelle jamais, et dépourvue de cellule. Tout comme la cornée et la sclère, elle est constituée de collagène de type V, VI et VII. L'épithélium, ainsi que la membrane de Bowman antérieure sont parcourus par des fibres nerveuses sensibles.
- **Le stroma** représente 90% du volume de la cornée, et la plus grande partie de son épaisseur (environ 450 microns). Il est composé à 80% d'eau. Il contient aussi des cellules appelées kératocytes ainsi que d'une matrice extracellulaire riche en glycosaminoglycanes et fibrilles de collagène. Les kératocytes (2 à 3% du volume cornéen) sont des cellules quiescentes responsables du renouvellement de la matrice extracellulaire et pouvant intervenir en cas de cicatrisation. Les glycosaminoglycanes sont de longues chaînes sulfatées responsables de la rétention d'eau. Les fibrilles de collagène présentes au sein du stroma cornéen sont principalement de type I, mais on en trouve également de type V et VI. Le collagène de type III, présent en faible proportion, peut augmenter dans le cas d'une cicatrisation ou d'une inflammation [4]. Les fibrilles de collagène ont un diamètre constant d'environ 30nm ainsi qu'un espacement constant d'environ 60nm. Les fibrilles sont parallèles entre elles ainsi qu'à la surface de la cornée, et sont organisées en lamelles également parallèles à la surface cornéenne.

L'arrangement particulier de ces fibrilles de collagènes confère à la cornée sa propriété optique de transparence, ainsi que sa propriété mécanique de résistance. Les lamelles de collagène sont au nombre de 300 environ et ont chacune une épaisseur de 1 à 2 micromètres.

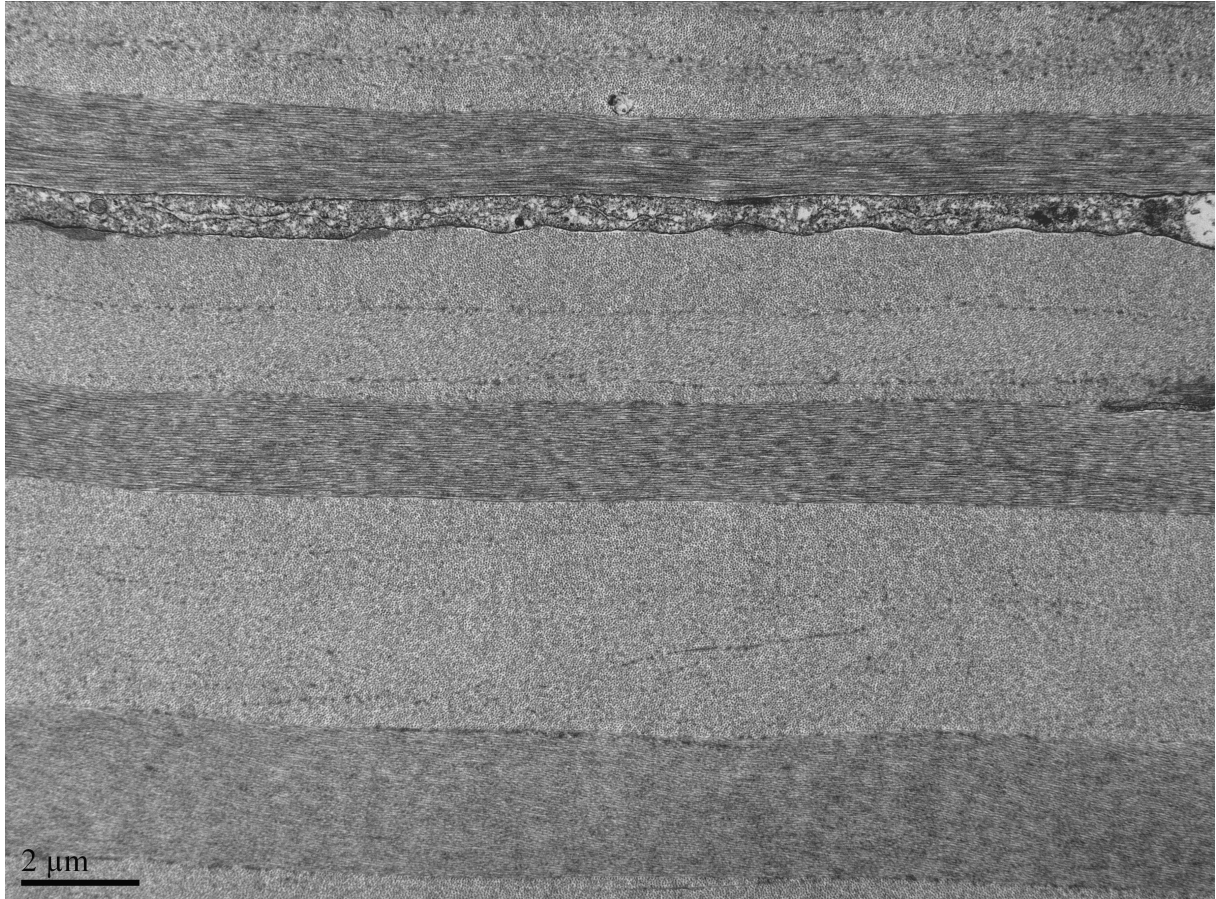


Figure 6. Micrographe montrant une coupe de cornée faisant apparaître les différentes lamelles de collagène du stroma. L'orientation différente des fibrilles de collagène au sein d'une lamelle va faire apparaître celle-ci de façon plus ou moins prononcée.

Au sein d'une même lamelle de collagène, les fibrilles ont la même orientation. Les différentes lamelles se différencient les unes des autres par une orientation différente des fibrilles qui les constituent et qui varie dans des angles entre 0 et 90 degrés (Figure 6). La figure 7 montre l'interface séparant deux lamelles de collagène avec une différente orientation des fibrilles. On peut également constater l'arrangement particulier des fibrilles de collagène dans l'espace. C'est cet ordre qui est responsable de la transparence de la cornée. Nous développerons largement ce sujet dans les chapitres suivants. Les fibrilles de collagène sont constituées par un

assemblage de 6 molécules de tropocollagène (figure 8). Les molécules de tropocollagène étant elles-mêmes de forme hélicoïdale, cela leur permet de s'imbriquer pour former les fibrilles.

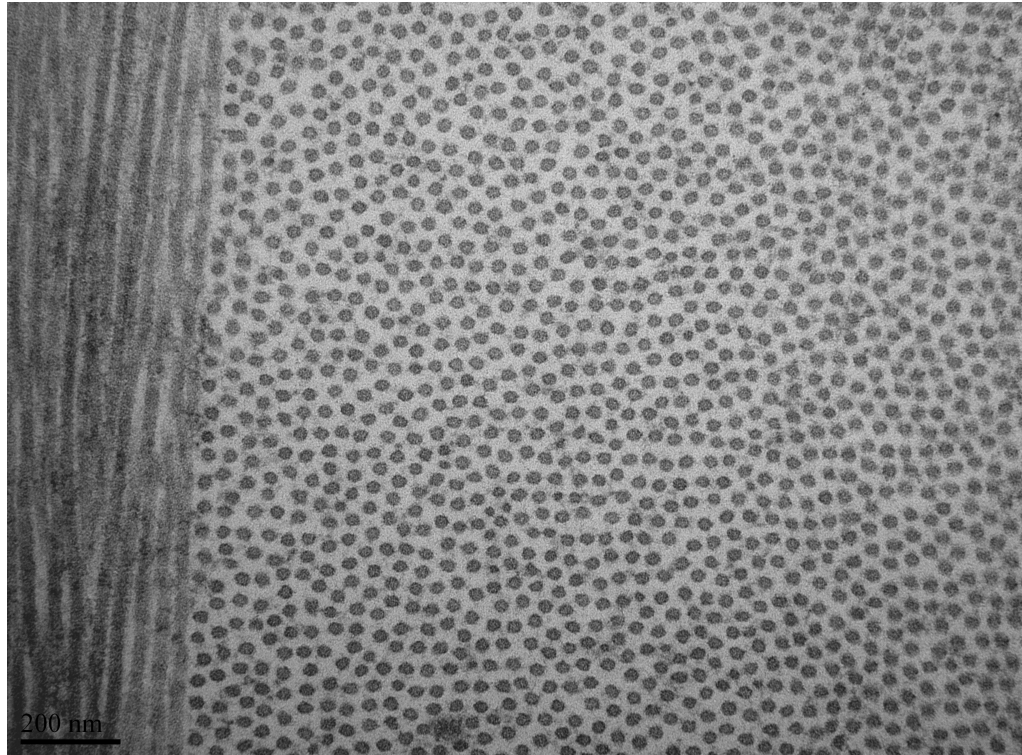


Figure 7. Micrographe faisant apparaître deux lamelles de collagène d'orientation différente.

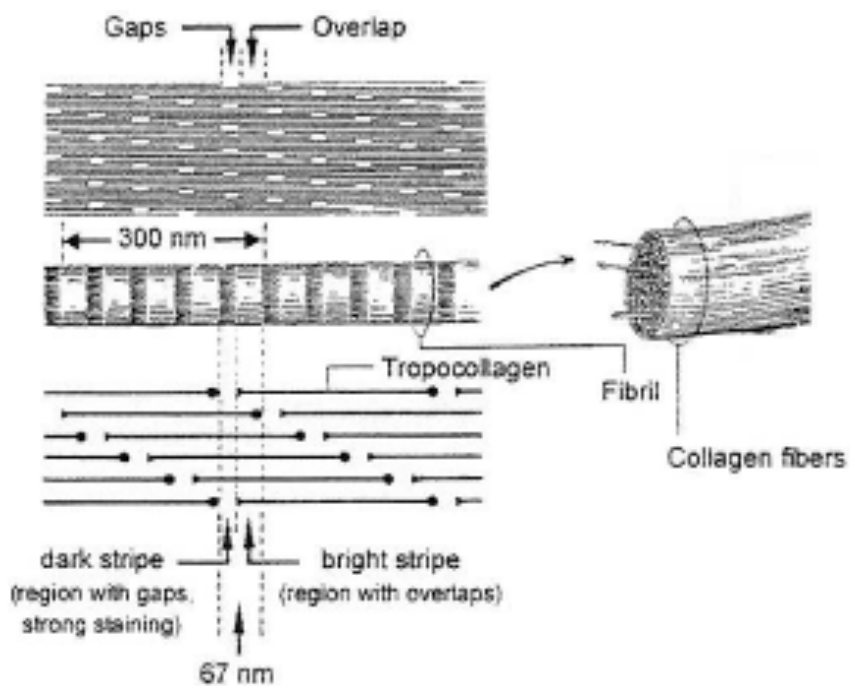


Figure 8. Organisation du tropocollagène en fibrilles.

2.2.2 L'iris

L'iris est le diaphragme circulaire et contractile de la face antérieure du globe oculaire. Il constitue la partie donnant la couleur de l'œil (bleu, marron, etc....) Au centre, l'iris est percé d'un orifice appelé pupille. Le tissu est vascularisé et innervé. Les muscles du sphincter de l'œil contrôlent la contraction et la dilatation de l'iris et jouent le rôle de diaphragme contrôlant la quantité de lumière entrant dans l'œil.

2.2.3 L'humeur aqueuse

C'est un liquide biologique transparent de faible viscosité, permettant avec le corps vitré de maintenir la pression intraoculaire. Elle occupe les chambres antérieure et postérieure de l'œil. L'humeur aqueuse, continuellement renouvelée et constituée à 97% d'eau, est sécrétée par le corps ciliaire. Son indice de réfraction est de 1.336 permettant d'induire une faible réfraction entre celle-ci et la cornée.

2.2.4 Le cristallin

Le cristallin est une lentille biconvexe située dans la partie antérieure de l'œil, derrière l'iris. Il est relié aux enveloppes de l'œil par le corps ciliaire. Avec la cornée, il permet de focaliser les rayons lumineux au niveau de la rétine. Son pouvoir de réfraction compte pour 1/3 du pouvoir réfractif de l'œil. Le cristallin a la particularité de pouvoir modifier son angle de courbure, et donc sa vergence par le phénomène d'accommodation. C'est un tissu transparent, non vascularisé.



Figure 9. Photographie d'un cristallin humain sain

Le cristallin est composé de cellules fibreuses transparentes exceptionnellement longues (de l'ordre du cm). À l'exception d'une couche de cellules souches sur la face externe du cristallin, ses cellules ne contiennent pas de noyau, ni aucune des organelles habituellement présentes dans les cellules comme les mitochondries, les réticulum endoplasmiques etc. Ce sont donc des cellules ne comportant que la membrane plasmique et le cytoplasme. La structure du cristallin est unique et possède une organisation très particulière (figure 10).

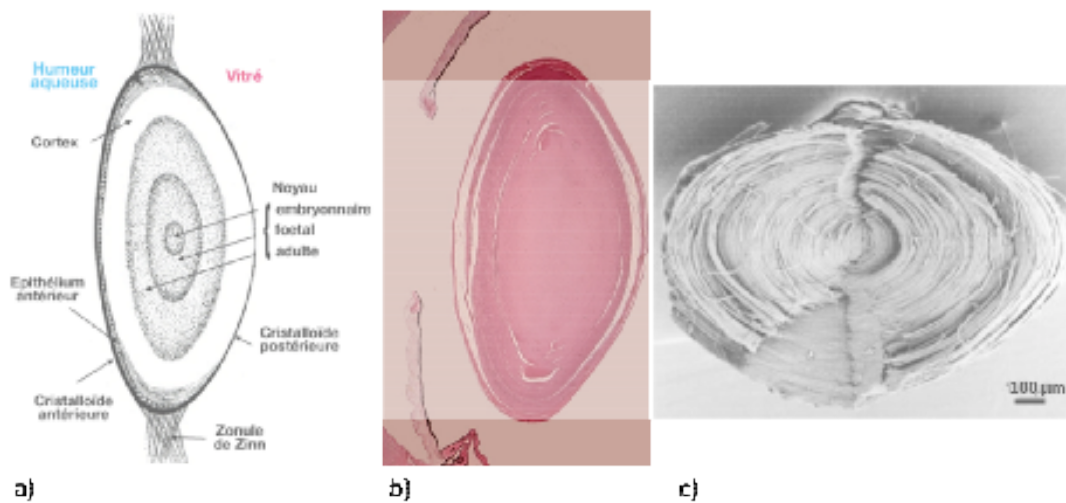


Figure 10. Schéma de l'organisation du cristallin (a), coupe histologique du cristallin (b) et image de microscopie à balayage du cristallin (c).

Elle est formée de la périphérie vers le centre par la capsule cristalloïde, le cortex constitué des corticales antérieures et postérieures et formé par l'apposition successive des fibres cristalliniennes issues de l'épithélium de la région équatoriale, et du noyau adulte. La transparence du cristallin est assurée tant par la composition de ses cellules que leur organisation particulière dont nous discuterons dans les chapitres suivants.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Bernal et. al. Evidence for Posterior Zonular Fiber Attachment on the Anterior Hyaloid Membrane, IOVS, November 2006, Vol. 47, No. 11
- [2] Deloison F « Greffe de corneea automatisee assistee par laser femtoseconde optimise en longueur d'onde », Thèse de doctorat, École doctorale de l'École Polytechnique, 2010.
- [3] I. Escudero-Sanz and R. Navarro, "Off-axis aberrations of a wide angle schematic eye model," *J. Opt. Soc. Amer. A*, vol. 16, no. 8, pp. 1881–1891, 1999.
- [4] Robert L, Legeais JM, Robert AM, Renard G, « Corneal collagens », 2001, *PatholBiol*; 49 353-63

CHAPITRE II : Étude de la transparence cornéenne

La cornée est le premier milieu biologique traversé par la lumière. Son rôle est double : protéger l'œil et diriger les rayons lumineux vers la rétine qui se charge du traitement du signal. Dans cette optique, la transparence du tissu s'avère fondamentale, et toute altération de cette transparence peut considérablement nuire à la qualité de la vision. Connaissant la composition de la cornée, son caractère transparent a quelque chose de fascinant et a été l'objet de nombreuses controverses scientifiques par le passé. David Maurice, fut le premier à proposer un modèle de structure de la cornée pouvant répondre à sa caractéristique optique de transparence. Il a de ce fait, ouvert la porte à de nombreuses investigations dans les années 1950 et 1960. Depuis le milieu des années 1970, peu de scientifiques ont étudié le problème et nous proposons ici de présenter l'état de l'art en ce qui concerne la diffusion de la lumière dans le tissu cornéen sain et œdémateux, et d'y ajouter notre contribution au terme des recherches effectuées pendant cette thèse de doctorat. Outre l'intérêt académique certain qu'une telle compréhension du phénomène peut apporter, elle permet aussi des applications médicales comme la chirurgie cornéenne. Les résultats du groupe ont permis d'être à l'origine du développement de démonstrateurs lasers pour la chirurgie de la greffe cornéenne et la chirurgie du glaucome.

1. Transparence cornéenne : État de l'art.

Le tissu cornéen, comme les tissus conjonctifs, les tissus tendineux ou la peau, a pour composant essentiel le collagène. Toutefois, contrairement à ces tissus et à la sclère en particulier qui présente un caractère opaque, la cornée est un tissu transparent pour le spectre du visible. La structure de la cornée présente donc quelques particularités lui conférant cette propriété de transparence. Les caractéristiques optiques de ce tissu sont de ce fait, depuis longtemps, l'objet d'études scientifiques. La propriété de biréfringence de la cornée est en effet connue depuis les travaux de David Brewster en 1815 [1]. Les valeurs de l'indice de réfractance et les autres propriétés optiques sont connues depuis le 19^{ème} siècle également [2]. Bien que ces propriétés furent révélées, aucune explication satisfaisante sur l'explication de la transparence de la cornée ne fut établie jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle grâce aux travaux de David Maurice [28]. Dans ce chapitre, je présenterai rapidement les différentes théories proposées et parmi elles, celle de David Maurice. Nous verrons que si les enjeux et motivations de la compréhension physique de la transparence et la perte de transparence de la cornée ont considérablement évolué depuis cette époque, l'intérêt scientifique d'une telle étude reste inchangé. En effet, il s'agissait à l'époque de Maurice et de ses prédécesseurs, de comprendre l'ultrastructure de la cornée à travers les propriétés optiques de transparence du tissu (le microscope électronique ne permettait pas à l'époque de visualiser cette ultrastructure). Si cette ultrastructure est aujourd'hui très bien comprise, les subtilités des processus optiques présents dans la cornée, ouvrent des perspectives scientifiques intéressantes. Nous faisons aujourd'hui le chemin inverse et partons de l'ultrastructure du tissu pour essayer de comprendre les phénomènes optiques présents. Nous verrons que les processus physiques impliqués peuvent se retrouver dans les domaines des hautes technologies et des matériaux comme par exemple les céramiques dopées ultratransparentes, ou les liquides photoniques.

1.1 Les différentes théories basées sur l'uniformité de l'indice de réfraction

1.1.1 Uniformité de l'indice de réfraction

La plus vieille théorie expliquant la transparence du tissu cornéen dans le spectre du visible est celle de l'uniformité de l'indice de réfraction au sein du volume de la cornée [3,4,19]; cette uniformité d'indice reposant sur l'homogénéité de ses éléments constitutants, sur l'absence relative de structure cellulaire, ainsi que sur l'absence de structure opaque ou de vaisseaux sanguins [17,18]. Selon cette théorie, les fibrilles de collagène présentes dans le stroma, ainsi que le milieu interstitiel possèderaient le même indice de réfraction, sans composante imaginaire (pas d'absorption) ce qui expliquerait donc la transparence du milieu cornéen.

1.1.2 Hydratation des fibrilles de collagène

La dernière théorie a rapidement été rejetée. En effet, bien que le microscope électronique n'était à l'époque pas assez élaboré pour observer l'ultrastructure du tissu cornéen, la communauté scientifique est parvenue à la conclusion que les fibrilles de collagène devaient posséder un indice de réfraction différent de celui du liquide interstitiel [20,21]. La mesure de l'indice de réfraction des composants isolés de la cornée a été réalisée par Aurell et Holmgren [22]. Ceux-ci ont trouvé des valeurs de 1,57 pour le collagène sec et de 1,342 pour le liquide interstitiel. De plus, on a découvert le rôle important que pouvait jouer l'endothélium dans la régulation de l'hydratation de la cornée [4-13]. Toutefois, certains auteurs, afin de ne pas abandonner la théorie de l'indice de réfraction uniforme, ont constaté que de telles valeurs étaient mesurées *in situ*, et qu'un tel écart ne pouvait être observé *in vivo* [23]. Les propriétés de biréfringence de la cornée mesurées [24-29] par différents auteurs ont définitivement clos le débat de sorte que la communauté scientifique a accepté dans son ensemble la présence de différents indices de réfraction au sein du volume cornéen.

Dès lors, plusieurs théories sont apparues afin de tenter de concilier la non uniformité des indices de réfraction des fibrilles de collagènes et du liquide interstitiel avec la propriété

de transparence du tissu. La première d'entre elle a été de penser que l'endothélium permettait d'hydrater le tissu cornéen de telle sorte que les fibrilles de collagène absorbaient le liquide entrant. Celles-ci gonflaient jusqu'à se toucher mutuellement, produisant ainsi un indice de réfraction uniforme [15].

1.1.3 Déshydratation du liquide interstitiel

D'autres auteurs ont suggérés sur le même principe, que c'était au contraire le liquide interstitiel qui se déshydratait par l'intermédiaire de l'endothélium, permettant ainsi aux fibrilles de collagène de se coller mutuellement les unes aux autres pour finalement réaliser un milieu homogène en terme d'indice de réfraction [14, 15].

1.1.4 Adaptation de l'indice de réfraction

D'autres encore ont proposé l'idée d'une substance transparente⁵ présente dans le liquide interstitiel, capable de créer une adaptation d'indice entre les fibrilles de collagène et le liquide interstitiel [15,16⁶]. Schwartz et Davson [30²,31] ont dans la même optique imaginé que les mucopolysaccharides occupant l'espace entre les fibrilles de collagène pouvaient contribuer à augmenter l'indice du liquide interstitiel, aboutissant ainsi à une adaptation d'indice.

1.2 Théorie du réseau cristallin

1.2.1 David Maurice

David Maurice s'est distingué dans ces débats en proposant une nouvelle approche remettant en cause le postulat de la nécessité de l'uniformité des indices de réfraction

⁵ Cette théorie expliquant un phénomène physique non élucidé peut rappeler la théorie de l'éther remplissant le vide de l'espace et agissant en tant que médiateur de la force gravitationnelle, puis de la transmission de l'onde lumineuse. Une telle théorie peut toutefois s'avérer fructueuse comme dans le cas du Boson de Higgs.

⁶ Cité par Freegard : the physical basis of transparency of the normal cornea, Eye (1997) 11, 465-471

pour expliquer la transparence cornéenne. Dans son fameux papier de 1957 [28], il entreprend de raisonner en termes simples à partir des faits observés expérimentalement, pour arriver à une conclusion quant à la structure du stroma cornéen. L'élégance de son raisonnement et la pertinence de ses arguments font de son papier une référence incontestée dans le domaine de l'optique des tissus et de l'ophtalmologie, et ce malgré une conclusion partiellement juste.

Maurice constate que la cornée est un tissu biréfringent et qu'il doit effectivement exister une différence d'indice de réfraction entre les fibrilles de collagène et le milieu interstitiel. Il sait également qu'une pression mécanique sur une partie de la cornée, rend cette partie opaque le temps de la pression. De plus, il constate qu'une cornée œdémateuse, hydratée, est davantage diffusante qu'une cornée à l'épaisseur physiologique. Il a mené un ensemble de mesures expérimentales sur des fibrilles de collagène à différents états d'hydratation, ainsi que des mesures sur les composants isolés. En se basant sur les principes de la diffusion optique, il a calculé la puissance diffusée par une fibrille de collagène selon le critère de Rayleigh (voir annexes). En considérant une fibrille comme un cylindre infiniment long ($\gg \lambda$) et fin (le rayon $\rho \ll \lambda$), il a calculé la puissance P_{1f} de la lumière non polarisée diffusée par cette seule fibrille indépendante :

$$P_{1f} = \frac{l}{4} \frac{E_0^2}{\eta} \frac{\pi^2 a^4}{4} k_i^3 (m^2 - 1)^2 \left(1 + \frac{2}{(m^2 + 1)^2}\right) \quad (1)$$

où $k_i = \frac{2\pi}{\lambda_i} = \frac{2\pi n_i}{\lambda_{VIDE}}$ est le vecteur d'onde dans le milieu, E_0 l'amplitude du champ incident,

$\eta = \sqrt{\frac{\mu}{\varepsilon}}$ l'impédance caractéristique, a le rayon de la fibrille, et $m = \frac{n_c}{n_i}$ le quotient des

indices de réfraction des fibrilles n_c et du milieu interstitiel n_i . On pourra remarquer que la puissance diffusée est proportionnelle dans notre cas à λ^{-3} . Cela est dû au fait que le cylindre diffusant est dans notre cas unidimensionnel. Dans le cas de la diffusion responsable de la couleur bleue du ciel, la diffusion de Rayleigh est en effet proportionnelle à λ^{-4} .

En considérant une couche du stroma avec une largeur w et une épaisseur Δ ainsi qu'une fraction d_c pour les fibrilles de collagène, on trouve que le nombre total de fibrilles de collagène est égal à $N = \frac{d_c w \Delta}{\pi \rho^2}$. Ainsi, en considérant les fibrilles de collagènes comme des diffuseurs indépendants de type Rayleigh, on conclut que la diffusion totale due à la cornée est égale à $P_T = N \times P_{1f}$.

L'intensité de la lumière incidente sur le volume $w\Delta$ est égale à $\frac{E_0^2}{2\eta}$. On peut alors calculer la fraction d'onde diffusée par le tissu ΔS :

$$\Delta S = \frac{d_c \pi^4 \rho^2 \Delta}{\lambda^3} (m^2 - 1)^2 \left(1 + \frac{2}{(m^2 + 1)^2}\right) = \sigma \frac{d_c \Delta}{\pi \rho^2} \quad (2)$$

σ étant la section efficace de diffusion d'une fibrille. Connaissant les différents paramètres de cette équation, David Maurice a évalué que la fraction de lumière diffusée par la cornée pour une épaisseur du stroma de 460 μm et une longueur d'onde de 500 nm était de l'ordre de 94%. En d'autres termes, en se basant sur le postulat que les fibrilles de collagène agissent comme des diffuseurs indépendants, la cornée devrait être opaque. Ce qui est contraire à la réalité, et explique les nombreuses théories sur l'homogénéité de l'indice de réfraction. Maurice prend toutefois le soin de méthodiquement rejeter un à un les arguments avancés par les différents auteurs des théories présentées au 1.1. Il démontre en effet l'incompatibilité des résultats expérimentaux démontrant la biréfringence du tissu avec ces théories. À partir de là, Maurice a déduit que les fibrilles de collagène ne pouvaient agir en diffuseurs indépendants. Une relation de phase devait donc exister entre les champs électriques émis par les différents diffuseurs, résultant en des interférences destructives dans toutes les directions autres que celle de la lumière incidente. Maurice a donc attribué une structure de type cristalline au stroma cornéen où les fibrilles de collagène devaient présenter un ordre parfait de type hexagonal (figure 1).

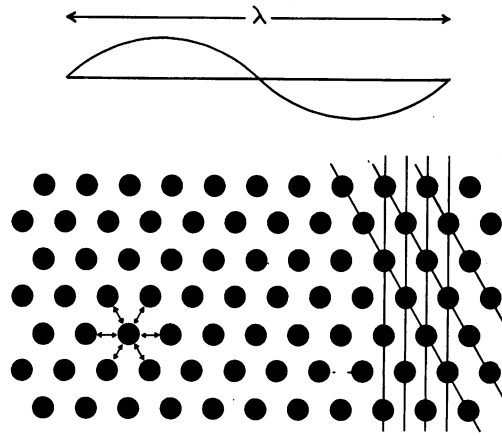


Figure 1. Arrangement des fibrilles de collagène en ordre cristallin pour expliquer la transparence cornéenne [28].

La démonstration de Maurice eut un impact considérable et s'est finalement imposée dans la communauté scientifique après les nombreux débats des années 1960. Cela a permis en outre d'expliquer la perte de transparence dans le cas d'une cornée œdémateuse. En effet, un surplus de liquide interstitiel provoque un désordre au sein du réseau augmentant ainsi la diffusion de la lumière. Maurice a appuyé son argumentation en élaborant un modèle basé sur les ondes sonores. Il a montré qu'une onde sonore d'une certaine fréquence était diminuée d'une certaine amplitude après avoir traversé un réseau perturbé composé de cylindres métalliques.

1.2.2 Autres théories du réseau cristallin

La théorie de Maurice sur la structure de la cornée a eu un impact considérable dans la communauté scientifique. Bien que par la suite, il a été démontré qu'un ordre cristallin infini n'était pas indispensable pour expliquer la transparence cornéenne, la théorie du réseau cristallin a de nouveau émergé. Feuk [32,33] a par exemple proposé un modèle où les positions des fibrilles de collagène correspondaient à celles d'un réseau cristallin perturbé. Le formalisme utilisé est celui de la diffraction des rayons X par un réseau cristallin, ainsi que la théorie de Debye-Waller, très utilisée en physique statistique et décrivant l'influence thermique. À partir de ce modèle, Feuk a conclu à une dépendance en λ^{-5} en ce qui concerne la diffusion optique par la cornée (la contribution due à la diffusion de Rayleigh étant de λ^{-3} , et celle due à la perturbation thermique du réseau à λ^{-2}). À la fin du 20^{ème} siècle, Ameen [35,36] a utilisé les théories de la physique du solide et

des semi-conducteurs, considérant la cornée comme étant un cristal photonique. Il a ainsi calculé les structures de bandes d'un tel réseau correspondant aux zones de transparences de la cornée. S'il a effectivement pu prédire une zone transparente dans le domaine du visible, ce modèle ne prend toutefois pas en compte la distribution angulaire de la diffusion. De plus les images de microscopie électronique rejettent catégoriquement cette hypothèse de réseau cristallin en ce qui concerne la cornée. Cette approche n'est pas pertinente dans le cas de tissus, même si Feuk arrive à des conclusions intéressantes, et montre qu'un déplacement des fibrilles de collagène correspondant à 1/3 du diamètre total des fibrilles par rapport à un réseau idéal, ne produisait une diffusion que de 1% seulement.

2. Structure de la cornée et diffusion

2.1 Ordre et diffusion

Goldman et Benedek furent les premiers, dix ans après l'article de Maurice, à montrer qu'un ordre local des fibrilles de collagène au sein du stroma suffisait à expliquer la transparence du tissu [37]. Par analogie avec la théorie de la diffraction, ils parviennent à la conclusion que les fluctuations d'indice de réfraction inférieures à la demi-longueur d'onde ne peuvent produire de la diffusion optique. Pour les plus courtes longueurs d'onde du visible, cela correspond à une distance de 150 nm. Sachant que la distance interfibrillaire moyenne est de 60 nm, et que celle-ci est relativement stable, le milieu peut être considéré comme homogène pour les longueurs d'onde du visible. Ils ont constaté de plus que dans le cas des cornées œdémateuses, il existait des régions dépourvues de fibrilles de collagène, qu'ils appellent « lacs » et dont la taille excède la demi-longueur d'onde. Ce qui est donc à l'origine d'une fluctuation d'indice de réfraction, et donc de diffusion. Benedek a résumé cela en postulant que la lumière diffusée est produite par les fluctuations d'indice de réfraction dont les composantes de Fourier varient sur des distances supérieures à la demi-longueur d'onde. Le formalisme utilisé par Benedek est similaire à celui couramment utilisé pour l'étude de la diffraction des rayons X par les cristaux. Pour développer sa théorie, Benedek a utilisé l'approximation

de Rayleigh-Gans, équivalente en mécanique quantique de l'approximation de Born. Il ne prend donc pas en compte la perte de cohérence induite par la traversée du milieu. Il a de plus négligé la biréfringence du stroma cornéen. Plamann [15] a explicité dans la terminologie de Fourier le calcul de Benedek. Le champ électrique diffusé par une fibrille de collagène positionnée en \vec{r}_j et orientée selon l'axe z peut être décrit par:

$$\vec{E}_j(\vec{r}, t) = \vec{E}'_{0j} e^{j\vec{k}_0 \vec{r}} e^{i(\vec{k}_0 - \vec{k}) \cdot \vec{r}_j} e^{-i\omega_0 t} = \vec{E}'_{0j} e^{j\vec{k}_0 \vec{r}} e^{i\vec{K} \cdot \vec{r}_j} e^{-i\omega_0 t}$$

où \vec{E}'_{0j} est le champ diffusé par unité de longueur, \vec{k}_0 le vecteur d'onde incident, \vec{k} celui du champ diffusé et $\vec{K} = \vec{k} - \vec{k}_0$ est le vecteur de diffusion. À une distance éloignée de la cornée telle que l'on puisse écrire $|\vec{r} - \vec{r}_j| \approx |\vec{r}| \equiv r$, le champ diffusé par N fibrilles de collagène constituant la cornée est donné par:

$$\vec{E}_{TOTAL}(\vec{r}, t) = \sum_{j=1}^N \vec{E}'_j = \vec{E}'_0(\vec{r}) e^{i(\vec{k}_0 \vec{r} - \omega_0 t)} \sum_{j=1}^N e^{i\vec{K} \cdot \vec{r}_j} = \vec{E}'_0(\vec{r}) e^{i(\vec{k}_0 \vec{r} - \omega_0 t)} I$$

où I est appelée fonction d'interférence. I est responsable de l'effet collectif des fibrilles sur la diffusion. De plus, on a posé $\vec{E}'_{0j} = \vec{E}'_0$ car toutes les fibrilles sont identiques.

L'équation précédente peut être écrite sous forme d'intégrale dans la mesure où l'onde incidente éclaire une surface A contenant N fibrilles :

$$\vec{E}_{TOTAL}(\vec{r}, t) = \sum_{j=1}^N \vec{E}'_j = \vec{E}'_0(\vec{r}) e^{i(\vec{k}_0 \vec{r} - \omega_0 t)} \iint_A \left[\sum_{j=1}^N \delta(\vec{r} - \vec{r}_j) \right] e^{i\vec{K} \cdot \vec{r}_j} d^2 r$$

Dans cette équation, $\rho(\vec{r}) = \left[\sum_{j=1}^N \delta(\vec{r} - \vec{r}_j) \right]$ définit la distribution spatiale des fibrilles.

La fonction d'interférence devient alors lorsque $A \gg \lambda$:

$$I(\vec{K}) = \iint_A \rho(\vec{r}) e^{i\vec{K} \cdot \vec{r}_j} d^2 r = 2\pi \mathfrak{S}[\rho(\vec{r})]$$

La puissance diffusée par la surface A peut être calculée :

$$p(\vec{r}) = \frac{|E_{TOTAL}(\vec{r}, t)|^2}{2\eta} = (2\pi)^2 \frac{|E_0'(\vec{r})|^2}{2\eta} |\mathfrak{S}[\rho(\vec{r})]|^2$$

En appliquant le théorème de Wiener-Khinchin, on obtient finalement la relation :

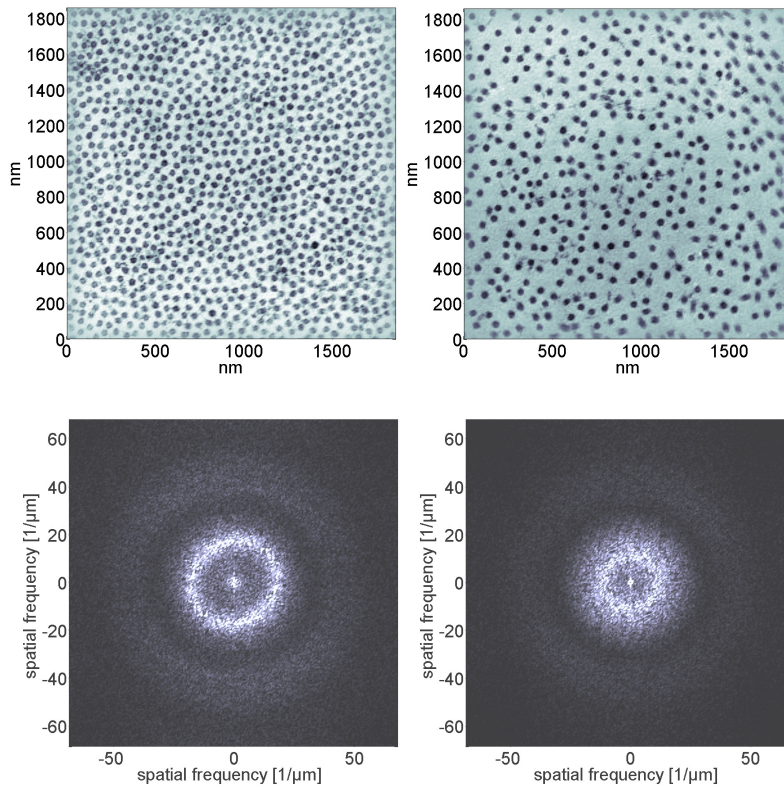
$$p(\vec{r}) = (2\pi)^2 \frac{|E_0'(\vec{r})|^2}{2\eta} \mathfrak{S}[R(\rho(\vec{r}))]$$

où $[R(\rho(\vec{r}))]$ est l'autocorrélation de la position des fibrilles.

Il existe donc une relation directe entre la puissance diffusée par une cornée et l'arrangement spatial des fibrilles de collagène au sein du stroma.

Hart et Farrell [39, 40, 41, 42], ont calculé la distribution radiale des fibrilles de collagène à partir d'images TEM. Ils ont également calculé l'intensité diffusée par une telle distribution par des calculs similaires et aboutissent à des résultats équivalents.

La figure 2 représente des images TEM de cornée claire et œdémateuse avec la fonction d'autocorrélation correspondante.



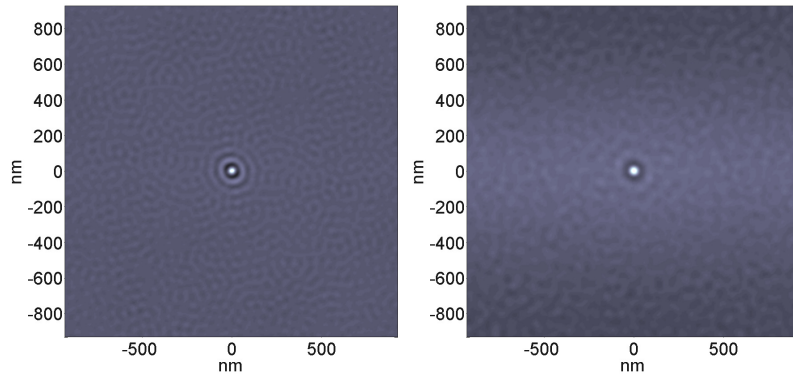


Figure 2. De haut en bas, images TEM d'une cornée claire (gauche) et œdémateuse (droite), avec la transformée de Fourier correspondante, puis le calcul d'autocorrélation des fibrilles [15].

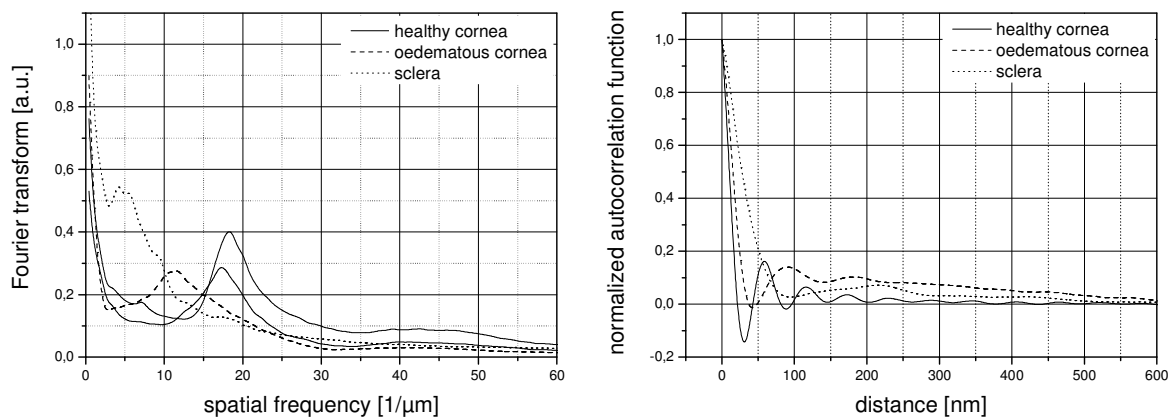


Figure 3. Transformée de Fourier (gauche) et autocorrélation (droite) correspondant à la figure 2 et projetées sur l'axe des fréquences spatiales, et sur l'axe des distances [15].

La projection axiale de ces résultats est présentée à la figure 3. On constate que pour une cornée claire, le rayon de l'anneau des composantes de Fourier correspondant à l'inverse de la distance interfibrillaire moyenne, est supérieur à celui d'une cornée œdémateuse. Autrement dit, la distance interfibrillaire moyenne augmente dans le cas d'une cornée œdémateuse. De plus, dans ce dernier cas, l'anneau paraît flouté et moins bien résolu, ce qui indique une plus grande dispersion des distances interfibrillaires autour de la moyenne. La figure d'autocorrélation montre dans le cas d'une cornée claire, plusieurs anneaux concentriques, indiquant une conservation de l'ordre sur plusieurs distances interfibrillaires. Cela n'est plus vrai dans le cas d'une cornée épaisse.

La puissance $P_\varepsilon(\theta_0)$ diffusée à l'angle ε autour de la direction θ peut être décrite par [15] :

$$P_\varepsilon(\theta_0) = \int_{\theta_0-\varepsilon}^{\theta_0+\varepsilon} d\theta p(\vec{r}) = 2\pi \frac{E_0^2}{\eta\lambda_i^3} (\pi a)^4 (m-1)^2 \int_{\theta_0-\varepsilon}^{\theta_0+\varepsilon} d\theta \left| 1 + \left(\frac{2}{m^2+1} \right) \cos^2 \theta \right| \left| \mathfrak{S}[\rho(\vec{r})] \right|_{\vec{K}=2|\vec{k}_0|\sin\frac{\theta}{2} r d\theta}^2$$

On constate d'abord un comportement en λ^{-3} , typique d'un diffuseur de Rayleigh monodimensionnel. Le vecteur de diffusion décrit un cercle de rayon \vec{K} dans le spectre de Fourier des distributions de fibrilles (figure 4). Lorsque la cornée est claire, le cercle est entièrement contenu dans l'anneau des composantes de Fourier. Le vecteur de diffusion interagit dans ce cas principalement avec la distribution centrée aux fréquences zéro. Cela s'exprime par une diffusion vers l'avant et donc par la transparence du tissu. Dans le cas de la cornée œdémateuse, le pic central est plus large et la transmission est déviée de l'axe optique. Les longueurs d'onde plus courtes interagissent principalement avec l'anneau et sont davantage rétrodiffusées.

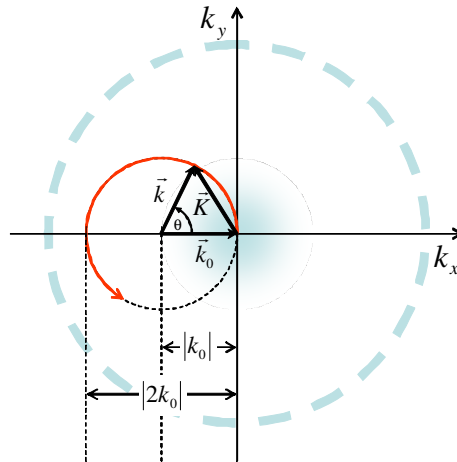


Figure 3. Vecteur de diffusion représenté dans l'espace de Fourier [15].

2.2 La cornée : un liquide photonique ?

Après les nombreux débats ayant suivi la publication du papier de David Maurice, Hart et Farrell ont tranché le débat au début des années 1970 en reprenant les calculs de celui-ci, et en montrant qu'un ordre local des fibrilles était suffisant afin d'expliquer la transparence du tissu cornéen dans le spectre visible de la lumière. Pour cela il a utilisé le formalisme alors utilisé dans la diffraction des rayons X par des liquides présentant une

certaine corrélation d'ordre des molécules les constituant. Plus spécifiquement, Hart et Farrell ont calculé la fonction de distribution radiale des fibrilles à partir d'images TEM de la cornée saine. Comme nous l'avons vu, une diffusion incohérente des différentes fibrilles de collagène consiste en une simple sommation des sections efficaces de diffusion. Hart et Farrell, pour prendre en compte la diffusion cohérente ont formulé la section efficace totale de diffusion d'une cornée [36] :

$$\sigma_{Total} = \sigma_f - \frac{4\pi\rho_1}{k_0} \int_0^R r[1 - g(r)][G_1(r) + G_2(r)]dr \quad (3)$$

où σ_f est la section efficace de diffusion d'une fibrille, ρ_1 la densité de fibrilles, $G_1(r)$ et $G_2(r)$ les intégrales des fonctions de Bessel, et $g(r)$ la fonction de distribution radiale des fibrilles de collagène. La fonction de distribution radiale est directement reliée au facteur de structure par une simple relation de Fourier :

$$S(q) = 1 + \rho_1 \int_{Volume} d\vec{r} e^{-i\vec{q}\vec{r}} [g(r) - 1]$$

Le facteur de structure peut être directement mesuré par diffraction des rayons X. Une corrélation importante des diffuseurs dans un milieu inhomogène en terme d'indice de réfraction diminue la section efficace totale de diffusion. En l'absence de toute corrélation spatiale, comme nous l'avons vu, l'atténuation du faisceau est donnée par $\alpha = \sum_i \sigma_i$ où i est un diffuseur unique. Dans notre cas σ_i est la section efficace de diffusion d'une fibrille unique. Dans le cas où les diffuseurs sont identiques et où les interactions entre diffuseurs peuvent être négligées, on peut écrire $\alpha = \rho\sigma_i$, avec ρ la densité de particules.

L'intensité d'une onde diffusée par un ensemble de N particules peut être décrite par :

$$I(q) = E(q)^2 = NE_0(q)^2 S(q)$$

où le facteur de structure est donné par : $S(q) = \frac{\left| \sum_i \exp(i\vec{q}\vec{r}_i) \right|^2}{N}$, où \vec{r}_i est la position des fibrilles de collagène. Une corrélation spatiale importante des diffuseurs diminue

considérablement $S(q)$ qui est égal à 1 pour un système parfaitement non corrélé. Dans le cas de diffuseurs de type Rayleigh, le facteur de structure peut être considéré comme constant [44]. Le facteur d'atténuation s'écrit alors :

$$\alpha = \rho\sigma S(q) = \rho\sigma S_0$$

On voit donc qu'une corrélation importante diminue l'atténuation. Les interférences constructives entre les différents diffuseurs sont plus importantes et le milieu est davantage transparent. Mattarelli et Montagna, ont expliqué par ce formalisme [44] la transparence importante des céramiques de verre dopées par nanocristaux. Dans un domaine très différent de l'optique des tissus et avec un formalisme différent, ils sont parvenus à des conclusions identiques à celles que Maurice a obtenu pour la cornée. On voit ainsi que ce formalisme peut être appliqué au cas de la cornée.

3. Imagerie de la cornée saine et œdémateuse

Diverses mesures de diffusion par des cornées claires et œdémateuses ont été réalisées pendant cette thèse. Nous présentons ici les résultats obtenus et tenterons d'expliquer la transparence et la perte de transparence du tissu cornéen. Les résultats obtenus seront comparés à des images obtenues par microscopie électronique ainsi que par tomographie à cohérence optique (OCT).

3.1 Structure de la cornée saine et œdémateuse

Nous avons vu que la structure de la cornée influait directement sur ses propriétés optiques. La figure 4 compare l'ultrastructure d'une cornée saine avec celle d'une cornée œdémateuse. On voit l'arrangement régulier des fibrilles de collagène dans la cornée claire et la perturbation de cet ordre dans le cas d'une cornée opaque.

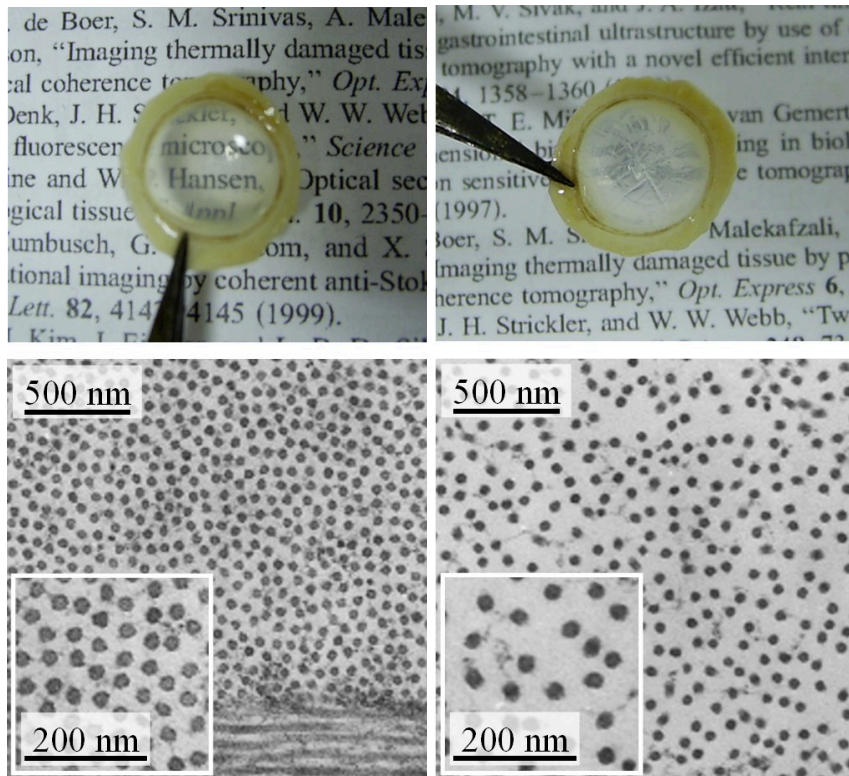


Figure 4. Arrangement des fibrilles de collagène au sein du volume du stroma dans la cornée saine (gauche) et œdémateuse (droite) [15]

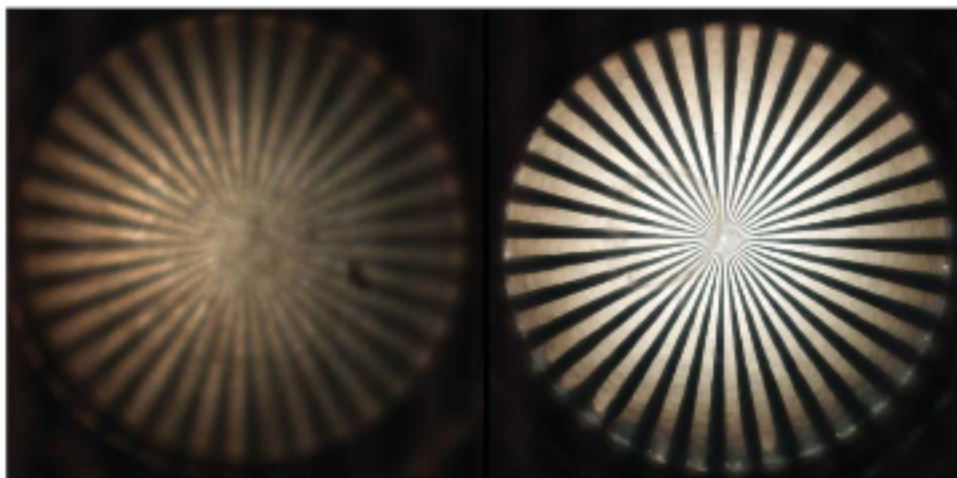


Figure 5. Cornées claire (droite) et œdémateuse (gauche) placées sur une mire circulaire et observées sous une loupe.

La figure 5 compare deux cornées, l'une claire, l'autre œdémateuse, placées au dessus d'une mire centrosymétrique et observée sous un microscope⁷. On peut constater le teint rougeâtre dans le cas de la cornée épaisse. De plus les fréquences spatiales de la

⁷ Microscope AZ100 de la société Nikon. Il s'agit d'un microscope multizoom où l'on peut observer un objet avec un agrandissement loupe ainsi qu'avec un agrandissement microscopique. Davantage de détails seront donnés au chapitre suivant

mire sont moins bien résolues que pour une cornée claire. Cela indique une dépendance à la longueur d'onde de la diffusion et semble corroborer le modèle présenté ci-dessus. Cependant, une série d'images présentant l'évolution de la structure d'une cornée au cours de son épaissement a été réalisées.

3.1.1 Coupes histologiques

Les mesures sont réalisées sur des cornées provenant de la banque française des yeux. Celles-ci, sont destinées à un usage scientifique car non greffables pour cause de densité endothéliale insuffisante⁸. Les cornées sont conservées dans le milieu CorneaMax⁹ pour les rendre œdémateuses et stockées dans un incubateur à 32° Celsius. L'eau est absorbée dans le tissu, celui-ci enflé, son ultrastructure est perturbée et le tissu devient opaque. Il est ensuite possible par pression osmotique, de diminuer l'épaisseur de la cornée et de la ramener à son état physiologique. Pour cela une solution osmotique dite de déturgescence est préparée à base de liquide physiologique Hank's dans laquelle on ajoute du Dextran (chaîne de polysaccharides utilisée en remplacement de plasma ou pour créer des larmes artificielles) dosé à 5%. Des antibiotiques sont ajoutés afin de prévenir toute contamination. Les cornées sont placées dans la solution de déturgescence et des mesures d'épaisseurs sont régulièrement faites à l'aide d'un pachymètre à ultrason¹⁰. La figure 6 représente l'évolution caractéristique de l'épaisseur d'une cornée de banque placée dans une telle solution de déturgescence¹¹. Afin d'étudier l'évolution de l'ultrastructure de la cornée, trois cornées de banque ont été placées dans une solution de déturgescence dosée à 5% de Dextran et leur épaisseur a été mesurée à des temps de déturgescence différents. Les cornées ont été fixées après la mesure de pachymétrie dans du glutaraldéhyde à 2,5% en tampon cacodylate (0,1M, pH 7,4). Une fixation supplémentaire au tétroxyde d'osmium a été réalisée (0,2M pH 7,4).

⁸ Les critères de sélection de cornée par les banques des yeux seront explicités au §3.1.1

⁹ Provenance : Eurobio, Courtaboeuf, France

¹⁰ Pocket II, Quantel Medical, France

¹¹ Étude réalisée par **Donald Peyrot** dans le cadre de son post doctorat

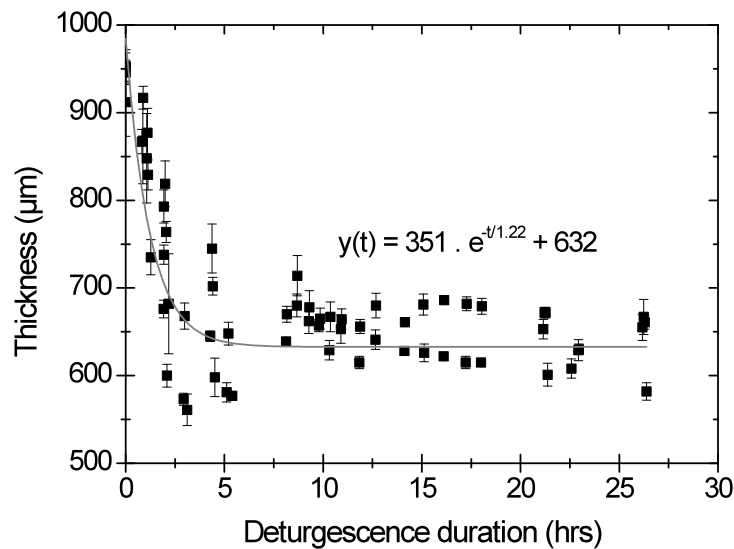


Figure 6. Évolution de l'épaisseur d'une cornée de banque dans une solution de déturgescence à base de Dextran dosé à 5%.

Les cornées ont ensuite été progressivement déshydratées dans des solutions d'éthanol puis dans une solution d'oxyde de propylène. Des coupes semi-fines sont ensuite effectuées à l'aide d'un ultramicrotome¹² et les spécimens sont colorés au bleu de toluidine. Des images histologiques sont réalisées, ainsi que des images en microscopie électronique.

	Pachymétrie	Centre	----->	Périphérie
Cornée A	530 µm	435 µm	460 µm	485 µm
Cornée B	700 µm	565 µm	560 µm	535 µm
Cornée C	900 µm	656 µm	635 µm	630 µm

Tableau 1. Épaisseurs de cornées A, B, C au centre avant fixation, et du centre vers la périphérie après fixation.

Les mesures des épaisseurs des différentes cornées sont présentées dans le tableau 1. La cornée A a été fixée alors que son épaisseur était proche de l'épaisseur physiologique et qu'elle paraissait optiquement transparente. La cornée B a été fixée à une épaisseur de 700 µm, avec un œdème relativement développé, et la cornée C à 900 µm était très œdémateuse au moment de la fixation. Après fixation et déshydratation, les cornées ont

¹² OmU2, Reichert, Australie

vu leur épaisseur considérablement diminuer. Plus le degré d'œdème était important, plus la cornée a perdu de son épaisseur lors de la déshydratation.

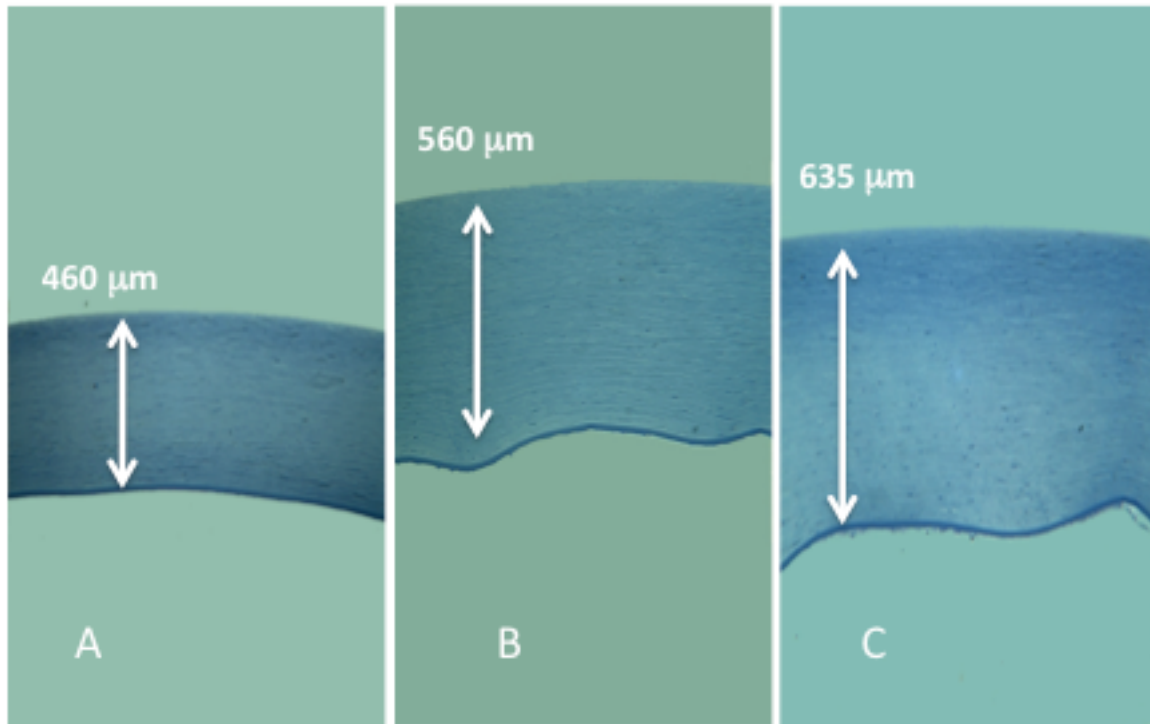


Figure 7. Coupes des cornées réalisées au niveau du centre de la cornée. Les cornées A, B, et C sont représentées respectivement de la gauche vers la droite. Les explications sont dans le texte. On observe la couche de Descemet en bas. L'endothélium n'est plus présent.

La figure 7 représente des images réalisées pour ces trois cornées¹³. On peut observer une plus grande régularité des différentes lamelles dans le cas de la cornée A. Pour la cornée C, très œdémateuse, les lamelles sont moins bien définies. On observe un éclaircissement progressif de la coloration en bleu de toluène de la membrane de Bowman (partie antérieure) à la membrane de Descemet (partie postérieure). Cet éclaircissement indique une diminution de la densité de matière et témoigne de l'évolution progressive de l'œdème cornéen depuis la membrane de Descemet et vers la partie antérieure. L'endothélium en effet, dans le cas d'une cornée œdémateuse n'est pas en mesure de jouer son rôle de contrôle des flux et son rôle d'étanchéité, et c'est à ce niveau que l'eau va pénétrer le tissu.

¹³ Toutes les photos d'histologie et d'ultrastructure ont été réalisées au laboratoire de recherche en ophtalmologie de l'Hôtel Dieu par **Michelle Savoldelli**.

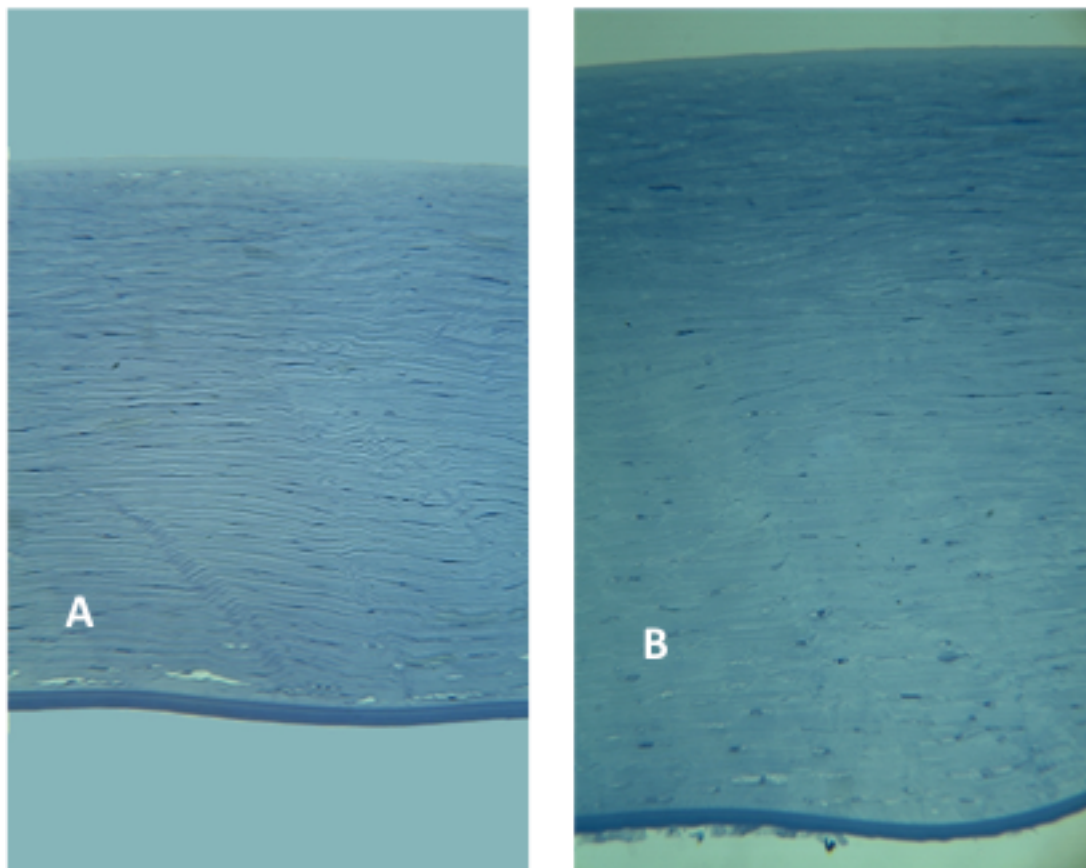


Figure 8. Cornée A et C avec un agrandissement plus important.

Les images de microscopie électronique à transmission de ces mêmes cornées sont présentées aux figures 9, 10 et 11. On remarque l'agencement régulier des lamelles de collagène et l'ordre relatif des fibrilles en leur sein dans le cas de la cornée A. Cet ordre est davantage perturbé avec l'augmentation de l'œdème. Une analyse méticuleuse des images obtenues montre une perturbation de plus en plus importante de l'ordre à mesure que l'on s'approche de la membrane de Descemet. Nous nous limitons dans ce chapitre à présenter une analyse qualitative de ces images. Une analyse quantitative requiert un grand nombre de cornées et d'images de microscopie électronique. Toutefois, ces images permettent de voir clairement l'évolution de l'œdème au niveau de l'ordre des fibrilles d'une part, et de la façon dont évolue l'œdème depuis la membrane de Descemet et jusqu'à la partie antérieure du stroma cornéen d'autre part.

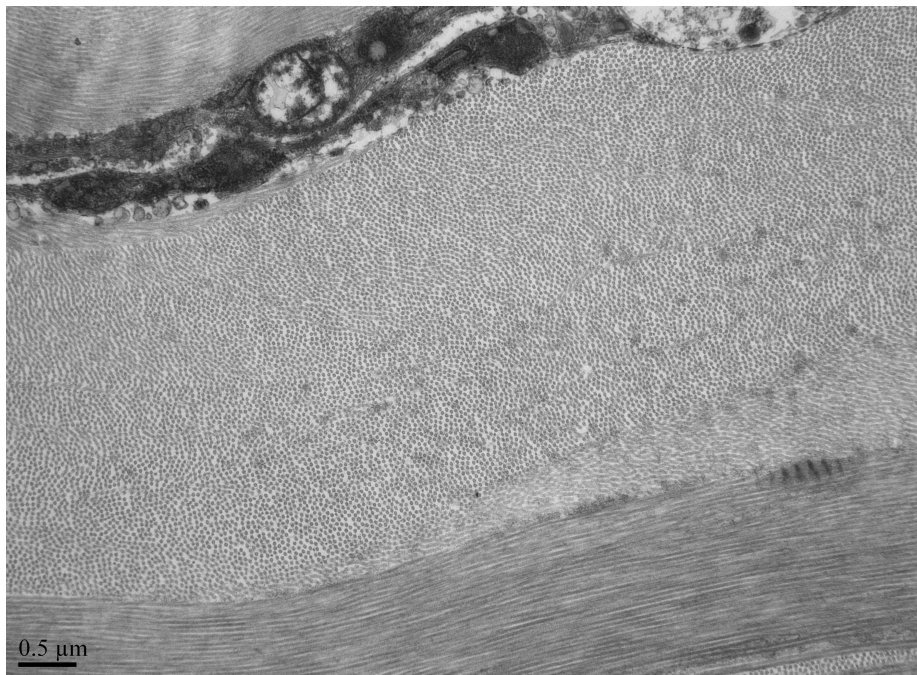
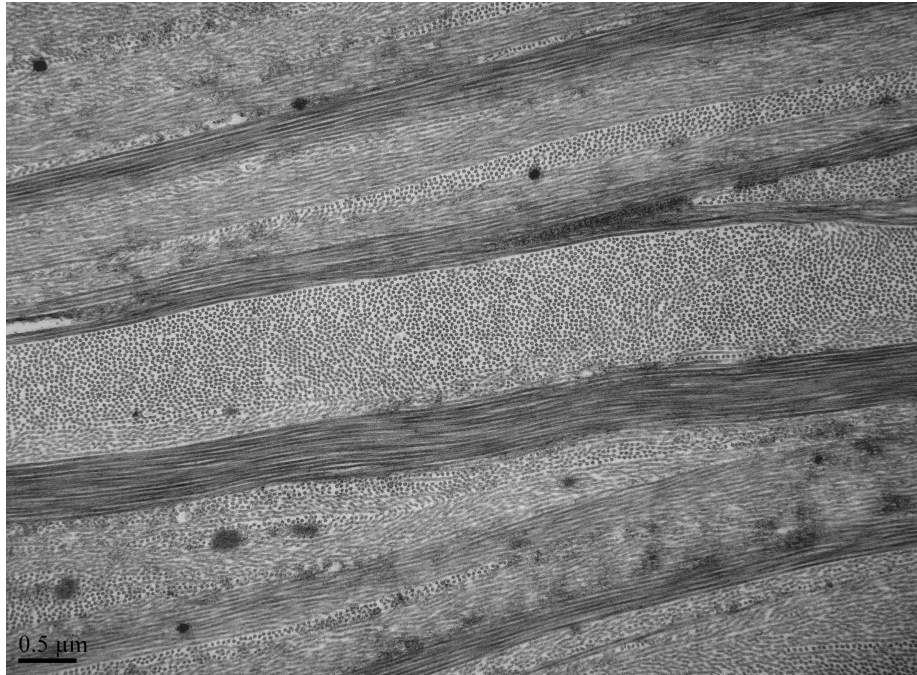


Figure 9. Images de microscopie électronique à transmission (TEM) de la cornée A. On constate l'organisation des fibrilles de collagène au sein du stroma.

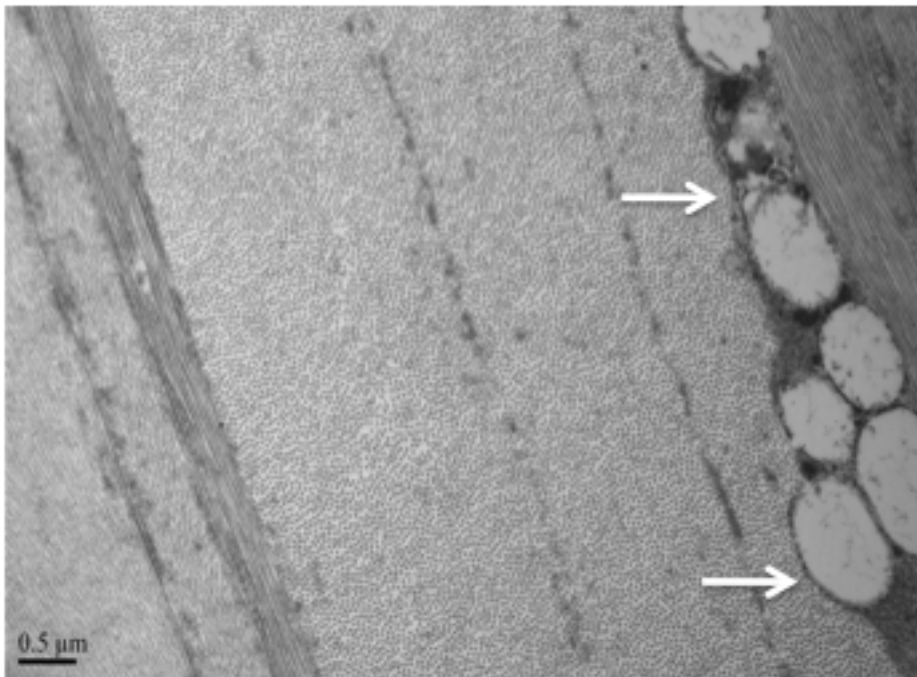
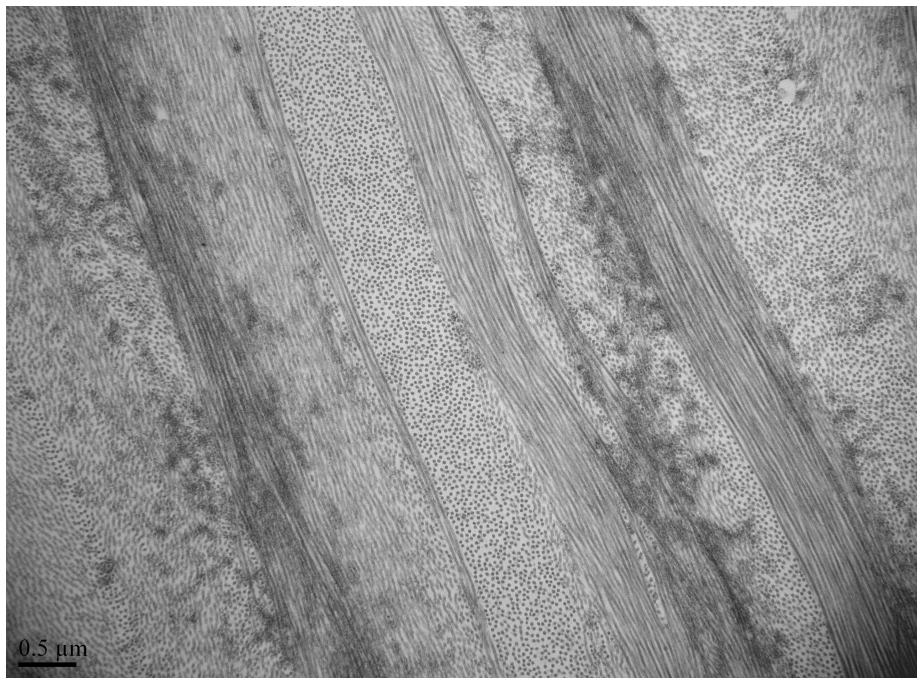


Figure 10. Images de microscopie électronique à transmission (TEM) de la cornée B. On voit apparaître dans la partie droite de l'image du bas un kératocyte mort (flèches blanches).

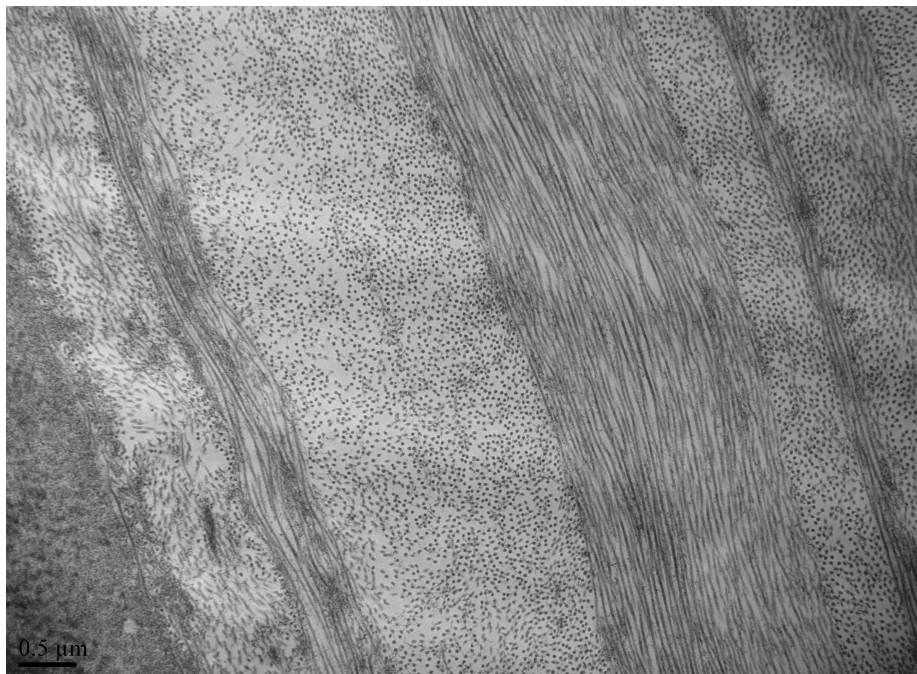
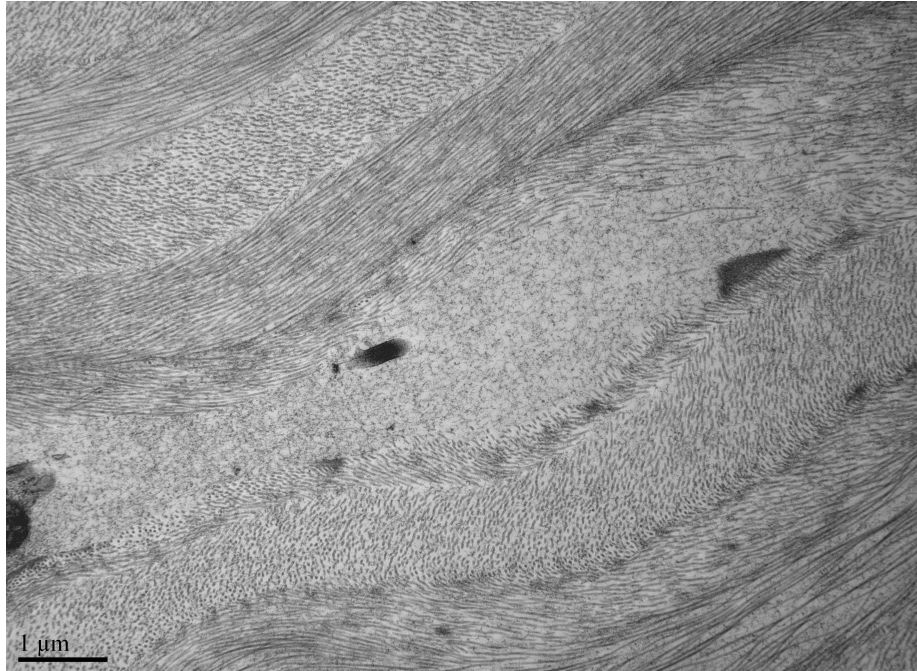


Figure 11. Images de microscopie électronique de la cornée C. On voit clairement la perturbation de l'ordre au niveau des fibrilles de collagène au sein des différentes lamelles présentant différentes orientations. La distance interfibrillaire a également augmenté.

3.2 Images OCT de cornées claires et œdémateuses

Des mesures en tomographie à cohérence optique (OCT) de cornées claires et œdémateuses ont été réalisées¹⁴. Le procédé de déturgescence est celui explicité au §3.1.1. Le dispositif et l'ensemble des résultats seront présentés au chapitre suivant en parallèle des résultats de diffusion obtenus. Il s'agit ici d'observer l'évolution de la structure cornéenne en fonction de son épaisseur.

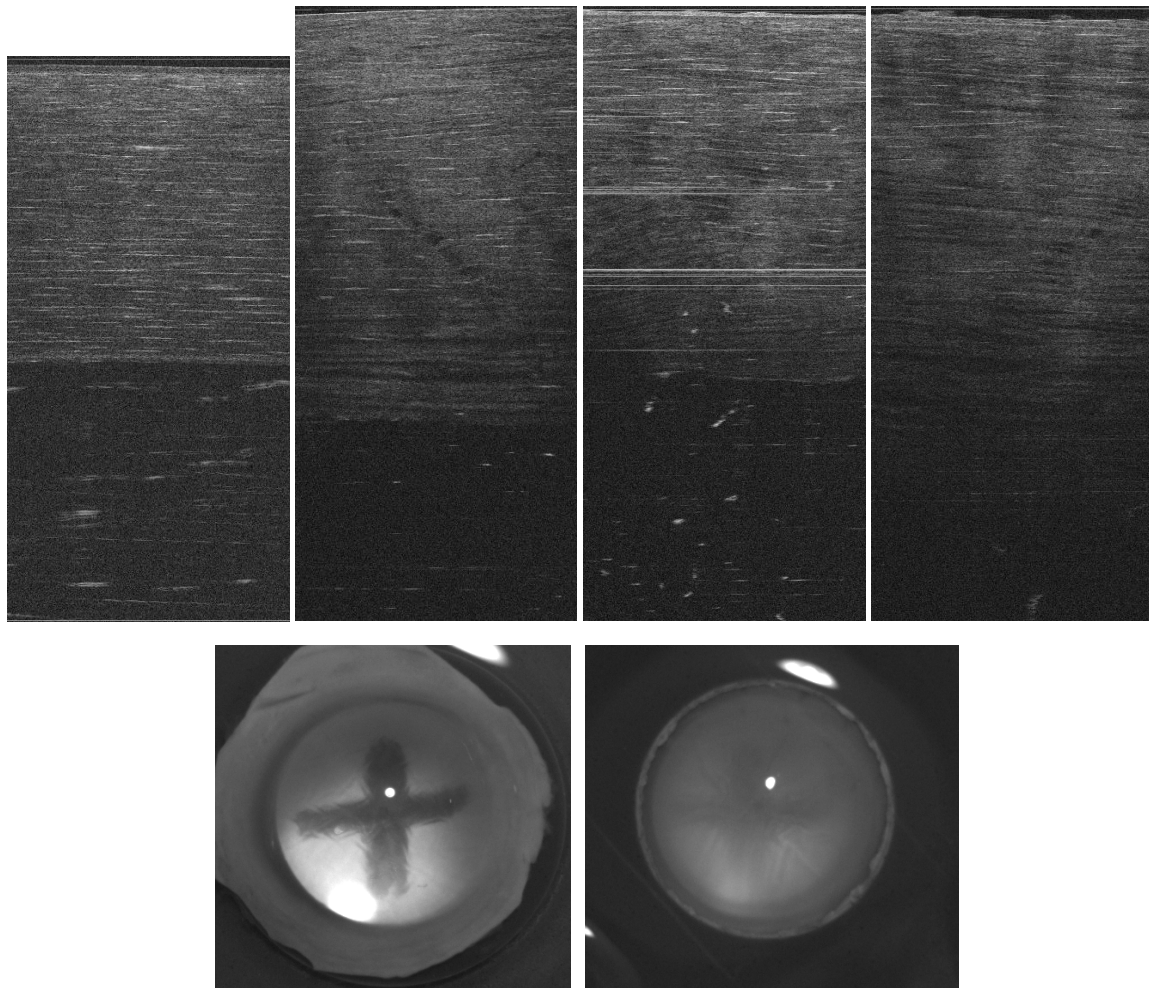


Figure 12. Images OCT de cornées présentant différents états d'œdème. En haut, de gauche à droite, les épaisseurs ont été mesurées à 596 μm , 800 μm , 930 μm et 1180 μm . En bas, cornée de 596 μm (gauche) et de 1180 μm (droite).

¹⁴ Les mesures ont été réalisées à l'Institut Fresnel de Marseille dans le cadre d'une collaboration avec Gaëlle Georges et Olivier Casadessus.

On observe sur une cornée proche de l'épaisseur physiologique les différentes réflexions issues des interfaces séparant les différentes lamelles. Sur les cornées œdémateuses ces réflexions disparaissent progressivement. En parallèle apparaissent des régions micrométriques de couleur noire en forme de disques étendus. On observe donc l'apparition de « lacs » pour des cornées dont l'épaisseur dépasse les 800 μ m. Ces « lacs » déjà observés par certains auteurs cités précédemment [28,38], correspondent à des régions dénuées de fibrilles de collagène et apparaissent avec l'œdème. La disparition progressive des interfaces, et l'apparition de ces structures qui paraissent noires, indiquent un mode de diffusion différent pour ces lacs par rapport aux fibrilles de collagène, et notamment l'absence de rétrodiffusion.

3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté l'état de l'art en ce qui concerne la diffusion de la cornée. Nous savons depuis longtemps que cette diffusion est directement liée à l'ultrastructure de la cornée. L'objet de cette thèse est de montrer l'évolution de cette diffusion avec l'état d'œdème de la cornée et une meilleure compréhension des phénomènes impliqués dans le processus de diffusion optique. Dans ce chapitre nous avons également montré les points suivants:

- *La possibilité d'agir sur le degré d'œdème de la cornée par pression osmotique ;*
- *L'épaisseur de la cornée est corrélée à son degré de transparence ;*
- *On observe l'évolution de l'ultrastructure de la cornée par des procédés d'imagerie micro et macroscopique ;*
- *L'ordre des fibrilles de collagène est de plus en plus perturbé avec l'apparition de l'œdème ;*
- *L'apparition de structures appelées « lacs » dans le cas des cornées fortement œdémateuses. Ces structures semblent avoir un mode de diffusion différent de celui de la cornée ;*
- *Chaque cornée possède une signature unique, et seule une statistique importante permettrait de lier le degré de diffusion d'une cornée à son épaisseur.*

Ces observations nous permettent de confirmer un modèle de diffusion de la cornée prenant en compte d'une part le facteur de structure lié à la disposition particulière des fibrilles de

collagène, et d'autre part l'apparition de lacs dans le cas des cornées très œdémateuses. Dans les prochains chapitres, nous tenterons d'étudier expérimentalement l'importance de chacune de ces contributions à la diffusion cornéenne selon l'état d'œdème de la cornée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Brewster D 1815 *Phil. Trans. R. Soc. London* **105** 29-53
- [2] Aubert H and Mattieson L 1876 in: Graefe-Saemisch, *Handbuch der gesammten Augenheilkunde* Band I, Teil 2, Engelmann, Leipzig
- [3] Stanworth A and Naylor E J 1950 *Br. J. Ophthalmol.* **34** 201-11
- [4] Potts A M, Friedman B C 1959 *Am. J. Ophthalmol.* **48** 480-7
- [5] Bullot G 1904 *Am. J. Physiol.* **12** 297-303
- [6] Fischer F P 1926 *Arch. f. Augenheilk.* **98** 41-63
- [7] Cogan D G 1948 *Ber. über die 54. Zusammenkunft der Dtsch. Ophthalmol. Ges. in Heidelberg* 6-13
- [8] Maurice D M and Giardini A A 1951 *Brit. J. Ophtal.* **35** 791-7
- [9] Hodson S A 1997 *Progress in Retinal and Eye Research* **16** (1) 99-116
- [10] Fischbarg J 2003 *Journal of Experimental Zoology* **300A** 30-40
- [11] Diecke F P J 2007 *Biochimica et Biophysica Acta* **1768** 2043-8
- [12] Meek K M, Fullwood N J, Cooke P H, Elliott G F, Maurice D M, Quantock A J and Wall R S 1991 *Biophys. J.* **60** 467-74
- [13] Meek K M and Leonard D W 1993 *Biophys. J.* **64** 273-80
- [14] Cogan D G 1948 *Ber. über die 54. Zusammenkunft der Dtsch. Ophthalmol. Ges. in Heidelberg* 6-13
- [15] K. Plamann et al. – Ultrashort pulse laser surgery for the cornea and the sclera, *Journal of Optics*, 2009
- [16] Schwarz W 1953 *Z. Zellforsch.* **38** 26-49
- [17] Duke-Elder S. *Textbook of ophthalmology*, vol 1. Biological optics; the absorption of radiant energy by the ocular tissues. London: Kimpton:1932:809-18.
- [18]. Fuchs's textbook of ophthalmology. 8th ed. USA: Duane Lippincott,1919:72-3.
- [19] Leber T. The circulation and nutritional relations to the eye. In: Graefe-Saemisch *Handbuch der Gesamp- ten Augenheilkunde*. Vol. 2. Leipzig: Engelmann, 1903:101-491
- [20] Bowman W. In: *Lectures on the parts concerned in the operations on the eye and on the structure of the retina*. London: Longman, Brown, Green and Longman's,1849:1-143.

- [21] Kinsey VE, Cogan DG. The cornea: physiological aspects. *Arch Ophthalmol* 1942;28:661-9.
- [22] Aurell G, Holmgren H. On the metachromatic staining of corneal tissue and some observations on its transparency. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1953;31: 1-27.
- [23] Smith JW. The transparency of the corneal stroma. *Vision Res* 1969;9:393-6.
- [24] Bettelheim FA, Kumbar M. An interpretation of small angle light scattering patterns of human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:233-6.
- [25] Bettelheim FA, Magrill R. Small angle light scattering patterns of corneas of different species. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:236-40.
- [26] Kikkawa Y. Diffraction spectra produced by rabbit cornea. *Jpn J Physiol* 1958;8:138-47.
- [27]. Kikkawa Y. Light scattering studies of the rabbit cornea. *Jpn J Physiol* 1960;10:292-302.
- [28]. Maurice DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol (Lond)* 1957;136:263-86.
- [29] McCally RL, Farrell AR. Structural implications of small angle light scattering from cornea. *Exp Eye Res* 1982;34:99-113. Stanworth A, Naylor EJ. Polarised light studies of the cornea. I. The isolated cornea. *J. Exp. Biol* 1953;30:160-3.
- [30] Schwarz W. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Aufbau der Sklera und der Cornea des Menschen. *Z Zellforsch* 1953;38:26-49.
- [31] Davson H. Anatomy and physiology of the cornea. In: Rycroft BW, editor. *Corneal grafts*. London: Butterworth, 1955:31-5.
- [32] Feuk T 1970 *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **17** (3) 186-90
- [33] Feuk T 1971 *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **18** (2) 92-6
- [35] Ameen D B, Bishop M F and McMullen T 1996 *Biophys. J.* **70 A** 431
- [36] Ameen D B, Bishop M F and McMullen T 1998 *Biophys. J.* **75** 2520-1
- [37] Goldman J N, Benedek G B, Dohlman C H and Kravitt B 1968 *Investigative Ophthalmology* **7** (5) 501- 19
- [38] Benedek GB. Theory of the transparency of the eye. *Appl Opt* 1971 ;10 :459-73.
- [39] Hart R W and Farrell R A 1969 *J. Opt. Soc. Am.* **59** 766-74
- [40] Farrell R A, McCally R L and Tatham P E 1973 *Physiol.* **233** 589-612
- [41] Farrell R A and McCally R L 1976 *J. Opt. Soc. Am.* **66** (4) 342-5
- [42] Cox J L, Farrell R A, Hart R W and Langham M E 1970 *J. Physiol.* **210** 601-16

[43] Peyrot D, Marciano T et al. Effet of Incident Light Wavelength and Corneal Edema on Light Scattering and Penetration : Laboratory Study of Human Corneas, JRS, 2010.

[44] Mattarelli M, Montagna M. Ultratransparent glass-ceramics : the structure factor and the quenching of the Rayleigh scattering. Appl. Phys. Lett, 2008.

CHAPITRE III : Mesure de la diffusion de la cornée

Nous avons dans le chapitre précédent, revu les grandes lignes théoriques permettant de comprendre les processus physiques impliqués dans la diffusion de la lumière par le tissu cornéen.

Dans le présent chapitre nous présentons les différentes mesures réalisées dans le cadre de cette thèse sur les cornées claires et œdémateuses.

Nous présenterons d'abord le résultat des mesures spectrales réalisées dans le cadre du séjour postdoctoral de Donald Peyrot, mesures qui ont donné lieu à un premier article sur le sujet.

Ces mesures ont ensuite été complétées par des mesures goniométriques à différentes longueurs d'onde dans le cadre d'un séjour expérimental réalisé durant cette thèse à l'Institut Fresnel de Marseille.

Ces deux séries de mesures se complètent et permettent de caractériser la diffusion du tissu cornéen à différents degrés d'œdème. Elles permettent également et de la relier grâce à l'imagerie de la cornée par OCT et TEM à l'ultrastructure du tissu.

1. Mesures de la transmission directe et totale et calcul de la diffusion du tissu cornéen

Cette étude a été réalisée dans le cadre du séjour postdoctoral de Donald Peyrot au sein du groupe Optique-Photonique-Santé (OPS) du Laboratoire d'Optique Appliquée (LOA). Les travaux réalisés [1] ont permis de compléter les données déjà existantes dans la littérature et ont été initiatrices des autres projets réalisés pendant cette thèse.

1.1. Montage expérimental

La méthode de quantification de la diffusion optique cornéenne est basée sur la détermination de l'absorption de la lumière par le tissu cornéen. Nous réalisons cela par la mesure de la quantité de lumière transmise à travers le tissu. On distingue :

- la quantité de lumière transmise T à travers la cornée ;
- la quantité de lumière absorbée T_A par le tissu ;
- la lumière réfléchiée par le volume cornéen T_R .

Après normalisation, la relation suivante existe entre ces trois grandeurs :

$$T + T_A + T_R = 1 . \quad (1)$$

Nous pourrions également dissocier la transmission directe de la transmission totale . La transmission totale est une mesure de la quantité totale de lumière incidente transmise à travers le tissu. La transmission directe mesure la quantité de lumière incidente transmise à travers le tissu dans la direction de l'axe optique. On a :

$$T = T_T + T_D \quad (2)$$

La quantité de lumière diffusée en dehors de l'axe optique correspond donc à :

$$\Xi = \frac{T_T - T_D}{T_T} = 1 - \frac{T_D}{T_T} \quad (3)$$

Chacune des quantités définies ci-dessus peut être exprimée en fonction de la profondeur de pénétration qui lui est associée. On définit δ_A ¹⁵, la profondeur de pénétration correspondant à l'absorption et δ_D , celle associée à la diffusion.

On peut alors écrire :

$$T = 1 - T_A = e^{-\frac{L}{\delta_A}} \quad (4)$$

$$T_D = e^{-\frac{L}{\delta_A}} \cdot e^{-\frac{L}{\delta_D}} = e^{-\frac{L}{\delta_E}} \quad , \quad (5)$$

où L est la distance optique parcourue , et δ_E la profondeur de pénétration effective.

Nous avons donc les relations :

$$\begin{aligned} \delta_A &= \frac{-L}{\ln(T_T)} \\ \delta_E &= \frac{-L}{\ln(T_D)} \end{aligned} \quad \delta_D = \frac{-L}{\ln \frac{T_D}{T_T}} \quad . \quad (6)$$

La profondeur de pénétration δ_D est liée à la section efficace σ de diffusion par la relation suivante :

$$\delta_D = \frac{1}{\eta\sigma} \quad , \quad (7)$$

η étant la densité de particules diffusantes (ici, on a considéré les fibrilles de collagène).

Nous voyons que toutes ces relations peuvent être déduites à partir de T_D , de T_T , et de T_R .

¹⁵ Le critère adopté ici pour la définition de la profondeur de pénétration est la distance pour laquelle la lumière incidente voit son intensité diminuée par $1/e$.

Trois dispositifs optiques ont donc été montés afin de mesurer ces différentes transmissions. Ces dispositifs sont schématisés à la figure 1.

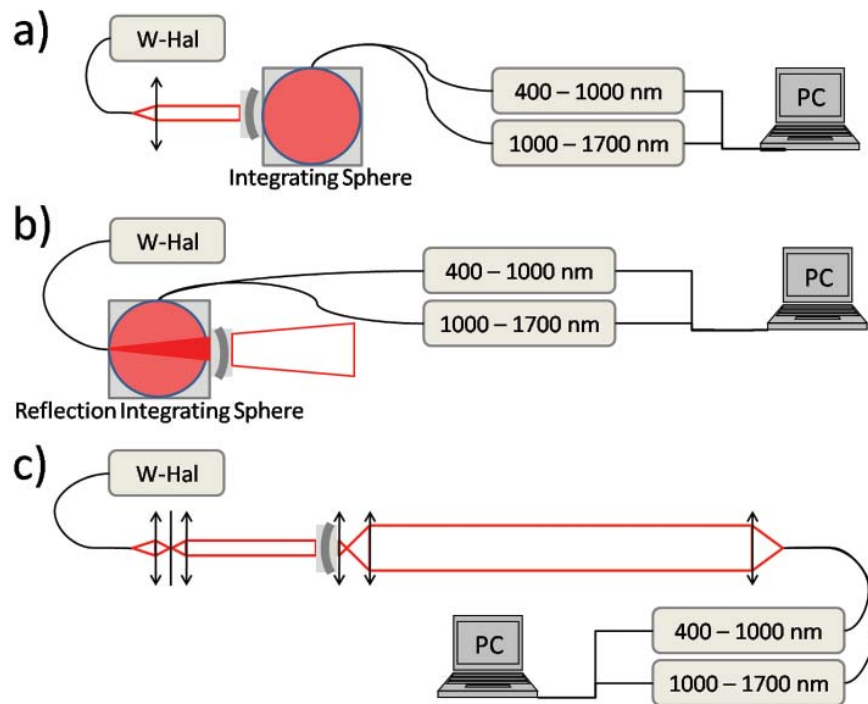


Figure 1. Dispositifs optiques permettant de mesurer : la transmission totale (a), la lumière rétrodiffusée (b), et la transmission directe (c). La figure est issue de [1].

Le montage (b) de la figure 1 permet de mesurer la transmission totale à travers la cornée. Une source provenant d'une lampe halogène (200-2500 nm) est collimatée et dirigée vers la cornée maintenue dans un porte-échantillon spécialement conçu. Une sphère intégrante¹⁶ placée directement derrière la cornée recueille la lumière transmise. Deux spectromètres¹⁷ permettent de réaliser la mesure.

Afin de mesurer la transmission directe, une géométrie confocale a été adoptée (figure 1.c). La source halogène est couplée dans une fibre optique multimodale. À la sortie de la fibre, la source est spatialement filtrée puis collimatée. La lumière transmise à travers la cornée parcourt une distance de 750 mm avant d'être couplée à nouveau dans une fibre

¹⁶ FOIS-1, Ocean Optics, Dunedins, Floride, États-Unis.

¹⁷ Un spectromètre mesurant le spectre de la lumière visible (400nm à 1000nm) et un second mesurant la lumière infrarouge (1000nm à 1700nm). Les deux spectromètres viennent de chez Avantès.

optique reliée aux spectromètres. L'angle solide correspondant équivaut à $\Omega=1*10^{-7}$ sr. Les photons arrivant dans cet angle solide sont considérés comme non diffusés.

1.2. Préparation des échantillons de cornées humaines

L'ensemble des études réalisées dans le cadre de cette thèse est conforme aux accords de la déclaration d'Helsinki¹⁸ [2]. Les cornées, fournies par la banque française des yeux, sont prélevées sur l'œil de donneurs décédés. Afin de mesurer différentes épaisseurs de cornées, celles-ci ont subi un processus de déturgescence selon le procédé décrit au §3.1.1 du chapitre II.

1.3. Porte-échantillon

Les surfaces internes et externes de la cornée correspondant respectivement à l'endothélium et à l'épithélium (cf. Chapitre I) présentent à l'état brut de nombreux plis induisant une diffusion de surface dont il est nécessaire de s'affranchir pour mesurer la diffusion du stroma cornéen. Un porte échantillon a été conçu à cette fin. Son principe repose sur l'insertion du tissu cornéen entre deux lentilles plan-concave et plan-convexe respectant les courbures antérieure et postérieure de la cornée. Une goutte de liquide physiologique est insérée entre les faces de la cornée et les lentilles. Le porte-échantillon permet donc d'une part, de supprimer la diffusion de surface, et d'autre part de compenser les effets de lentilles de la cornée.

1.4. Résultats

Les résultats des mesures présentées ici ont été réalisés sur une série de 50 cornées humaines. Chacune de ces cornées a subi un processus de déturgescence tenant compte des caractéristiques présentées au §3.1.1 du chapitre II. Les différentes mesures spectrales ont été réalisées à des temps différents du processus de déturgescence pour

¹⁸ Déclaration relative aux principes éthiques applicable à la recherche médicale impliquant des êtres humains et adoptée par la 18^{ème} assemblée générale de l'association médicale mondiale (AAM) à Helsinki, Finlande, en Juin 1964. Cette déclaration a été amendée par les consécutives assemblées de l'AAM.

toutes les cornées. Nous obtenons ainsi une statistique satisfaisante sur un ensemble d'épaisseurs. Il est important de préciser que ces cornées n'étaient pas aptes à la greffe, dans la grande majorité des cas, du fait d'une densité endothéliale insuffisante.

La figure 2 présente un résultat typique des mesures spectrales effectuées sur une cornée œdémateuse.

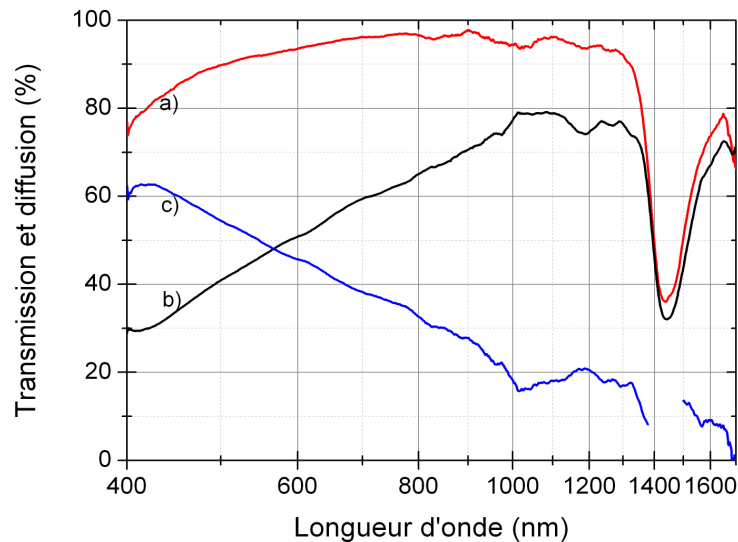


Figure 2. Spectre de transmission totale (rouge), directe (noir) et de diffusion (bleu) obtenu pour une cornée d'une épaisseur de 1000 µm [1]. La courbe bleue est interrompue dans la région spectrale ne permettant pas de mesurer des mesures de diffusion significatives du fait de l'absorption de l'eau.

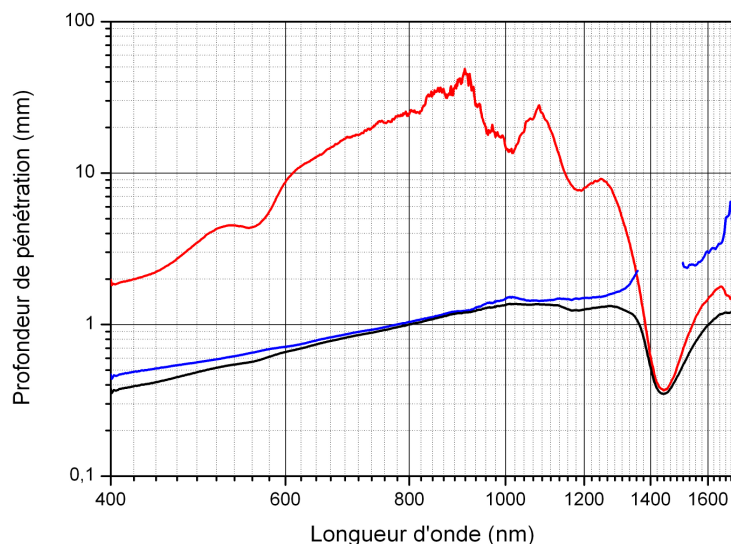


Figure 3. Profondeur de pénétration calculée à partir des spectres de la figure 2. En rouge, la profondeur de pénétration due à l'absorption optique, en bleu celle liée à la diffusion, et en noir, la profondeur de pénétration effective [1].

La mesure de transmission totale corrobore les résultats obtenus par Boettner et Wolter en 1962 [3]. On observe un pic important autour de 1400 nm correspondant au pic d'absorption de l'eau (la cornée étant constituée à plus de 80% d'eau, voir chapitre I). On observe également deux pics supplémentaires centrés à 400 et 550 nm que l'on attribue à l'absorption du phénol présent dans le liquide de conservation des cornées. On remarquera une fenêtre de relative transparence centrée autour de 1650 nm. Ce dernier point est très utile dans le domaine d'application de la chirurgie ophtalmique par laser et a fait l'objet de deux thèses précédentes au sein du groupe. Aux courtes longueurs d'ondes, la rétrodiffusion explique que la transmission totale soit inférieure à 100%. Le spectre de diffusion calculé à partir de l'équation (3) montre une forte dépendance de la diffusion à la longueur d'onde. Les différentes profondeurs de pénétrations calculées à partir des équations (6) sont présentées à la figure 3. Les mêmes courbes ont été tracées pour l'ensemble des mesures réalisées sur les cornées. Les résultats concernant la diffusion en fonction de l'épaisseur de la cornée sont rassemblés aux figures 4 et 5 pour différentes longueurs d'onde.

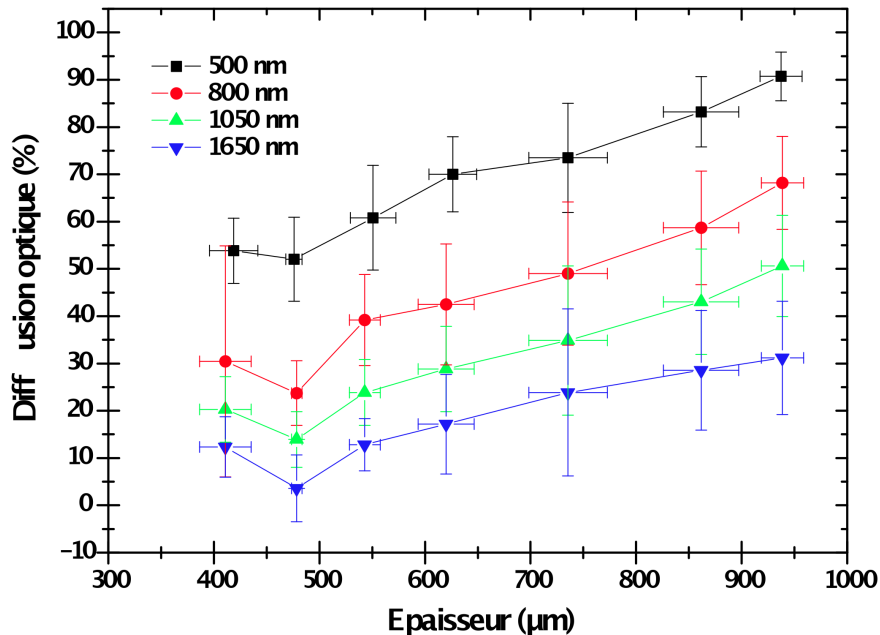


Figure 4. Pourcentage de diffusion optique par rapport à la lumière incidente en fonction de l'épaisseur cornéenne tracée pour les longueurs d'onde de 500, 800, 1050 et 1650nm. Pour chaque longueur d'onde, la valeur de la diffusion de Rayleigh a été tracée en pointillé.

On observe un comportement similaire des courbes de diffusion pour les différentes épaisseurs de cornée. La diffusion augmente lorsque la cornée devient plus épaisse et diminue avec la longueur d'onde. On remarquera pour toutes les longueurs d'onde, un minimum de diffusion pour des épaisseurs de 480 μm correspondant à l'épaisseur physiologique de la cornée (l'épithélium est retiré avant la mesure).

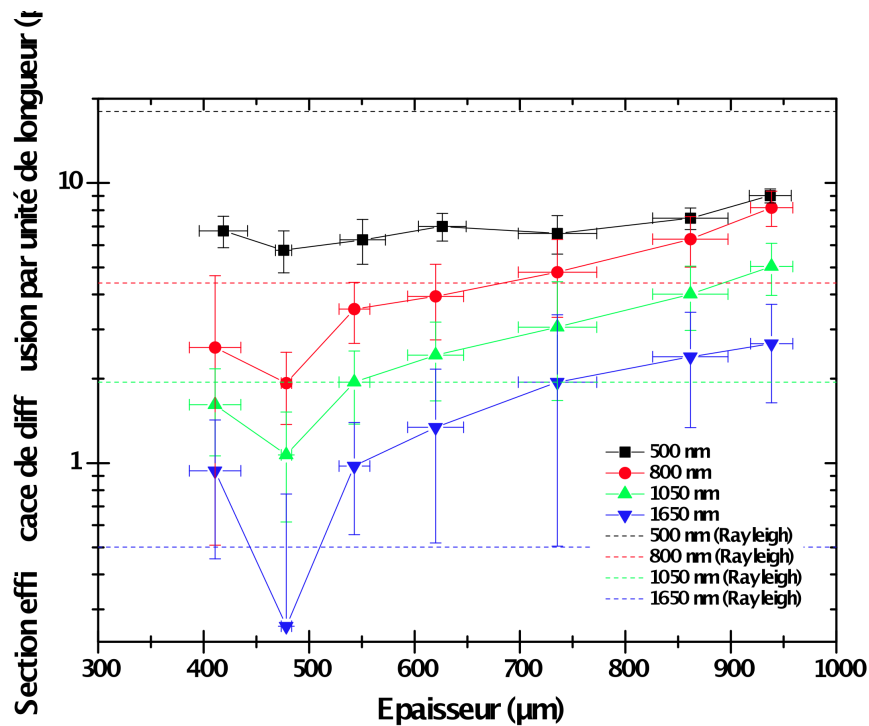


Figure 5. Section efficace de diffusion par unité de longueur en fonction de l'épaisseur de la cornée et tracée pour différentes longueurs d'onde. Les sections efficaces de diffusion pour une seule fibrille sont indiquées sur la figure par des traits en pointillés. Les barres d'erreur sont indiquées sur la figure.

Pour des plus petites épaisseurs, il semblerait que la diffusion augmente de nouveau. On attribue cela à une perturbation dans l'ordre des fibrilles. Lorsque le choc osmotique devient trop important, la répulsion électrostatique entre fibrilles est dominée par cette pression et les fibrilles tendent à se rapprocher et former des agrégats (figure 6), ce qui augmente de manière importante la section efficace de diffusion (figure 5).

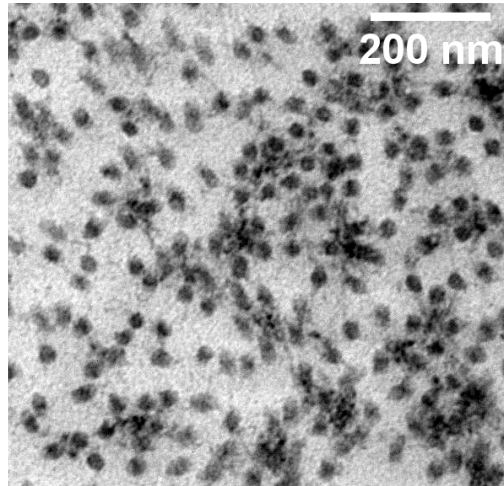


Figure 6. Image de microscopie électronique du stroma postérieur d'une cornée d'une épaisseur de $450\mu\text{m}$.

La figure 5 représente la section efficace par unité de longueur. Les sections efficaces d'une fibrille individuelle ont été ajoutées pour chaque longueur d'onde, en prenant en compte la variation de la densité de fibrilles selon l'épaisseur de la cornée. On constate que pour toutes les longueurs d'onde, la valeur de la section efficace de diffusion des cornées est abaissée par rapport à celle d'une fibrille individuelle. Cela confirme la conclusion de Maurice. Le facteur de structure de la cornée réduit la diffusion. L'effet collectif des fibrilles de collagène joue un rôle important dans la transparence du tissu à l'état physiologique. Lorsque la cornée devient œdémateuse, la section efficace est augmentée par rapport à celle d'une fibrille individuelle, et ne saurait être expliquée par la simple perturbation de l'ordre des fibrilles de collagène au sein du stroma. On attribue cela à un régime de diffusion différent de celui de Rayleigh et qui serait dû à l'apparition de « lacs » dans les cornées épaisses. De même, dans les cornées épaisses, l'effet collectif des fibrilles agit toujours dans la mesure où la distance interfibrillaire demeure inférieure à la demi-longueur d'onde.

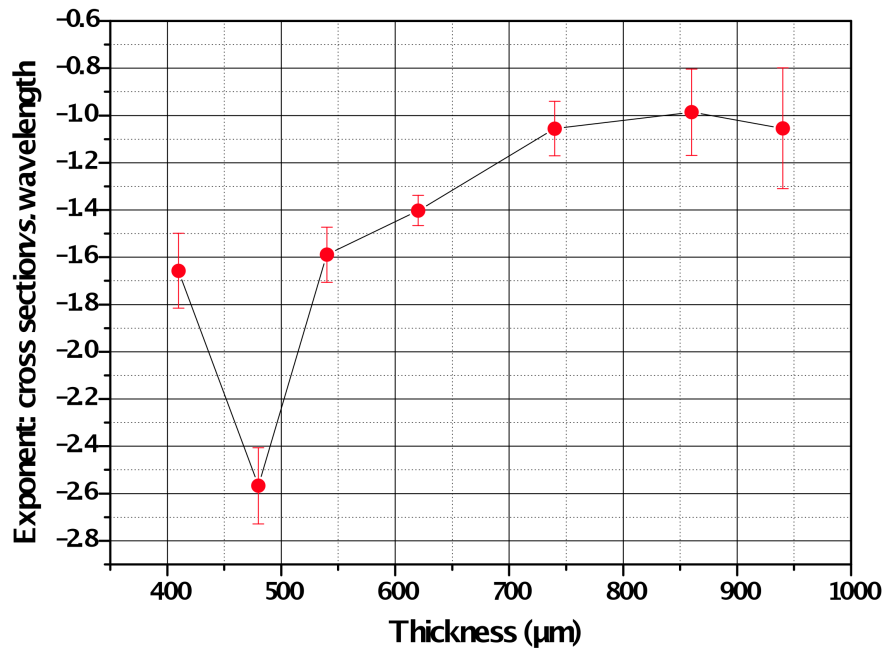


Figure 7. Valeur de l'exposant de la section efficace de diffusion sur la longueur d'onde en fonction de l'épaisseur du tissu cornéen.

La figure 7 nous montre que ces mesures présentent une dépendance à la longueur d'onde de la section efficace proportionnelle à $C + B.\lambda^{-3}$, où B est une constante, et C une variable dépendant de la diffusion. Pour une cornée à l'épaisseur physiologique on est proche de la dépendance en λ^{-3} prédite par la section efficace de diffusion de Rayleigh pour une fibrille de collagène. La contribution de C paraît petite. Pour les cornées d'épaisseurs supérieures à 750 µm, un autres type de diffusion semble alors apparaître, ne dépendant plus de la longueur d'onde. La contribution de C est alors la plus importante.

2. Mesures de la figure de diffusion de la cornée par goniométrie

Afin de caractériser la diffusion de la cornée, les mesures précédentes ont été complétées par des mesures goniométriques. En parallèles de celles-ci, des images de tomographie à cohérence optique (OCT) ont été réalisées afin d'observer l'évolution de la structure de la cornée. L'ensemble de ces mesures a été réalisé dans le cadre d'une

mission à l'Institut Fresnel de Marseille¹⁹. La diffusion du tissu dans l'espace réfléchi avait déjà été caractérisée dans une étude précédente pour 633nm [4]. Nous proposons ici d'étendre ces mesures à l'ensemble du plan défini par la lumière incidente, ainsi qu'à plusieurs longueurs d'onde.

De plus, cette étude a été l'occasion de calibrer le dispositif goniométrique à l'aide de billes de polystyrène de tailles différentes. Nous montrons que le comportement des billes de tailles nanométriques ont un comportement diffusif de Rayleigh, alors que celles de tailles micrométriques présentent un comportement correspondant à une diffusion de Mie (annexe B). La motivation de cette étude est en effet de distinguer les différents régimes de diffusions présents dans la cornée saine et pathologique.

2.1. Protocole expérimental et dispositifs de mesure

2.1.1 Préparation des tissus

Les mesures ont été réalisées sur 15 greffons de cornée inaptes à la greffe (densité endothéliale faible) provenant de la banque de l'établissement français du sang de Marseille. Chaque cornée a subi un processus de déturgescence selon le protocole présenté au §3.1.1 du chapitre I. Des mesures de goniométrie et d'OCT ont alors été réalisées pour différents temps du processus de déturgescence pour chacune des cornées. Des mesures d'épaisseur de la cornée par pachymétrie à ultrasons ont également été réalisées avant et après chaque mesure. L'épithélium a auparavant été retiré afin de limiter la diffusion de surface.

2.1.2. Goniomètre

Le dispositif de mesure de la diffusion angulaire (figure 7) est monté en salle blanche. Une description complète du dispositif peut être trouvée à la référence [5]. L'échantillon est placé dans le plan vertical, orthogonal au plan d'incidence. Le détecteur tourne dans un plan horizontal autour de l'échantillon (0 à 360°) et recueille la lumière diffusée à un angle θ par celui-ci. Trois sources ont été utilisées pour nos mesures : une source argon

¹⁹ Mes vifs remerciements vont à Gaëlle Georges et Olivier Casadessus de l'Institut Fresnel pour m'avoir si gentiment accueillis dans leur groupe et permis de réaliser les mesures.

(450 nm), un laser hélium-néon (633 nm) ainsi qu'un YAG (1064 nm). Le détecteur utilisé pour la lumière visible est un photomultiplicateur, et pour la lumière infrarouge, une photodiode germanium.

Toutes ces longueurs d'onde sont alignées sur le même trajet optique. Un cube séparateur placé avant l'échantillon permet de définir une référence. Les lasers sont modulés grâce à un chopper, et un système de détection synchrone est utilisé pour les signaux de référence et les signaux incidents. Le détecteur est placé sur un bras rotatif motorisé à une distance de 30cm permettant un angle solide d'acceptance estimé à $\Delta\Omega = 6,5 \cdot 10^{-5}$. La mesure a été étalonnée à l'aide d'un diffuseur lambertien en l'absence d'échantillon. La dynamique de la mesure est supérieure à 6 décades. La résolution angulaire est de $0,05^\circ$ et la répétabilité de 5%. Les cornées sont placées verticalement à l'aide d'un porte-échantillon dans une cuve remplie de solution saline BSS (*balanced salt solution*). Le dispositif a été calibré à l'aide de billes micrométriques et nanométriques afin de mettre en avant les différents régimes de diffusion (annexe B).

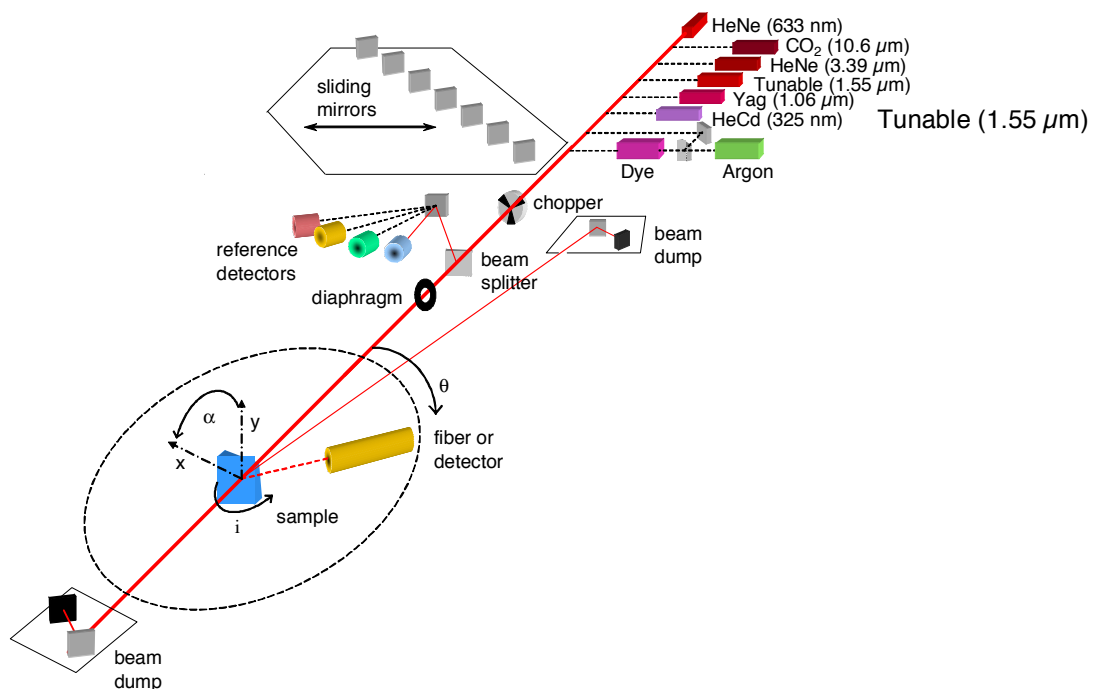


Figure 7. Dispositif goniométrique de mesure de la diffusion angulaire [5].

2.1.3. OCT

Un système d'imagerie basé sur la tomographie à cohérence optique [6] a été utilisé pour caractériser la structure de la cornée en parallèle des mesures de diffusion. Le dispositif utilisé (figure 8) est un OCT plein champ²⁰ [7,8].

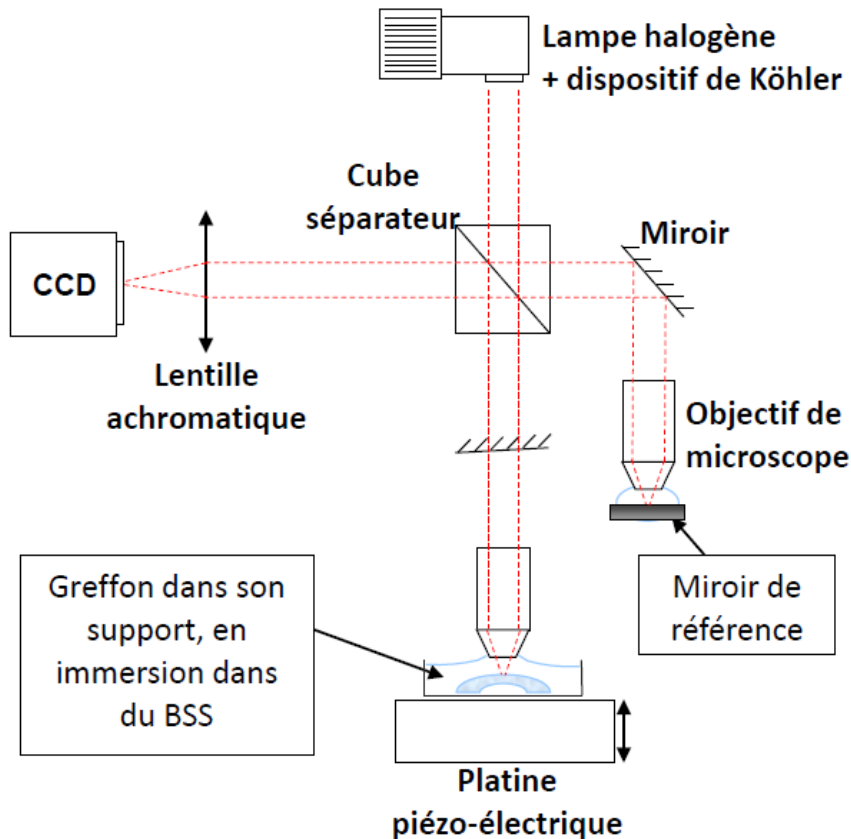


Figure 8. OCT plein champ de l'Institut Fresnel.

Des images tridimensionnelles de résolutions micrométriques peuvent être obtenues [9]. Le champ d'observation de l'échantillon est de $250 \times 190 \mu\text{m}^2$. Le balayage sur l'axe z est opéré à l'aide d'une platine montée sur un transducteur piézoélectrique. Celui-ci permet un balayage sur toute l'épaisseur du tissu (de 550 à $1200 \mu\text{m}$). La résolution axiale du dispositif est de $0,85 \mu\text{m}$ et la résolution latérale de $1,5 \mu\text{m}$. Avec des objectifs à immersion à l'eau, la sensibilité estimée est de 85 dB pour 200 images. Le temps d'acquisition est de $2,5 \text{ s}$ par image.

²⁰ Ce dispositif a été monté par Gaël Latour lors de son contrat ATER à l'institut Fresnel en 2008.

2.1.3. Pachymétrie

Avant et après chacune des mesures optiques effectuées sur les dispositifs présentés aux §2.1.1 et §2.1.2, une mesure de pachymétrie à ultrason a été effectuée²¹. La moyenne des deux mesures a été attribuée. La cornée, en immersion dans le BSS lors de la mesure de diffusion ou de l'imagerie OCT, est susceptible de s'hydrater à nouveau selon son épaisseur avant la mesure optique. Le gonflement de cornées minces a été étudié afin de pouvoir être contrôlé lors des mesures de diffusion. Le résultat est présenté à la figure 9

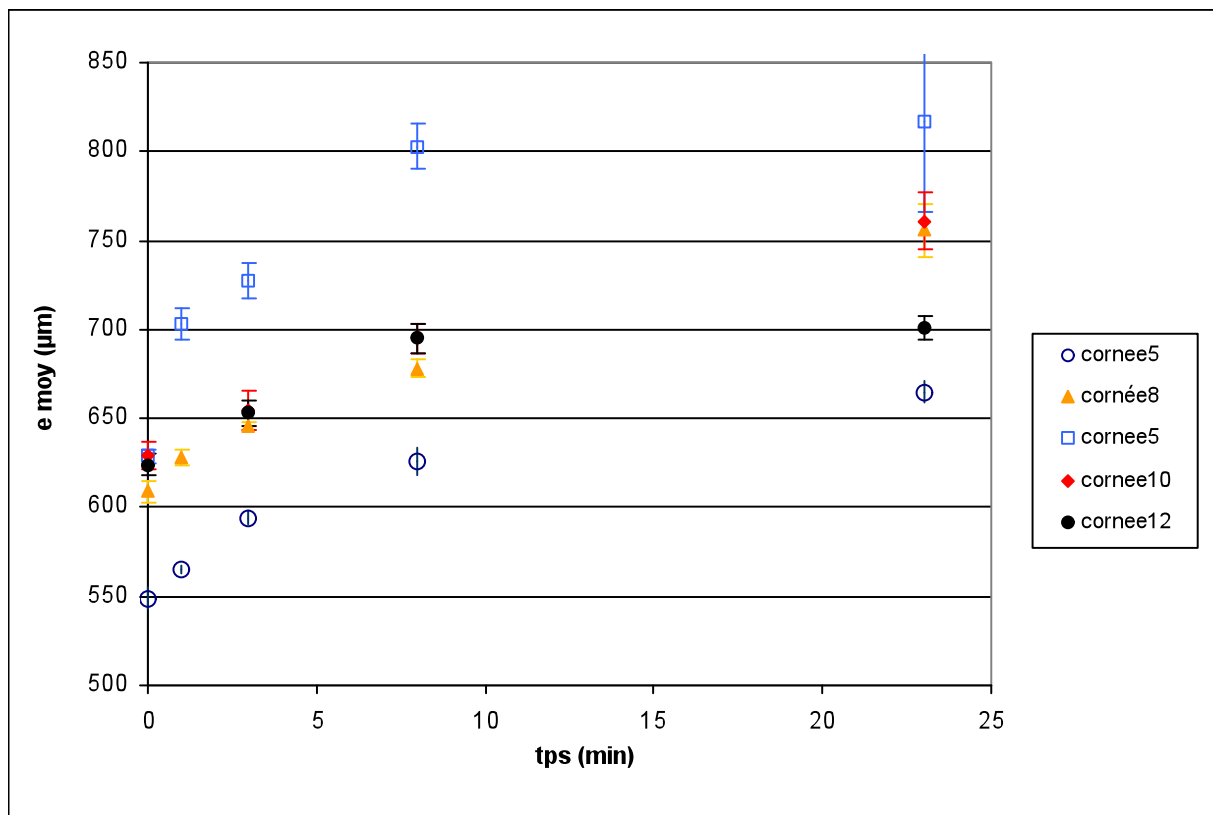


Figure 9. Suivi de gonflement en fonction du temps de différentes cornées plongées dans le BSS.

Ces résultats concernent 5 cornées placées dans le BSS et dont l'épaisseur a été mesurée par pachymétrie à des temps différents. Ils montrent, quelque soit l'épaisseur initiale de la cornée, un gonflement relativement important durant les dix premières minutes (~75µm), puis une augmentation de l'épaisseur plus lente. Ces résultats sont

²¹ Pockett II de chez Quantel Medical, France

complémentaires à ceux présentés au chapitre I concernant l'évolution de l'épaisseur par le processus de déturgescence.

2.2. Mesures de diffusion : résultats

L'objet de l'étude étant de caractériser la diffusion selon l'épaisseur et la structure de la cornée, il a été nécessaire au vu des résultats précédents de limiter le temps de mesure de la diffusion, tout en gardant une résolution suffisante. Pour cela nous avons distingué trois plages angulaires :

- l'espace transmis T pour les angles $[140^\circ-178,5^\circ]$;
- l'espace transmis t $[178,5^\circ-181,5^\circ]$;
- l'espace réfléchi R $[9^\circ-90^\circ]$.

Pour l'espace t , une résolution de $\Delta\theta=0,1^\circ$ ou $\Delta\theta=0,05^\circ$ a été adoptée. Pour l'espace T on a $\Delta\theta=2^\circ$ et pour R on a une résolution de $\Delta\theta=3^\circ$. Les angles 90° à 140° ne peuvent être mesurés du fait de la géométrie du porte-échantillon. Nous nous intéressons plus particulièrement à la diffusion vers l'avant. Pour la série de cornées de banque utilisée, des épaisseurs allant de $550\mu\text{m}$ à $1200\mu\text{m}$ environ ont été obtenues. Les mesures de diffusions et d'OCT ont été faites pour l'ensemble de ces épaisseurs. Pour les mesures goniométriques, les trois longueurs d'onde ont été utilisées séparément (450 nm, 633 nm, et 1064 nm). Des mesures de calibrations ont été réalisées sur des échantillons de billes de différentes tailles (voir annexe B).

2.2.1 Espace réfléchi

Les résultats concernant la diffusion dans l'espace réfléchi sont présentés aux figures 10, 11 et 12 pour les trois longueurs d'onde. La diffusion dans cette plage angulaire est principalement due au stroma. La contribution des couches de surface peut être négligée [4]. On observe sans surprise que le niveau d'intensité diffusé augmente avec l'épaisseur de la cornée. On constate également un comportement identique de la rétrodiffusion tant pour les différentes épaisseurs de cornées que pour les différentes longueurs d'ondes.

Pour les angles inférieurs à 20° , on peut toutefois observer une tendance légèrement différente qui s'explique par la contribution plus importante à ces angles de la diffusion

de surface [4, 10] due à la membrane de Bowman ou celle de Descemet. On ne distingue pas à priori différents types de diffusion, comme dans le cas de billes de polystyrène (voir annexe) où les contributions de la diffusion de Mie et de Rayleigh sont clairement dépendantes de la taille des billes et de la longueur d'onde. On observe de plus une dispersion moindre des courbes de diffusion pour 1064nm, ainsi qu'une dispersion maximale pour 633nm. Nous reviendrons à cette constatation. Autour de la plage angulaire [70°-90°] on observe un renforcement de la courbe dû à un effet d'écrantage du porte échantillon.

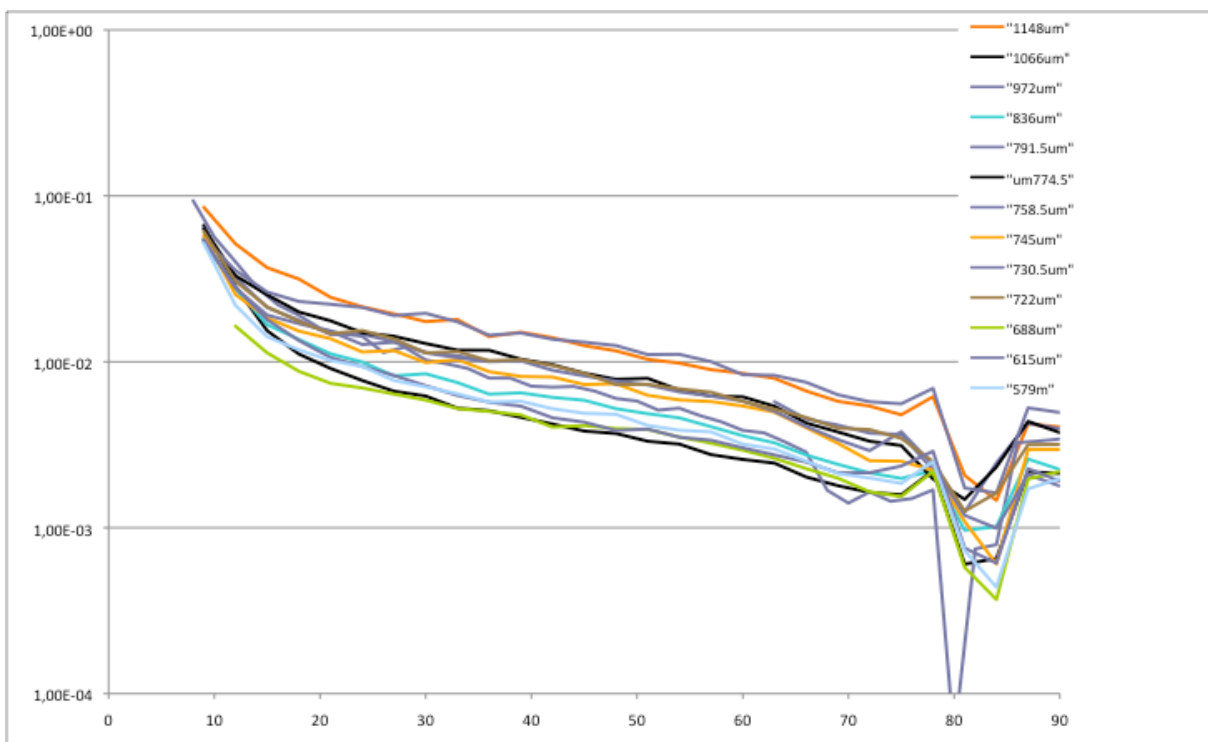


Figure 10. Mesures de la diffusion dans l'espace réfléchi pour des cornées d'épaisseurs différentes. Les mesures sont présentées pour 450nm.

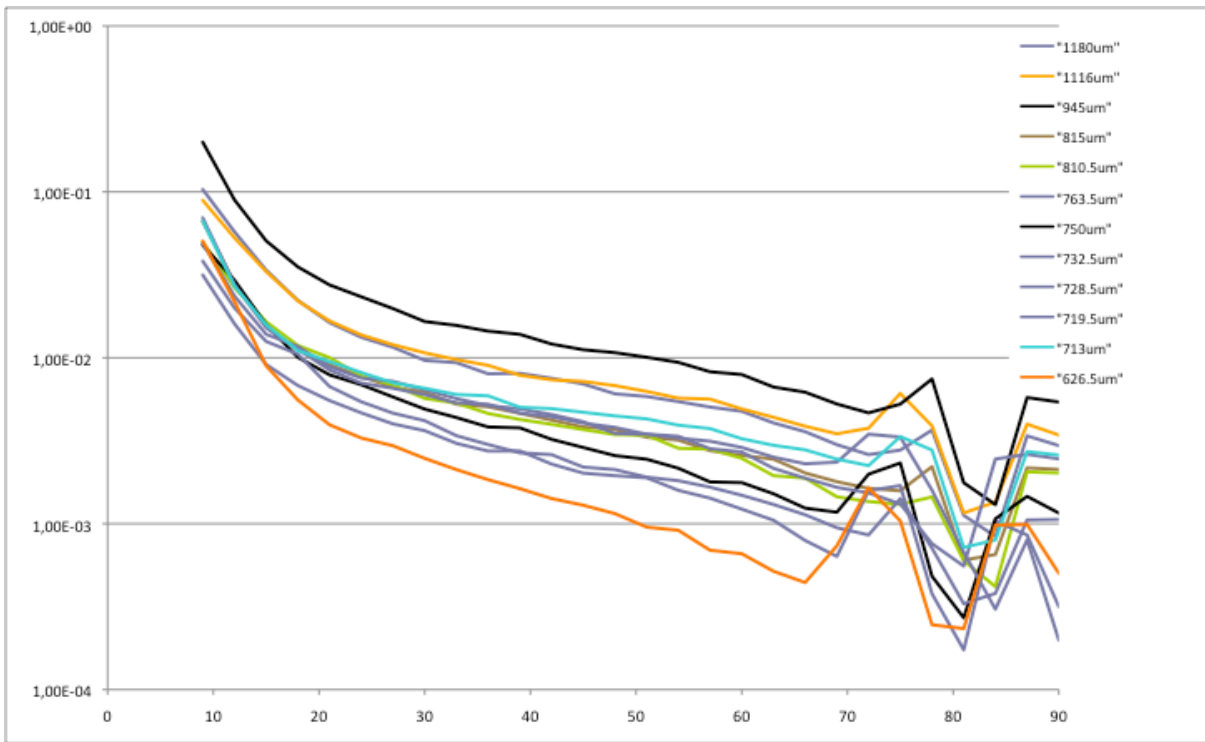


Figure 11. Mesures de la diffusion dans l'espace réfléchi pour des cornées d'épaisseurs différentes. Les mesures sont présentées pour 633nm.

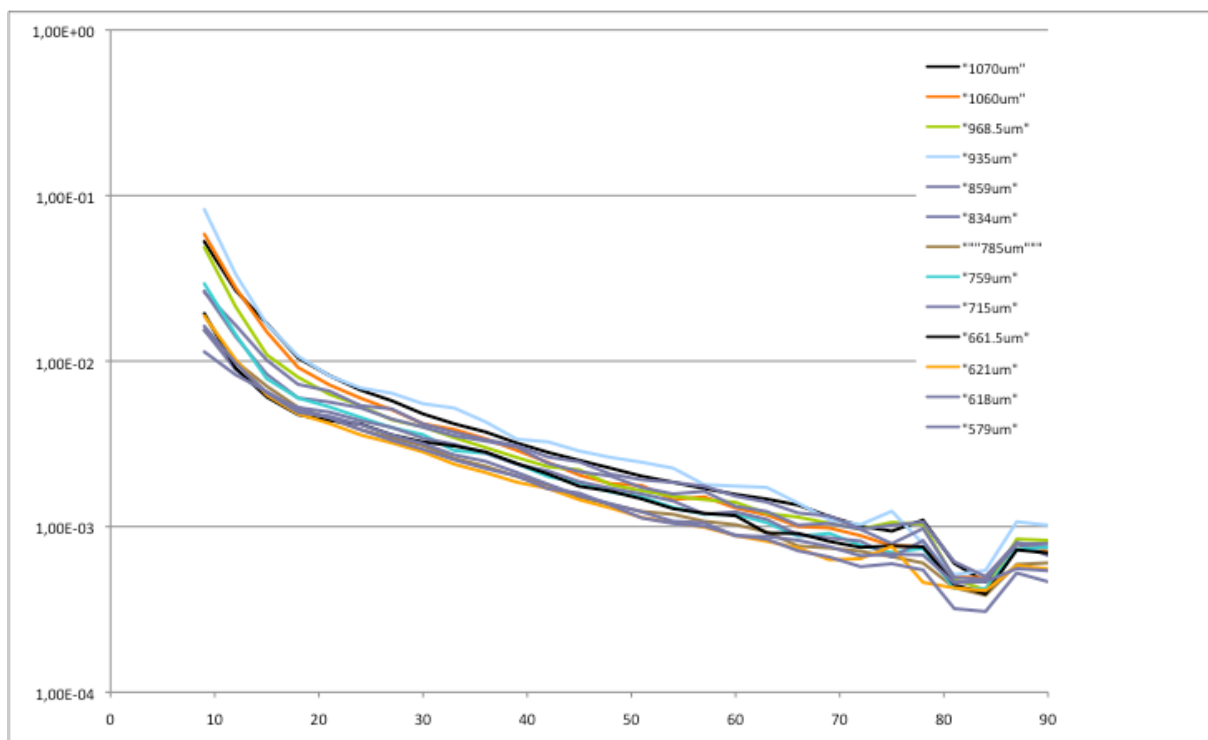


Figure 12. Mesures de la diffusion dans l'espace réfléchi pour des cornées d'épaisseurs différentes. Les mesures sont présentées pour 1064nm.

2.2.2 Espace transmis T

Les mêmes constatations peuvent être formulées en ce qui concerne l'espace transmis T (figures 13,14,15). On observe une augmentation du niveau de diffusion avec l'épaisseur de la cornée, et globalement une allure similaire de la figure de diffusion dans l'espace transmis quelque soit la longueur d'onde ou l'épaisseur du tissu.

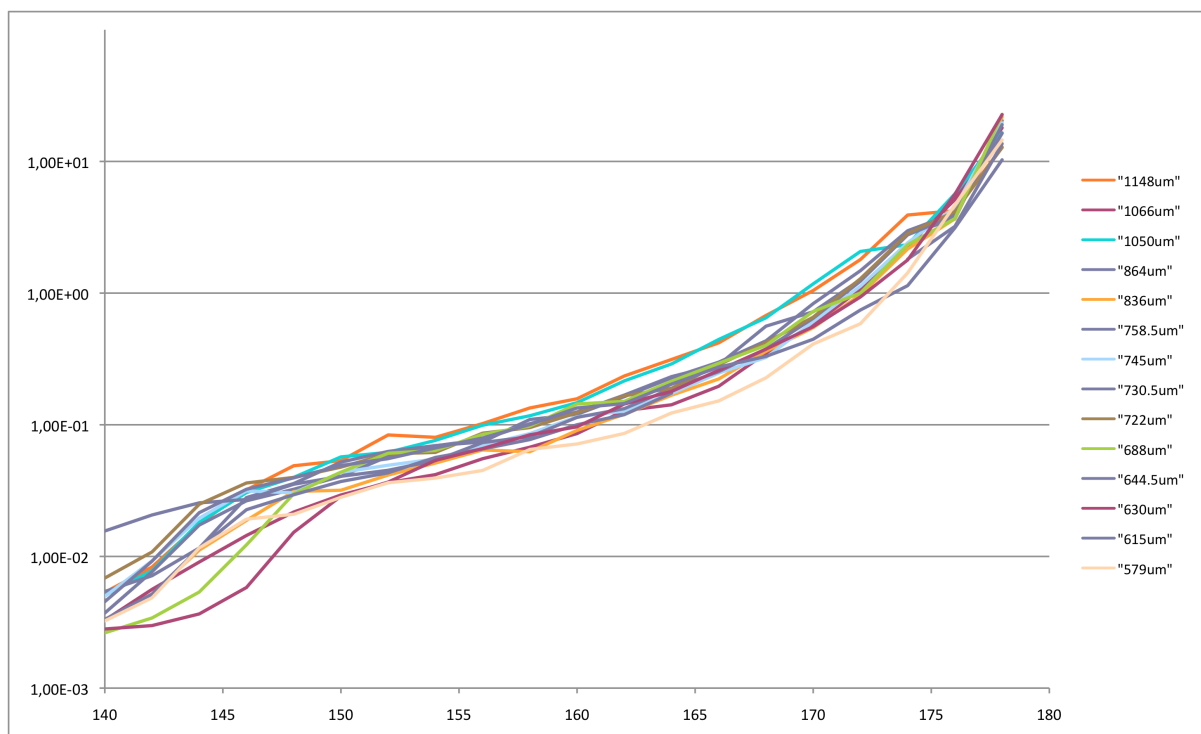


Figure 13. Mesures de la diffusion dans l'espace transmis pour des cornées d'épaisseurs différentes. Les mesures sont présentées pour 450 nm.

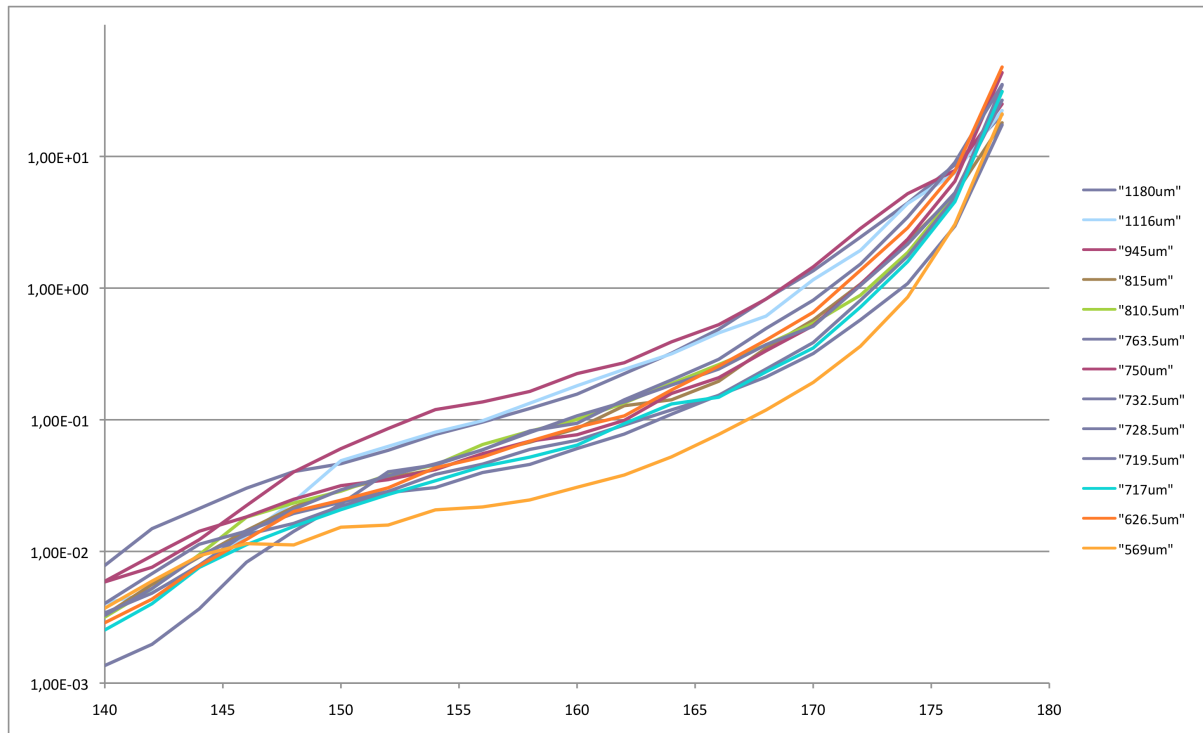


Figure 14. Mesures de la diffusion dans l'espace transmis pour des cornées d'épaisseurs différentes. Les mesures sont présentées pour 633 nm.

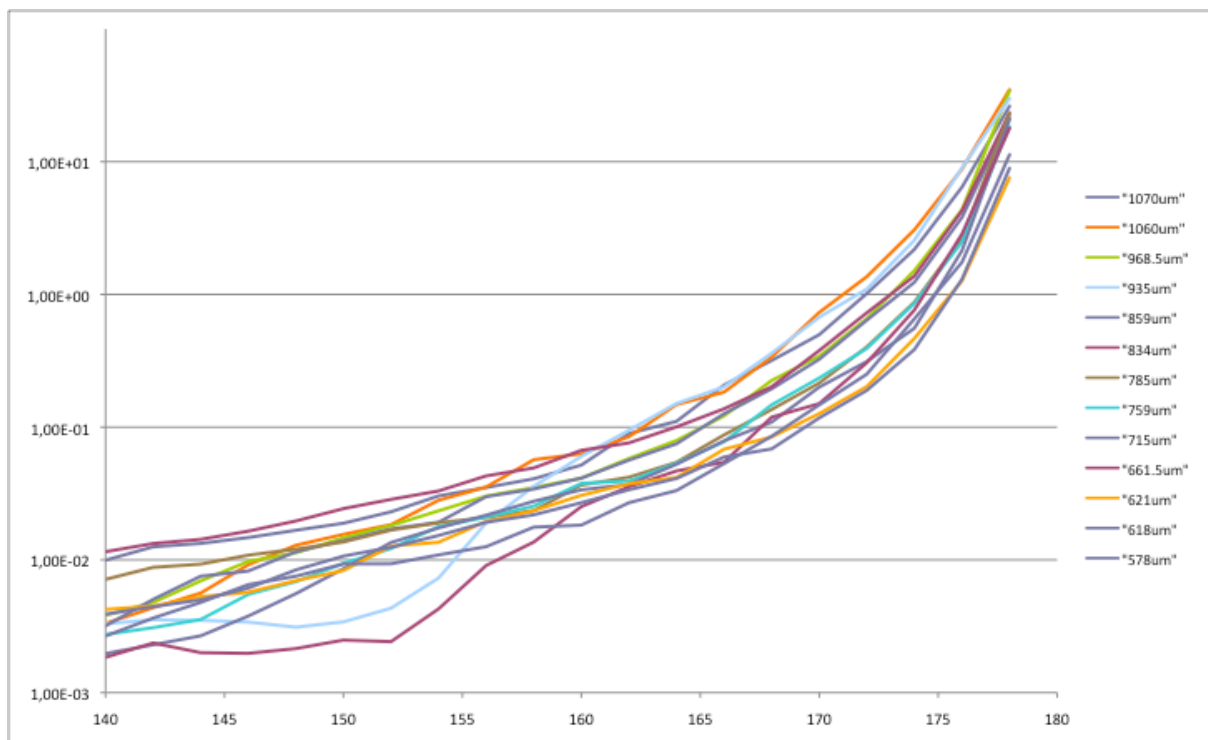


Figure 15. Mesures de la diffusion dans l'espace transmis pour des cornées d'épaisseurs différentes. Les mesures sont présentées pour 1064 nm.

2.2.2 Espace transmis t

Les figures 16 à 18 représentent les niveaux d'intensité diffusée dans l'espace transmis t (vers l'avant) pour différentes épaisseurs de cornées. Pour les cornées claires, on observe un comportement de type gaussien pour l'allure de la diffusion, se rapprochant du profil d'intensité du laser. Avec l'épaississement de la cornée, on constate un aplatissement progressif de l'intensité diffusée vers l'avant. Cette évolution est particulièrement visible pour 450nm. Pour la diffusion du laser HeNe (633nm), l'ensemble des courbes de diffusion paraissent globalement aplaties, bien qu'on observe une sensible évolution avec l'épaisseur cornéenne.

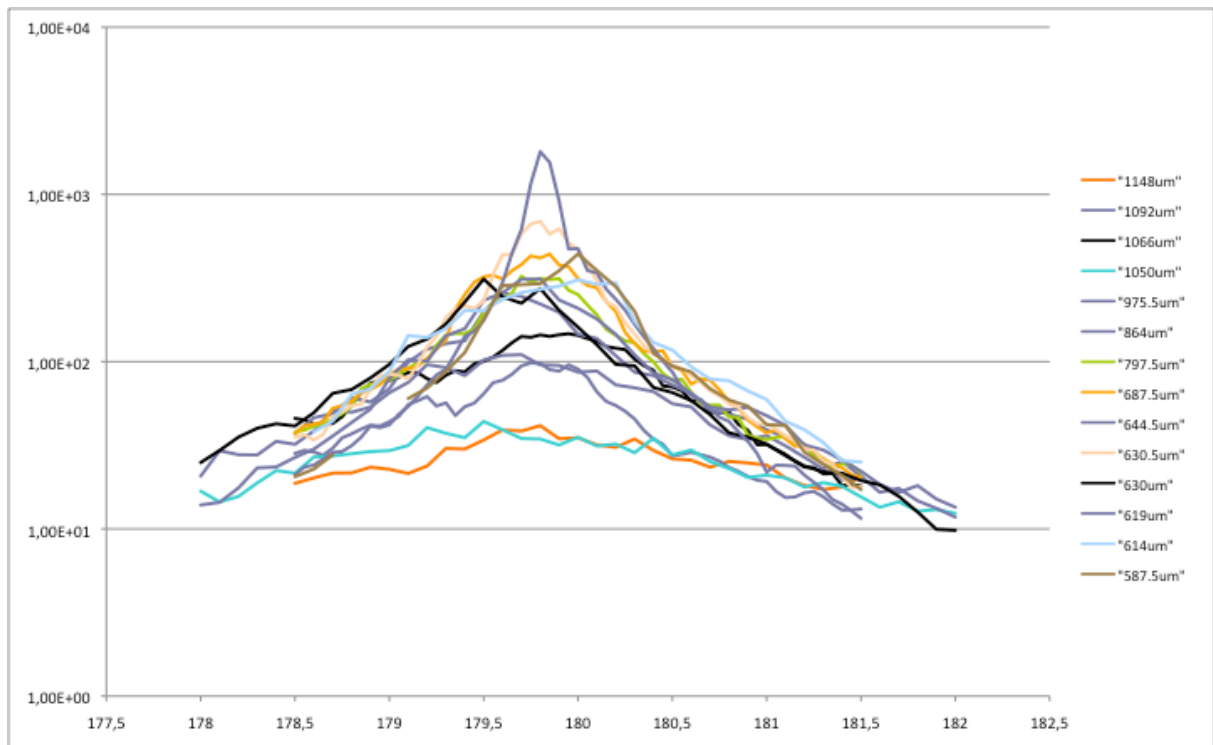


Figure 16. Mesures de la diffusion dans l'espace transmis t pour des cornées d'épaisseurs différentes. Les mesures sont présentées pour 450nm

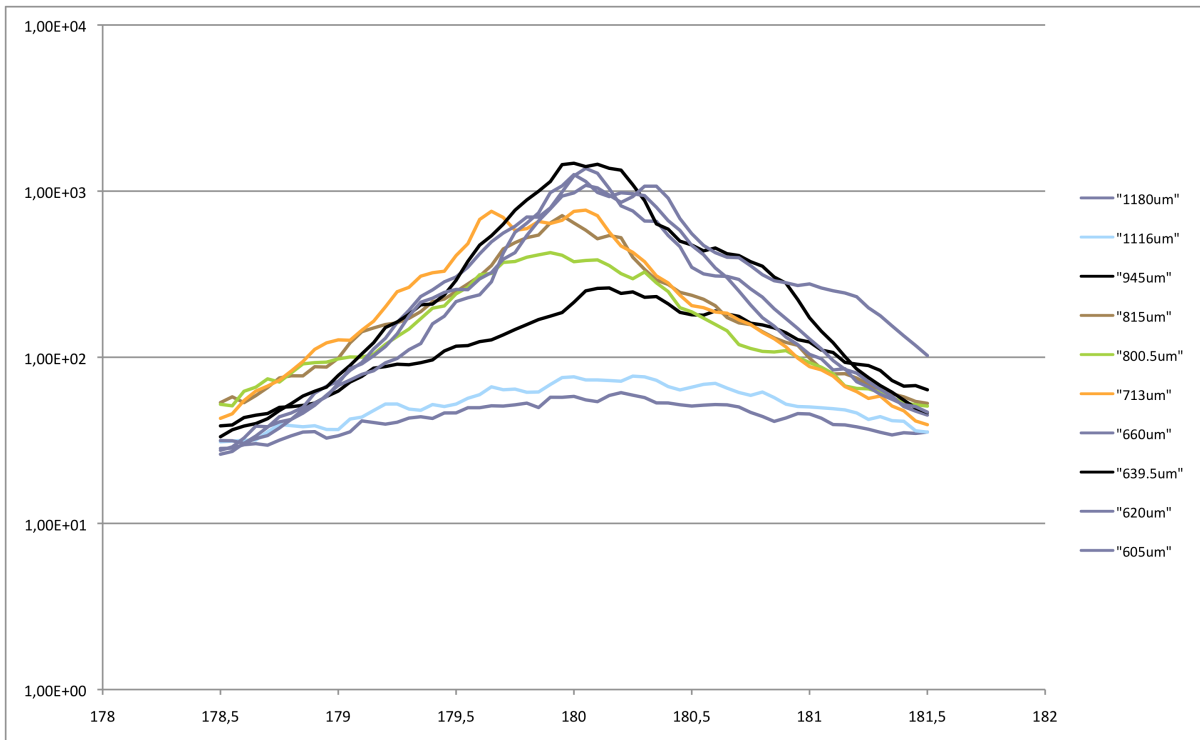


Figure 15. Mesures de la diffusion dans l'espace transmis t pour des cornées d'épaisseurs différentes. Les mesures sont présentées pour 644nm

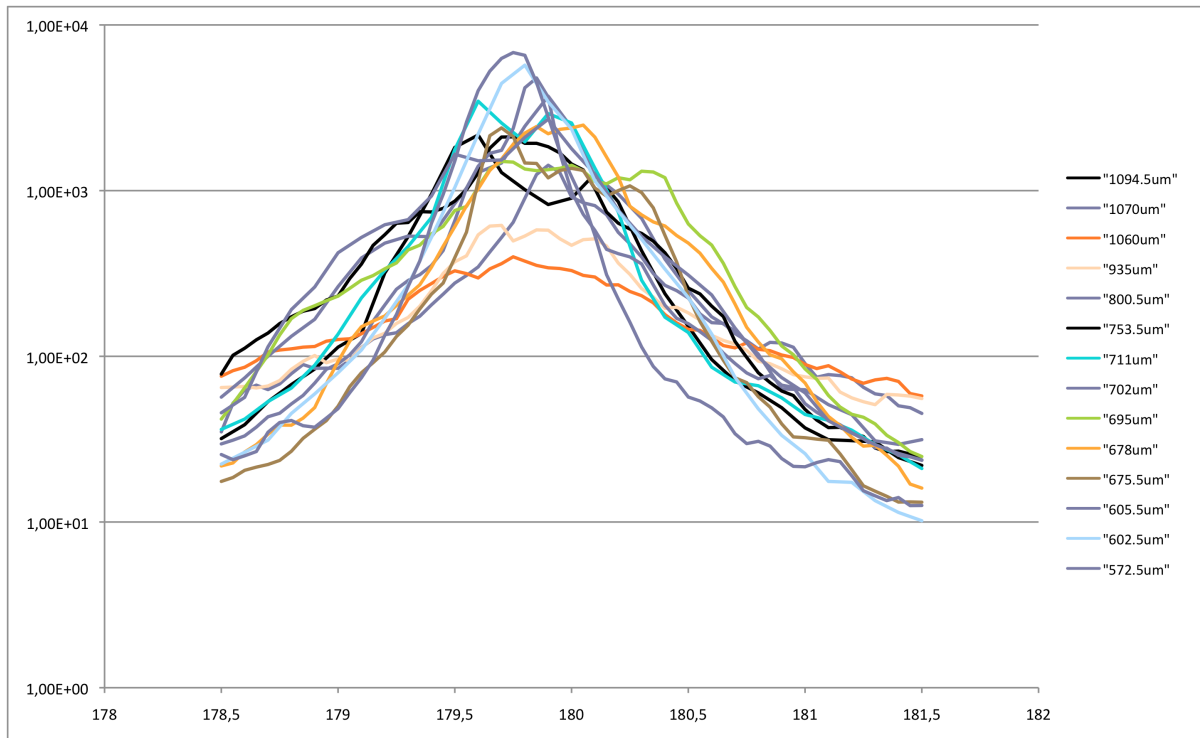


Figure 15. Mesures de la diffusion dans l'espace transmis t pour des cornées d'épaisseurs différentes. Les mesures sont présentées pour 1064nm

En ce qui concerne la diffusion à 1064nm, les courbes de diffusion présentent globalement une allure gaussienne, même pour les cornées épaisses.

2.3 Diffusion totale intégrée

Afin de caractériser le comportement diffusif des échantillons de cornée, le paramètre de diffusion totale intégrée (TIS pour *total integrated scattering*) est introduit. Il est calculé comme suit :

$$TIS = \iint_{\theta, \varphi} I(\theta, \varphi) \sin(\theta) d\theta d\varphi \quad (7)$$

(θ, φ) étant les coordonnées polaires locales du point mesuré. On distinguera les différents plans angulaires mentionnés ci-dessus.

2.3.1 Espace réfléchi

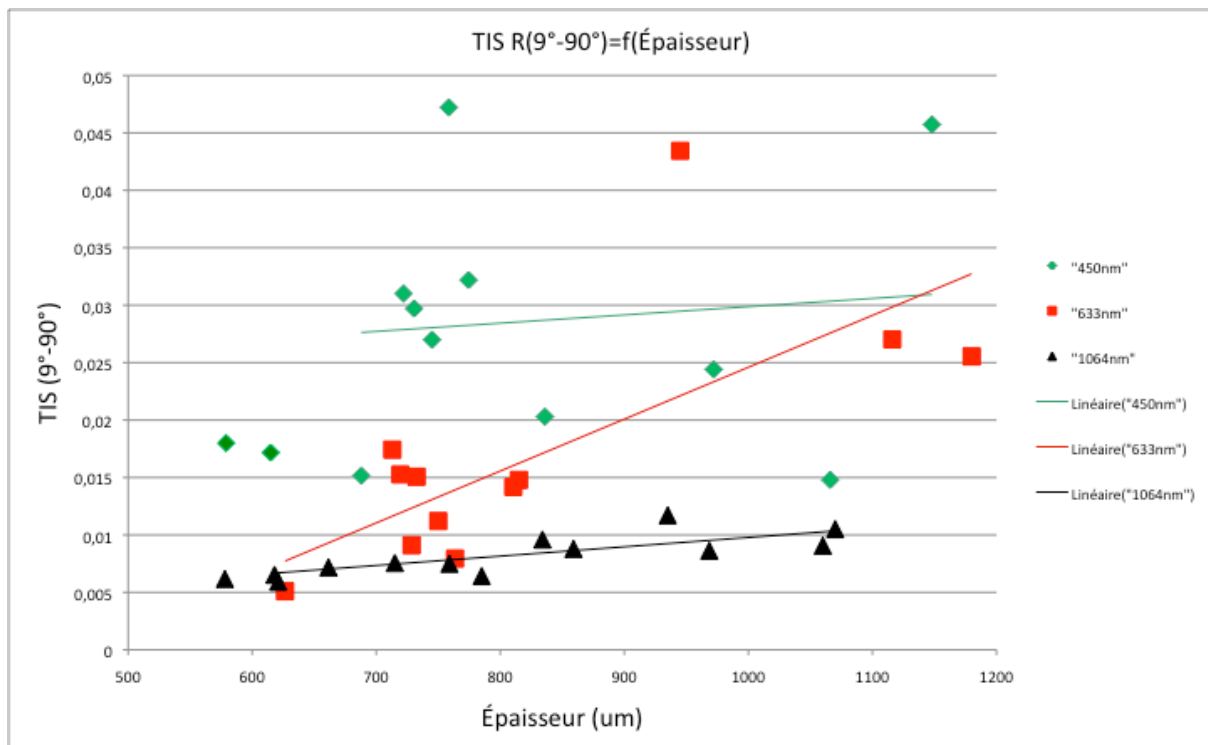


Figure 16. Diffusion totale intégrée dans l'espace réfléchi pour les trois longueurs d'onde en fonction de l'épaisseur de la cornée mesurée.

Les valeurs calculées du TIS pour l'espace réfléchi sont présentées à la figure 16. Le TIS augmente clairement avec l'épaisseur de la cornée pour l'espace réfléchi. Les niveaux de diffusions semblent diminuer avec la longueur d'onde et présentent donc une dépendance à celle-ci. Pour 1064nm, le TIS présente une évolution monotone avec l'épaisseur de la cornée. Pour cette longueur d'onde, la diffusion est peu dépendante de l'épaisseur cornéenne, et reste faible quelque soit l'épaisseur de la cornée. La dispersion de valeurs du TIS est plus importante pour les longueurs d'onde du visible, surtout lorsque la cornée devient plus épaisse. La rétrodiffusion augmente lorsque la longueur d'onde diminue. Ces résultats confirment notre interprétation de la transparence et la perte de transparence de la cornée. En effet, les longueurs d'onde courtes interagissent davantage avec les composantes de Fourier de la distribution de fibrilles dans le stroma et seront davantage diffusées vers l'arrière. Pour les cornées minces, relativement transparentes, il s'agira d'une diffusion cohérente. Lorsque l'ordre des fibrilles est perturbée, la diffusion présente davantage un caractère incohérent (cf chapitre II).

2.3.2 Espace transmis T

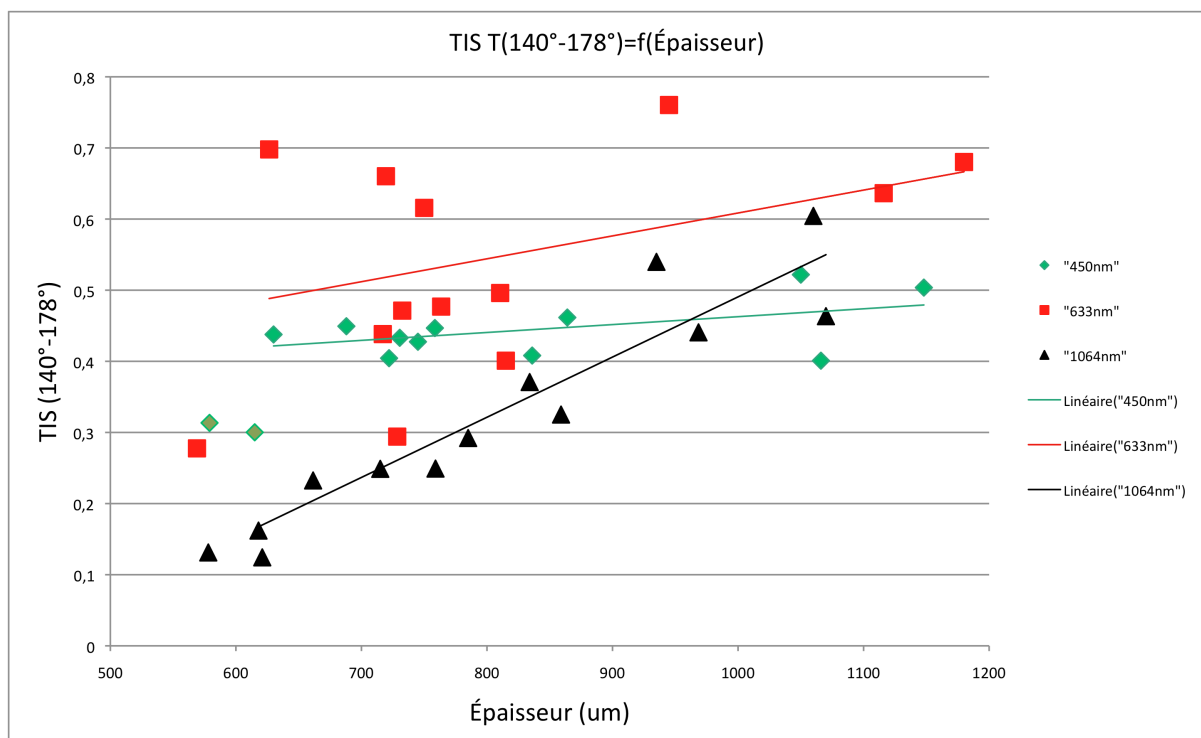


Figure 16. Diffusion totale intégrée dans l'espace transmis T pour les trois longueurs d'onde en fonction de l'épaisseur de la cornée mesurée.

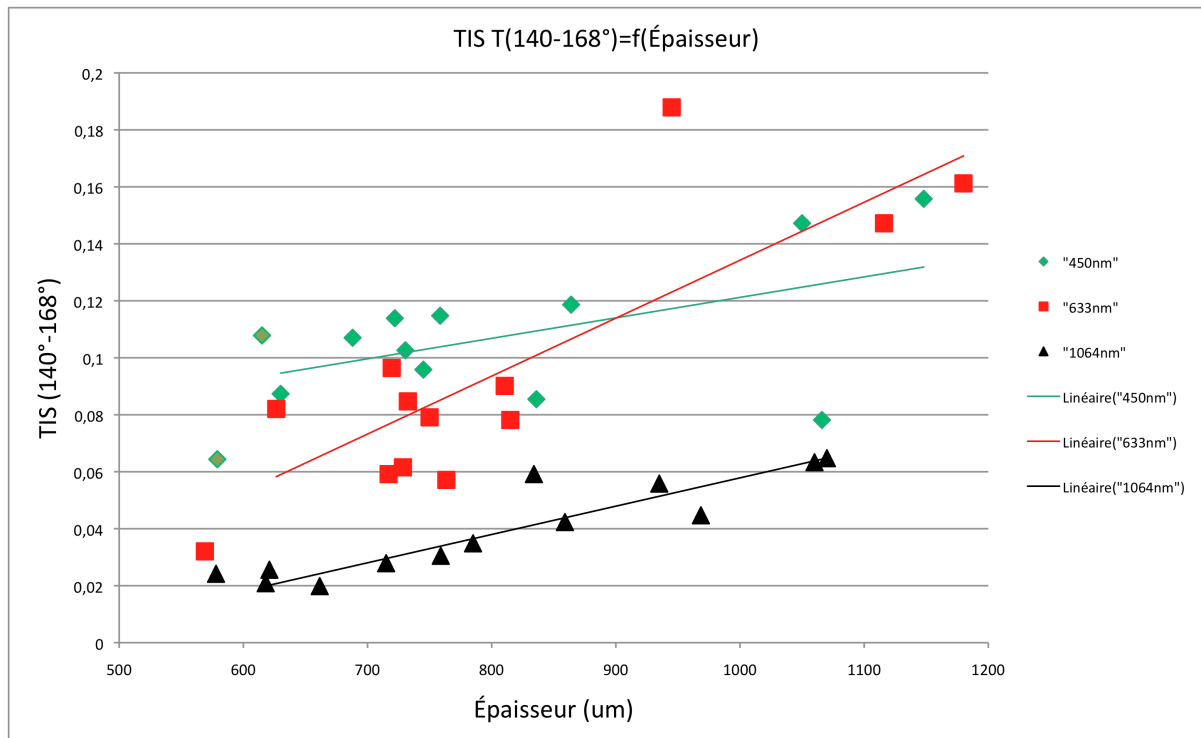


Figure 17. Diffusion totale intégrée dans l'espace transmis [140°-168°] pour les trois longueurs d'onde en fonction de l'épaisseur de la cornée mesurée.

Les valeurs du TIS ont également été calculées pour l'espace transmis et sont présentées aux figures 16 et 17. Nous avons calculé la diffusion totale intégrée sur 140°-178° mais également sur 140°-168°. En effet, la queue de la gaussienne diffusée vers l'avant se prolonge jusqu'à environ 170°. En effet, la contribution de la diffusion vers l'avant étant bien plus importante, celles des autres espaces peuvent être négligées. Sur la fenêtre 140°-168°, le TIS varie globalement entre 0 et 0,2 alors que sur 140°-178° elle augmente et présente une variation allant de 0 à 0,8. Si la diffusion dans l'infrarouge est encore moins importante dans l'espace transmis, il est difficile au vu de ces résultats de voir laquelle de la longueur d'onde rouge ou verte présente un niveau de diffusion plus important. On notera toutefois une dispersion des valeurs du TIS plus importante pour la longueur d'onde de 633nm par rapport à celle de 450nm. Dans l'infrarouge, le comportement monotone avec l'épaisseur de la cornée est conservé.

2.3.2 Espace transmis t [179°-181°] vers l'avant

Les figures de diffusion totale intégrées correspondant à cet espace sont présentées à la figure 18 pour chaque longueur d'onde. Des images de cornées correspondant aux diffusions mesurées, sont présentées pour différentes valeurs calculées du TIS. On constate une transparence plus prononcée pour des cornées de faible épaisseur avec un TIS correspondant plus important. Les résultats pour ce dernier espace sont particulièrement intéressants et seront mis en relation avec ceux obtenus par holographie numérique et présentés dans le chapitre suivant. Le sujet de notre étude concerne la transparence et la perte de transparence du tissu cornéen, et la lumière transmise vers l'avant sera particulièrement indicative du niveau de transparence de la cornée. La quantité de lumière diffusée dans cet espace est supérieure de 3 à 4 décades par rapport à celle diffusée dans les autres espace (voir figures 16, 17, 18). La tendance est dans cet espace inversée comme on pouvait s'y attendre par rapport aux espaces réfléchi R et transmi T (figure 19). Le niveau de transmission de la lumière augmente avec la longueur d'onde. On constate aussi, contrairement à ce qui a été observé dans les autres espaces, que la dispersion des valeurs du TIS devient plus importante avec la longueur d'onde, plus particulièrement pour les cornées minces (jusqu'à 700 μm).

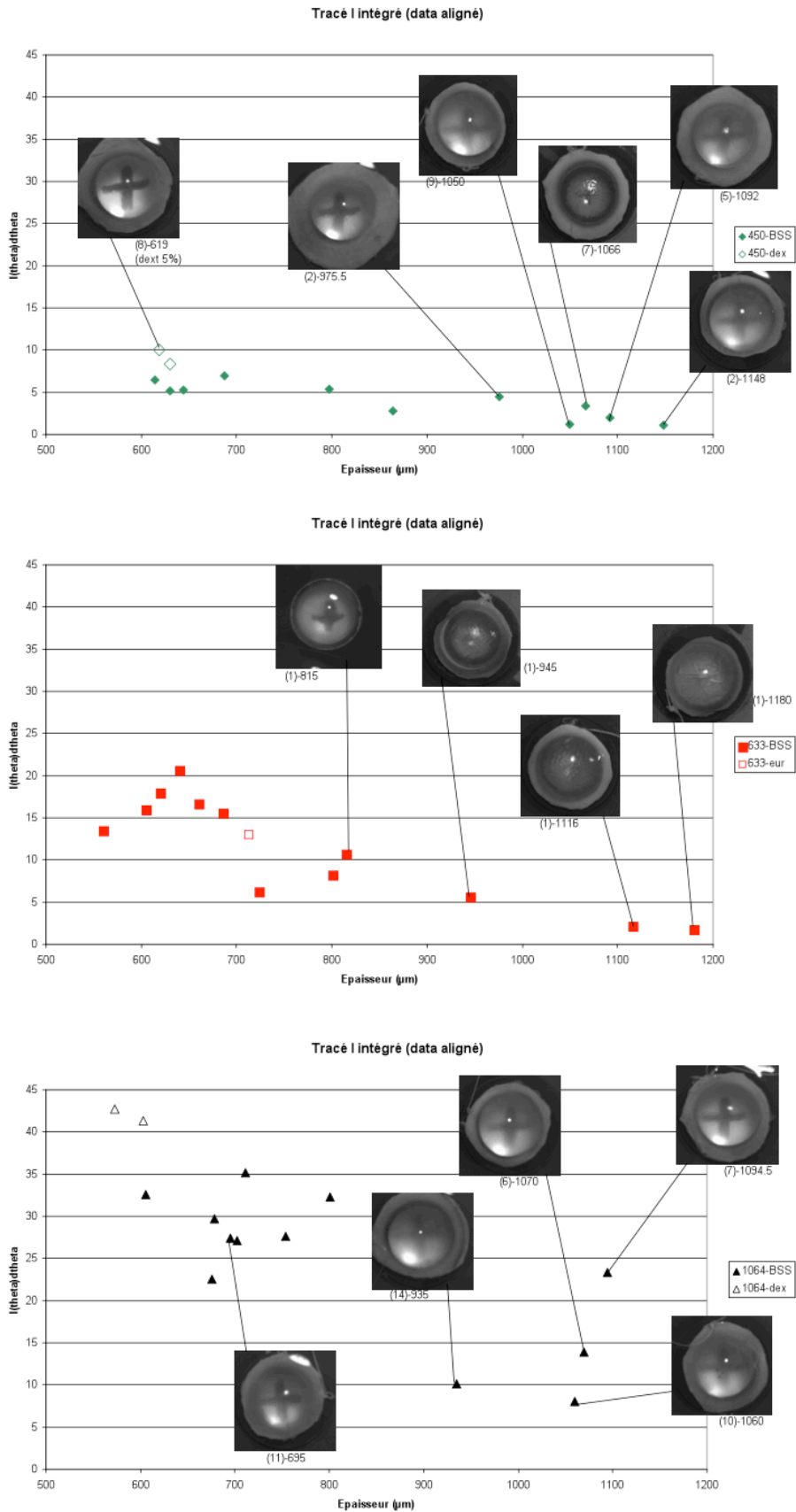


Figure 18. Tracé du paramètre de diffusion totale intégrée (TIS) dans l'espace transmis $[179^\circ-181^\circ]$ pour les longueurs d'ondes 450nm (haut), 633nm (milieu), et 1064nm (milieu). Des images correspondantes de la cornée posée sur une croix sont présentées sur les figures.

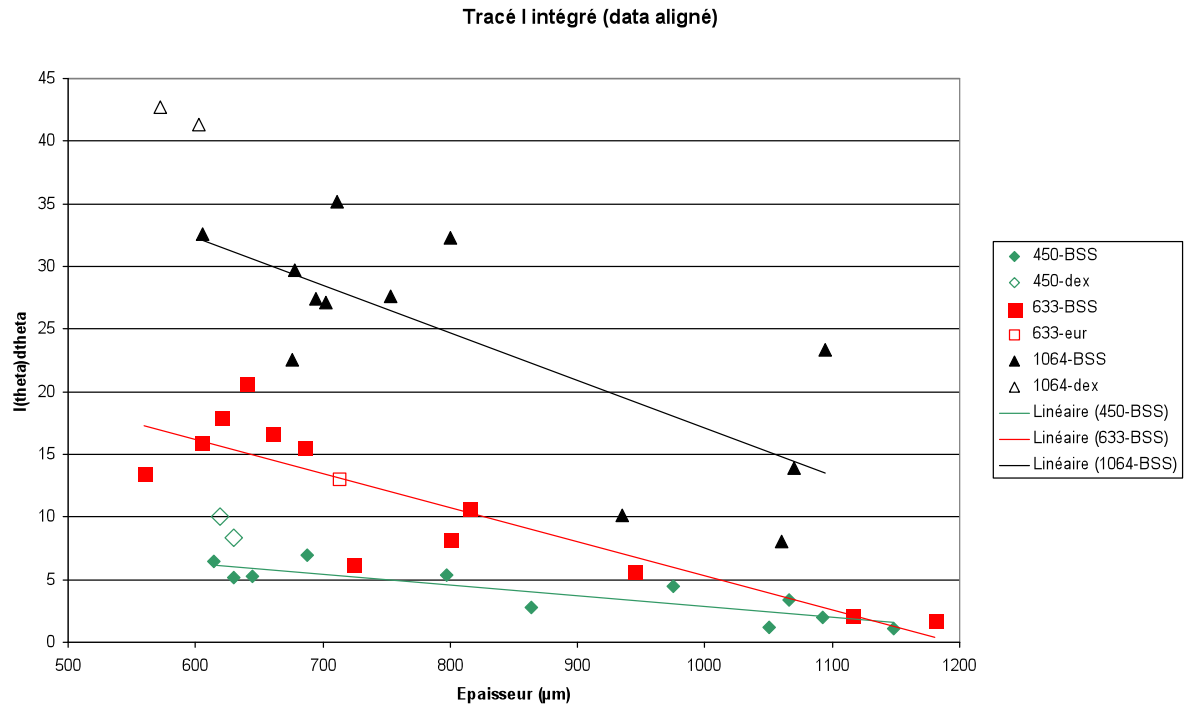


Figure 19. Tracé du TIS calculé en fonction de l'épaisseur de la cornée dans l'espace transmis t [179°-181°] pour les longueurs d'ondes 450nm (vert), 633nm (rouge), et 1064 nm (noir).

La figure 19 expose de plus une dépendance de la diffusion à la longueur d'onde plus importante pour les cornées proches de l'épaisseur physiologique et qui tend à diminuer avec l'augmentation de l'épaisseur du tissu. Ce résultat corrobore et complète les résultats présentés au §1. En effet, la diffusion de Rayleigh fortement dépendante à la longueur d'onde et due aux fibrilles de collagène du stroma, est dominante dans le cas des cornées relativement minces. Une contribution supplémentaire intervient dans le cas des cornées épaisses comme nous l'avons également constaté au §1. Nous attribuons cela à l'apparition de lacs intervenant avec l'œdème cornéen. Ces lacs induisent, de par leur taille, un autre type de diffusion peu dépendant à la longueur d'onde (voir Chapitre II). L'apparition de ces lacs est mise en avant grâce aux images OCT enregistrées et présentées au paragraphe suivant.

2.3. Images OCT: résultats²²

Parallèlement aux mesures de diffusion présentées précédemment, des images de coupe OCT ont été réalisées sur les cornées à différentes étapes du processus de déturgescence. Une image tridimensionnelle de la cornée est présentée à la figure 20. On voit la partie postérieure de la cornée. On peut distinguer l'endothélium, la membrane de Descemet, ainsi que les lamelles de collagène dans le stroma.

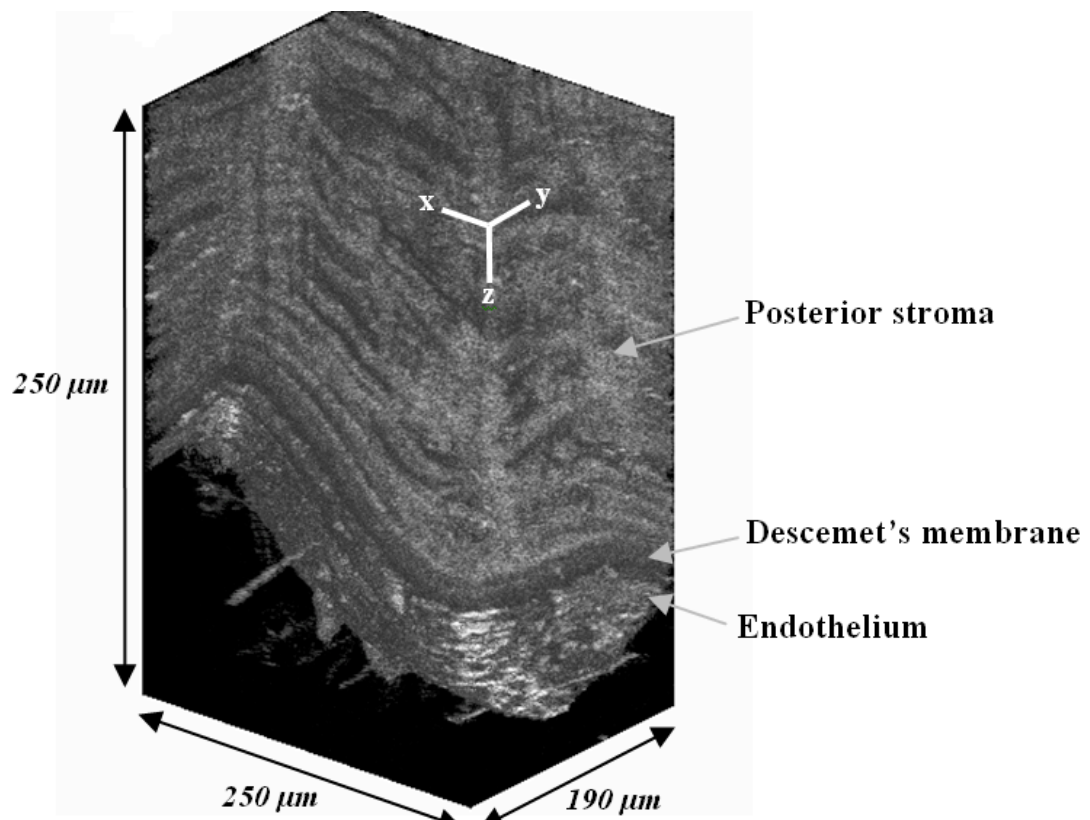


Figure 20. Image tridimensionnelle de la partie postérieure d'un greffon de cornée²³.

L'évolution de la structure cornéenne imagée par OCT a été présentée au §3.2 du chapitre II. Nous renvoyons ici à la relecture de ce paragraphe. Les figures 21 et 22 montrent les résultats typiques obtenus par OCT pour des cornées d'épaisseurs différentes. On constate l'apparition progressive de lacs, apparaissant sous forme de tâches sombres sur les images de coupes OCT. Pour des cornées œdémateuses dont les épaisseurs sont supérieures à 750 µm, la présence de lacs est systématique. Dans le cas des cornées

²² Réalisées lors d'un séjour expérimental à l'Institut Fresnel de Marseille.

²³ Réalisée par Olivier Casadessus de l'Institut Fresnel, Marseille

minces, on distingue des structures lumineuses correspondant aux réflexions au niveau des interfaces séparant les différentes lamelles de collagène. Ces structures peuvent correspondre aux kératocytes présentes à ce niveau, mais également à des réflexions issues des différentes lamelles de collagène d'orientations différentes.

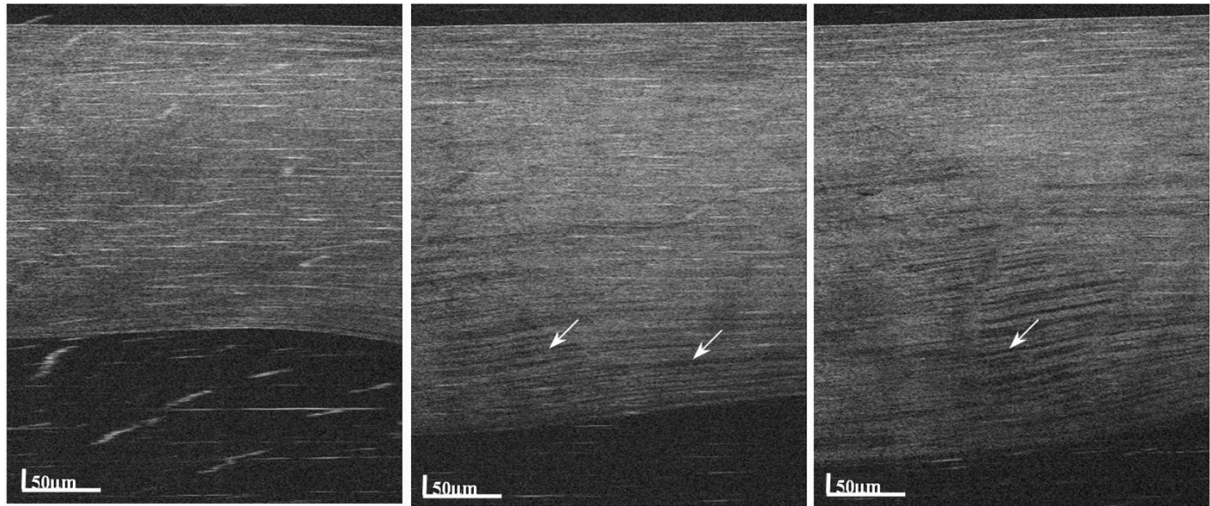


Figure 21. Évolution de la structure cornéenne pour des épaisseurs de 730, 795 et 815 μm . Les flèches blanches indiquent la présence de lacs [4].

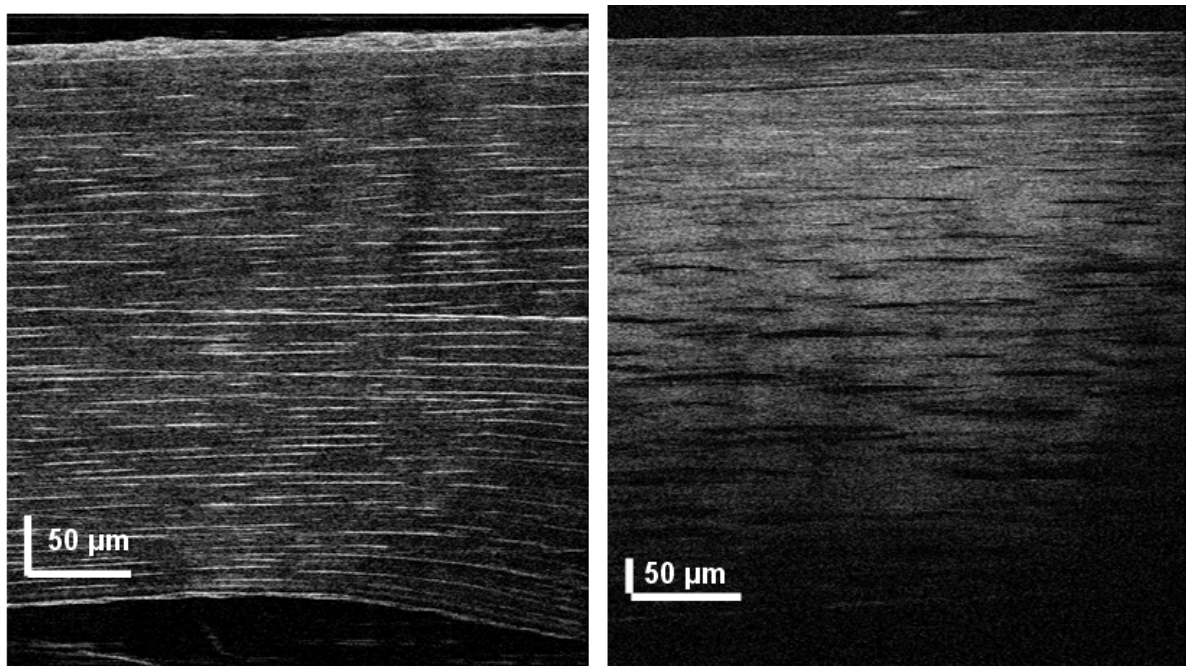


Figure 22. Coupes OCT 2D d'une cornée mince d'épaisseur 650 μm (gauche) et d'une cornée très œdémateuse d'épaisseur 1145 μm (droite).

Ces structures lumineuses (cohérentes) apparaissant sur les cornées minces sont comme un effet miroir des structures sombres (incohérentes) apparaissant sur les cornées

épaisses. Une fois encore, l'hypothèse de deux modes de diffusion complémentaires est confirmée par ces observations.

Conclusion

Des mesures différentes et complémentaires de diffusion par la cornée ont été réalisées. Si chaque tissu est unique et présente une signature particulière, l'ensemble de ces résultats permet de tirer quelques conclusions quant à l'origine de la transparence de la cornée mince et à la perte de transparence du tissu œdémateux.

- Les mesures spectrométriques²⁴ de l'intensité transmise à travers une cornée montrent une plus forte dépendance à la longueur d'onde de la diffusion des cornées claires. De plus, la section efficace de diffusion est inférieure à celle d'une fibrille de collagène unique dans ce cas. Lorsque la cornée devient épaisse cette dépendance à la longueur d'onde diminue progressivement, et la section efficace de diffusion augmente. On voit ainsi un double comportement mettant en avant deux types de diffusions. Pour les cornées fines, la diffusion de Raleigh semble dominer, pour les cornées épaisses, un autre régime de diffusion est à considérer.*
- Des mesures de diffusion par goniométrie pour plusieurs longueurs d'onde ont également été réalisées lors d'un séjour à l'Institut Fresnel de Marseille. Ces mesures permettent une caractérisation de la diffusion cornéenne dans l'ensemble de l'espace défini par le plan d'incidence. C'est la première fois à notre connaissance qu'une telle étude est réalisée et que la caractérisation complète de la diffusion cornéenne dans le visible et l'infrarouge est produite. Ces mesures obtenues sur de larges plages angulaires et avec une résolution importante, confirment les constatations faites grâce aux résultats des mesures spectrométriques.*
- Des images OCT ont été réalisées sur les cornées à différentes épaisseurs en parallèle des mesures de diffusion par goniométrie à l'Institut Fresnel de Marseille. Elles mettent en avant une structure évoluant avec l'épaisseur du tissu. À partir d'une certaine épaisseur, on voit l'apparition de « lacs », structures de formes cylindrique et de taille micrométriques. L'apparition de ces structures correspond pour les mesures de diffusion à la transition entre une diffusion de type Rayleigh, et une diffusion peu dépendante à la longueur d'onde. Pour des cornées minces, la diffusion est principalement due aux fibrilles de collagène et à la perturbation progressive de*

²⁴ Réalisées dans le cadre du séjour postdoctoral de Donald Peyrot

leur ordre (chapitre II). Pour les cornées plus épaisses, la diffusion est principalement due aux lacs que l'on voit apparaître dans les coupes OCT

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Peyrot D, Marciano T, Aptel F, Crotti C, Deloison F, Lemaire S, Bancelin S,, Kowalczyk L, Alahyane, Savoldelli M, Legeais JM, F, Plamann. Effet of Incident Light Wavelength and Corneal Edema on Light Scattering and Penetration : Laboratory Study of Human Corneas, JRS, 2010.
- [2] Source recueillie sur le site internet : www.wma.net
- [3] Boettner EA, Wolter JR. Transmission of the ocular media. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1962 ; 772-783.
- [4] Casadessus O et al, Light scattering from edematous corneal grafts microstructure : electromagnetic modelization, Biomedical Optics Express, Vol. 3, Issue 8, 1793-1810, 2012
- [5] Amra C et al, Multiwavelength (0.45–10.6 μm) angle-resolved scatterometer or how to extend the optical window, Applied Optics, Vol. 32, Issue 28, pp. 5462-5474 (1993)
- [6] D. Huang, et al., "Optical Coherence Tomography." Science **254**(5035), 1178-1181 (1991)
- [7] E. Beaurepaire, A. C. Boccara, M. Lebec, L. Blanchot, and H. Saint-Jalmes, "Full-field optical coherence tomography." Opt. Letters. **23**(4), 244-246 (1998)
- [8] A. Dubois, L. Vabre, A. C. Boccara, and E. Beaurepaire, "High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope." Appl. Opt. 41(4), 805-812 (2002)
- [9] G. Latour, G. Georges, L. Siozade-Lamoine, C. Deumié, J. Conrath, and L. Hoffart, "Human graft cornea and laser incisions imaging with micrometer scale resolution full-field optical coherence tomography." J. Biomed. Opt. **15**(5), 056006 (2010)
- [10] G. Latour, G. Georges, L. Siozade-Lamoine, C. Deumié, J. Conrath, and L. Hoffart, "Light scattering from human corneal grafts: Bulk and surface contribution," J. Appl. Phys. **108**(5), 053104 (2010).

CHAPITRE IV : Étude de la perte de cohérence spatiale d'un faisceau transmis à travers des cornées claires et œdémateuses par holographie numérique hors-axe

Dans les chapitres précédents, nous avons mesuré par plusieurs méthodes la diffusion optique de la cornée saine et œdémateuse, et tiré quelques conclusions quant aux modes de diffusion ayant lieu dans les tissus selon leurs différents degrés d'œdème.

Cependant, la perte de cohérence d'un faisceau traversant le tissu n'a pas été prise en compte. Or, la perte de cohérence, comme nous le montrons dans ce chapitre, est directement liée à la structure du milieu diffusant.

Un nouveau dispositif de mesure de l'intensité mutuelle par holographie numérique hors-axe a donc été conçu et mis en place dans le cadre de ce travail de thèse. Celui-ci est utilisé pour mesurer la perte de cohérence du front d'onde traversant le tissu.

Dans la première partie, nous décrivons l'état de l'art en ce qui concerne l'holographie numérique hors-axe, ainsi que le dispositif et le programme numérique réalisés.

Dans la seconde partie, nous montrons comment ce dispositif d'holographie numérique hors-axe peut être utilisé afin de mesurer l'intensité mutuelle d'un faisceau traversant un milieu diffusant. Nous présentons les résultats obtenus sur des solutions de pastis.

Enfin, nous présentons les résultats obtenus sur le tissu cornéen sain et pathologique.

1. Holographie numérique : État de l'art

1.1 Introduction

Denis Gabor a été récompensé du prix Nobel de physique pour l'invention de l'holographie en 1948 [10,11,12]. Le mot holographie provient du grec : *'holos'* signifiant tout ou entier, et *'graphein'* signifiant écrire. En effet la technique holographique permet d'enregistrer puis de reconstruire l'ensemble du front d'onde complexe diffracté par un objet à l'aide d'une onde cohérente.

1.2 Technique holographique, évolution

L'hologramme, est la figure d'interférence enregistrée sur un support bidimensionnel (figure 1). Ces interférences sont réalisées par la superposition d'une onde diffractée par un objet et une onde de référence. L'hologramme contient l'ensemble de l'information sur l'onde diffractée. L'objet peut ainsi être reconstruit en volume en amplitude et phase en illuminant l'hologramme avec l'onde de référence seule (figure 2).

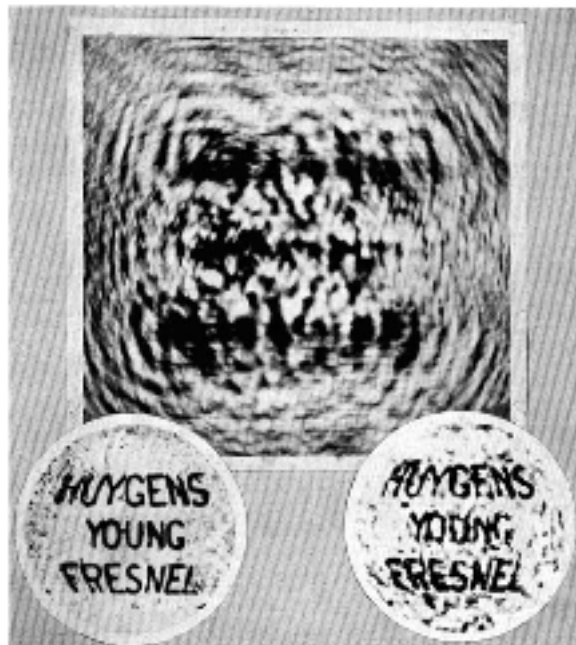


Figure 1. Un des premiers hologrammes enregistrés par Gabor. On voit la figure d'interférences en haut, l'objet étudié en bas à gauche, et l'objet reconstruit en bas à droite [12].

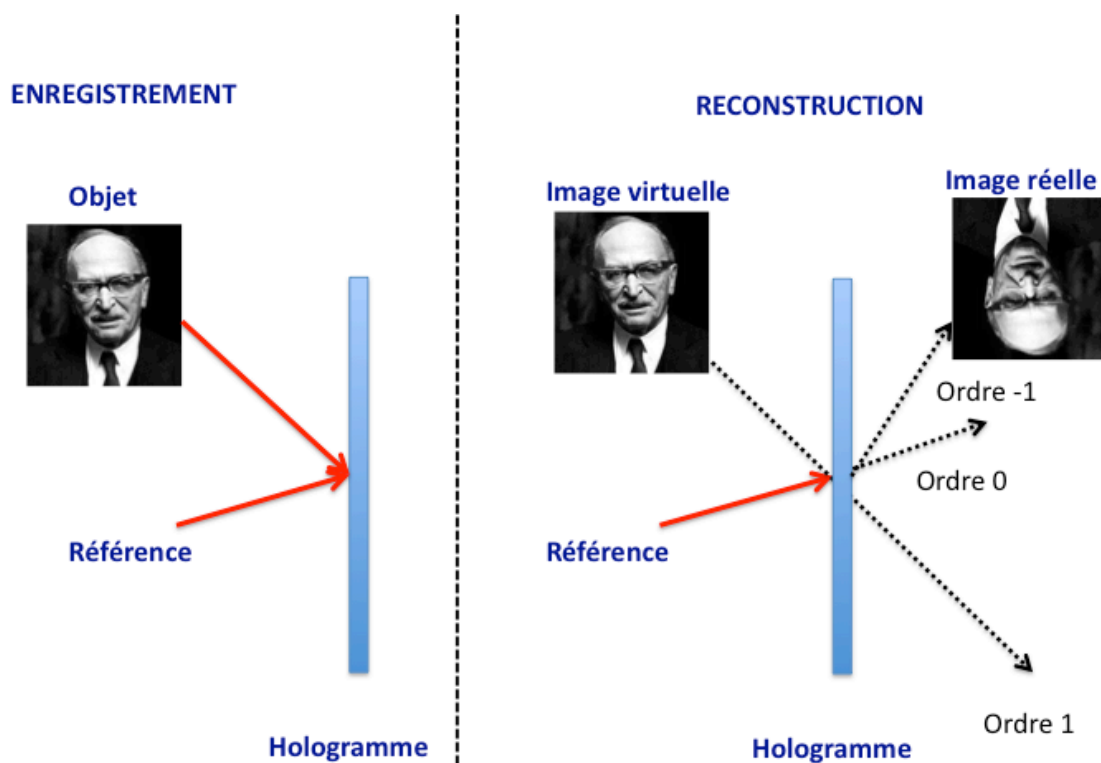


Figure 2. Schématisation du principe d'holographie. À gauche, la phase d'enregistrement, et à droite, la phase de reconstruction de l'image. Pour les explications, voir le texte. L'objet de reconstruction est un portrait de Denis Gabor.

Différents ordres de diffraction apparaissent alors, dont une image réelle (ordre -1) reconstruite du côté opposé à l'objet par rapport à l'hologramme, et une image virtuelle (ordre 1) reconstruite à l'endroit de l'objet. À l'époque où Denis Gabor a réalisé cette nouvelle technique d'imagerie, les sources présentant une cohérence suffisante étaient relativement rares. C'est avec l'invention du laser que l'holographie a connu un développement considérable. Au cours des années 1950, la technique holographique a été principalement appliquée en microscopie électronique et en microscopie électronique à rayons X [16]. Pour ces premières techniques holographiques, les ondes de référence et objet illuminaient parallèlement le support d'enregistrement de l'hologramme. La phase de reconstruction faisait donc apparaître sur l'axe optique l'image réelle superposée à l'image virtuelle ainsi qu'à l'ordre zéro non diffracté. Leith et Upatnieks ont alors introduit la configuration hors-axe où le bras objet et le bras de référence présentent un angle d'incidence différent sur l'hologramme [17-19]. Les différents ordres de diffraction sont alors spatialement séparés. Cette méthode a permis de considérablement améliorer la résolution des objets imagés. Leith et Upatnieks ont notamment été les premiers à

reconstruire un objet tridimensionnel par cette méthode. Depuis, les applications ont été nombreuses et une grande variété de sources a été utilisée. Denisyuk [20,21] et Benton [22] ont indépendamment développé l'holographie à réflexion par lumière blanche, couramment utilisée pour les cartes de crédit. Des applications diverses en métrologie ont été rendues possibles par cette méthode. Par exemple, la mesure de déplacements micrométriques subis par un objet [23,24]. L'essor de l'informatique a permis dans un premier temps, sous l'impulsion de Goodman [25], de réaliser la phase de reconstruction numériquement après discrétisation de l'hologramme enregistré sur plaque photographique. L'holographie numérique a également connu une avancée importante avec l'invention du capteur photographique CCD. Jusque là, des plaques photographiques étaient utilisées afin d'enregistrer les interférences. Au cours des années 1990, Oquoz [32], puis Schnars et Jüptner [26,27,28] ont développé l'holographie numérique qui consiste à réaliser l'ensemble des processus d'enregistrement et de reconstruction de l'hologramme numériquement. L'holographie numérique offre de nombreux avantages, parmi lesquels la possibilité d'enregistrer des hologrammes à fréquences vidéo et surtout, l'accès aux données quantitatives en ce qui concerne la phase. Divers traitements numériques peuvent également être appliqués pour améliorer la qualité de l'image, compenser les aberrations ou changer la position du plan de reconstruction. L'équipe de Depeursinge [29,30,31] a adapté l'holographie numérique à la microscopie, permettant d'obtenir des résolutions latérales de l'ordre du micron, et une résolution axiale de l'ordre du nanomètre en profilométrie à partir d'un seul hologramme. Cela a permis d'imager en phase et amplitude des cellules vivantes et ouvert de nombreuses perspectives de recherches.

2. Dispositif

Le dispositif monté pendant ma thèse est un dispositif d'holographie numérique hétérodyne hors-axe²⁵. Le principe d'holographie hétérodyne a été introduit par Yamagushi et Zhang [34]. Le principe consiste à appliquer un décalage de phase à l'onde de référence, et enregistrer plusieurs images pour différentes valeurs de phase. La soustraction de ces images permet de supprimer les ordres non désirés. Gross [35,36] a réalisé ce décalage de phase en variant la fréquence de l'onde de référence. L'holographie hétérodyne hors-axe permet d'atteindre une très grande sensibilité [37]. La limite quantique de bruit correspondant à un photon-électron par pixel peut être atteinte [38].

Un tel dispositif a été monté dans le cadre de cette thèse. Il ne s'agit pas ici d'atteindre la plus haute résolution possible ou la plus grande sensibilité possible en holographie hétérodyne hors-axe. Le but est d'étudier la perte de cohérence d'un faisceau traversant le tissu cornéen afin d'étudier les propriétés optiques de celui-ci. L'holographie numérique permet une reconstruction quantitative en phase et en amplitude d'une onde diffusée. Nous montrons donc la possibilité pour un tel dispositif de calculer l'intensité mutuelle d'un faisceau traversant un milieu diffusant. La mesure de l'intensité mutuelle est possible par plusieurs méthodes interférométriques ou non interférométriques. À notre connaissance, c'est la première fois que l'holographie numérique est utilisée à cette fin.

Deux dispositifs holographiques ont été montés dans le cadre de cette thèse. Un premier où le décalage de phase nécessaire au filtrage des ordres non désirés est réalisé par des modulateurs acousto-optiques (figure 3). Un deuxième où cette étape est réalisée grâce à un miroir monté sur un transducteur piézo-électrique (figure 4).

²⁵ Le dispositif a été initialement monté au laboratoire de Benoît C. Forget de l'Université Paris Descartes. Je remercie chaleureusement celui-ci pour m'avoir prêté son matériel ainsi que pour ses précieux conseils.

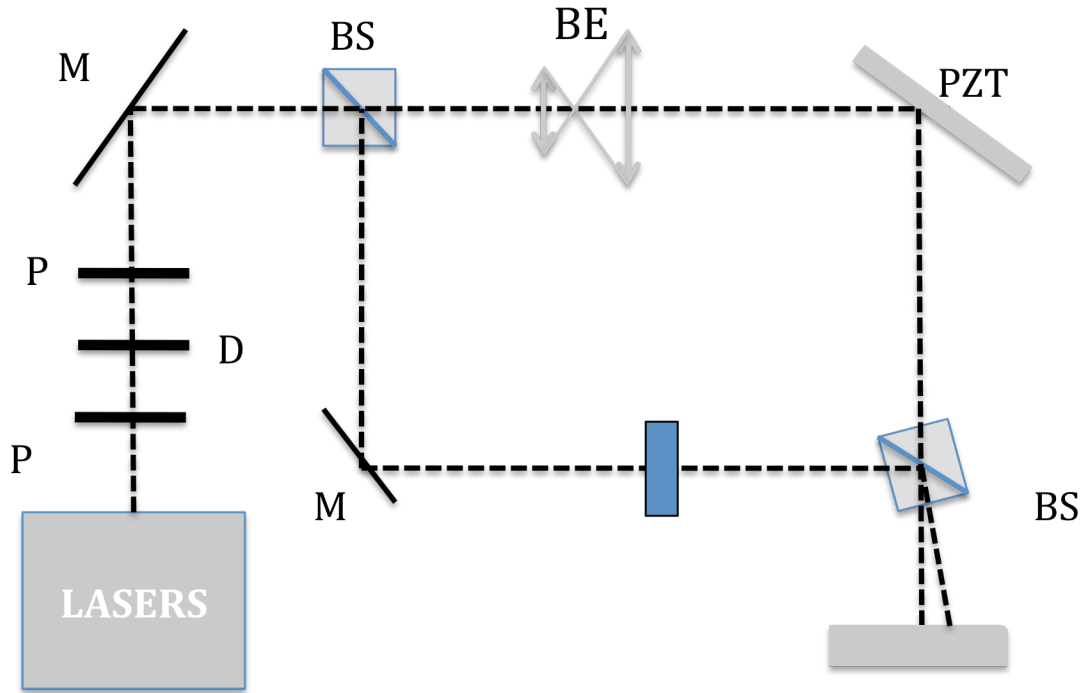


Figure 3. Dispositif d'holographie numérique hors-axe. Le décalage de phase est introduit par un miroir monté sur un transducteur piézo-électrique. M : miroir, BS : cube séparateur, BE : étendeur de faisceau, P : polariseur, D: densité optique, PZT : transducteur piézo-électrique.

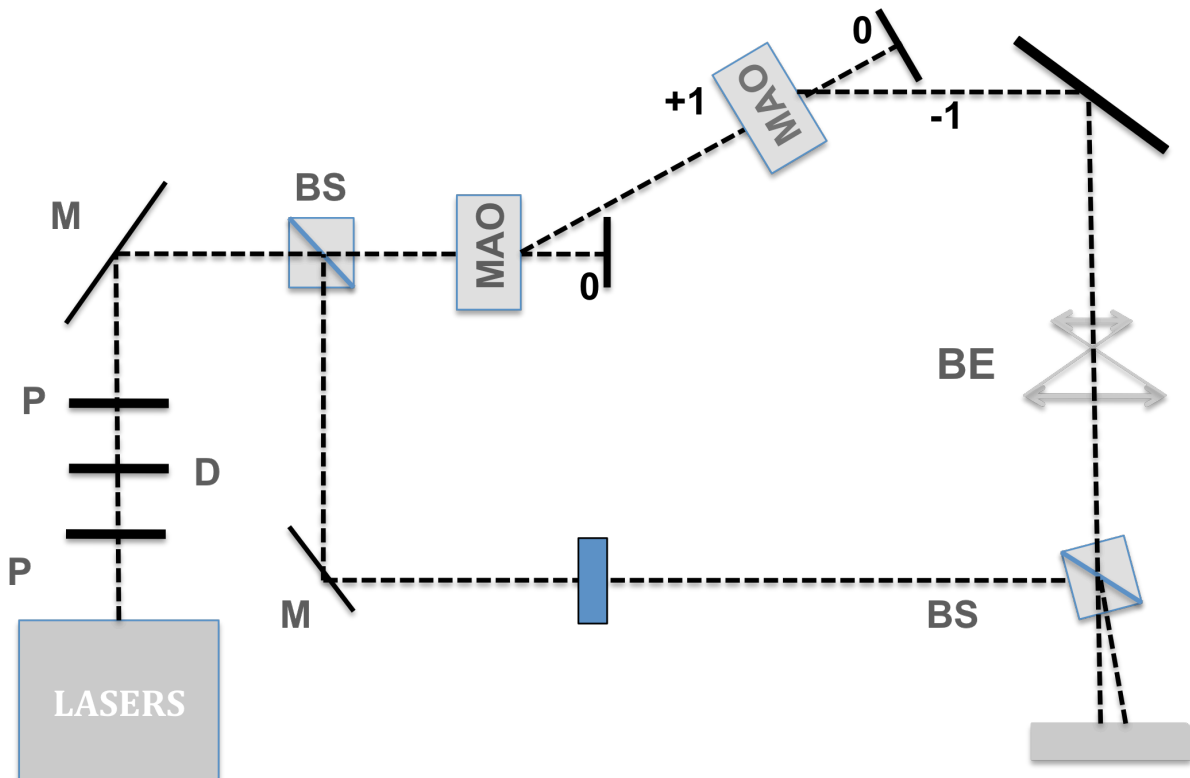


Figure 4. Dispositif d'holographie numérique hétérodyne hors-axe. Le décalage de phase est introduit par deux modulateurs acousto-optiques. M : miroir, BS : cube séparateur, BE : étendeur de faisceau, P : polariseur, D: densité optique, MAO : modulateur acousto-optique.

Dans les deux cas, les deux bras arrivent au niveau du détecteur avec un angle (hors-axe) et un décalage de phase. Le dispositif est constitué d'un laser He-Ne ($\lambda = 785nm$, 50mW, I=50mA). L'intensité du laser est modulée grâce à une densité variable ainsi que deux polariseurs. Un cube séparateur permet de séparer le faisceau en deux bras : un bras objet que l'on représentera par un champ complexe E_O et un bras de référence décrit par le champ complexe E_R . L'onde E_R traverse un étendeur de faisceau, puis est projetée sur le détecteur par le biais d'un miroir monté sur un transducteur piézo-électrique (figure «3) ou de modulateurs acousto-optiques (figure 4). L'onde E_O est transmise à travers l'objet étudié pour interférer avec le champ E_R au niveau du détecteur. Le détecteur utilisé est une caméra CCD (PCO Pixelfly) comprenant 1024x1392 pixels de 6,45x6,45 μm .

3. Enregistrement et reconstruction Numérique

3.1. Enregistrement de l'hologramme

Un hologramme est la figure d'interférence créée au niveau d'un détecteur entre deux ondes cohérentes : l'onde objet E_O et l'onde de référence E_R . Dans le plan Oxy de l'hologramme est enregistrée une figure d'interférence en deux dimensions avec une certaine distribution en intensité I_H :

$$I_H(x,y) = (E_R + E_O)(E_R + E_O)^* = |E_R|^2 + |E_O|^2 + E_R^* E_O + E_R E_O^* \quad (1)$$

Nous avons $|E_R|^2 = I_R$ et $|E_O|^2 = I_O$ où I_R et I_O sont respectivement les intensités des ondes de référence et de l'onde objet.

En considérant l'onde de référence E_R comme étant une onde plane, avec une intensité uniforme, le champ $\psi(x,y)$ de l'onde reconstruite par holographie peut être obtenu en illuminant l'hologramme avec une onde plane U . En effet, nous obtenons alors :

$$\psi(x,y) = UI_H(x,y) = UI_R + UI_O + UE_R^* E_O + UE_R E_O^* \quad (2)$$

Les deux premiers termes de l'équation (2) sont les termes de diffraction d'ordre zéro. Les troisième et quatrième termes de l'équation sont quant à eux le produit des interférences créées et sont à l'origine des deux images conjuguées créées par holographie. L'une, $UE_R^*E_O$, est appelée image virtuelle et est reconstruite classiquement au niveau de l'objet (-z). L'autre, $UE_RE_O^*$ appelée image réelle, est classiquement reconstruite de l'autre côté de l'hologramme, symétriquement à l'image virtuelle. Comme nous le verrons ici, en holographie numérique, ce processus de reconstruction se fait numériquement. Par conséquent, seule l'étape de l'enregistrement se fait optiquement (mais sur support numérique).

3.2. Holographie hors-axe et filtrage spatial

Comme nous l'avons vu, l'holographie telle qu'originellement conçue par Gabor possédait une configuration axiale où le bras de référence et le bras objet possédaient la même direction de propagation. Dans ce cas, les différentes composantes de l'équation (1) se retrouvaient superposées les unes aux autres. Ainsi, lors de la reconstruction, l'un des termes était reconstruit alors que l'autre, apparaissait flouté et superposé à ce dernier. Le principe de l'holographie hors-axe est de spatialement séparer les différents ordres en introduisant un angle θ entre les deux bras. Ainsi, les différents termes de l'équation se propagent dans différentes directions de l'espace lors de la reconstruction. Le principe est que les différents termes ne se superposent plus lorsqu'ils sont reconstruits à la distance z. On peut alors écrire l'onde de référence sous la forme :

$$E_R(x,y) = \sqrt{I_R} \exp(-i\frac{2\pi}{\lambda}x \sin\theta),$$

L'intensité I_H devient alors :

$$I_H = I_R + I_O + \sqrt{I_R} \exp(-ikx \sin\theta)E_O + \sqrt{I_R} \exp(ikx \sin\theta)E_O^*$$

Le facteur de phase introduit permet de connaître l'angle avec lequel les différentes composantes sont séparées de l'axe. Les ordres zéro ne comportant pas de terme de phase ne sont pas déviés de leurs directions. Si on s'intéresse à la transformée de Fourier de ces composantes, les facteurs de phases $\exp(-ikx \sin\theta)$ peuvent être interprétés comme un

saut au niveau des fréquences spatiales associées aux termes réels et virtuels. Les fréquences spatiales des termes d'ordre zéro se retrouvent au centre du plan de Fourier et les termes réels et virtuels sont symétriquement situés par rapport à eux. Du fait de cette séparation spatiale des différents termes, il est possible de les filtrer spatialement afin de supprimer les termes parasites et augmenter le signal sur bruit (Figure 5).

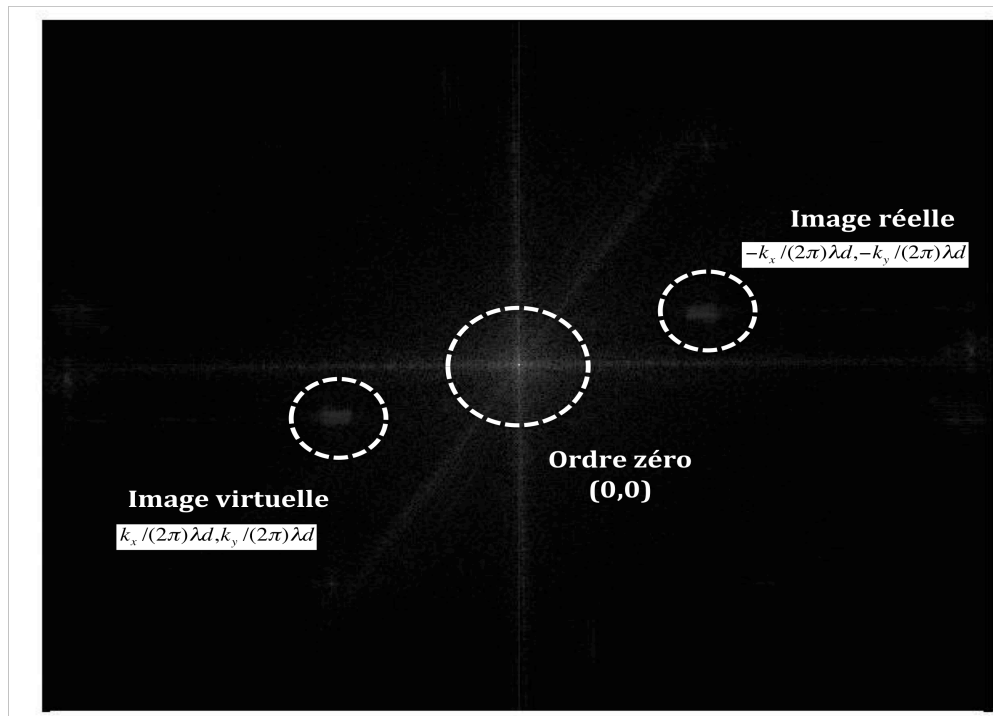


Figure 5. Plan de Fourier d'un hologramme. Les différents ordres sont représentés sur la figure.

3.3. Filtrage temporel : holographie numérique hétérodyne

Nous avons vu qu'il était possible de filtrer spatialement le signal grâce à une configuration hors-axe du dispositif holographique. Afin d'augmenter le signal sur bruit il est également possible d'appliquer un filtrage temporel. Celui-ci permet de supprimer les termes d'ordres zéro ainsi que le terme comprenant l'image virtuelle. Le principe consiste à enregistrer différents hologrammes successifs où l'onde de référence a été à chaque fois déphasée d'une manière particulière. Ce déphasage peut se réaliser de différentes manières. Nous relaterons ici les deux méthodes utilisées dans le cadre des travaux de cette thèse: l'utilisations de modulateurs acousto-optiques, et l'utilisation d'un transducteur piézoélectrique. Cependant il existe d'autres méthodes comme par exemple l'ajout de cristaux liquides à retard de phase [33].

3.3.1. Principe

On considère l'onde de référence comme étant une onde plane incidente sur le plan de l'hologramme : $E_R = \varepsilon_R e^{i\alpha}$ où $\alpha(x,y)$ est la phase globale de l'onde. L'onde objet quant à elle possède une amplitude $\varepsilon_O(x,y)$ ainsi qu'une phase $\varphi(x,y)$.

Nous enregistrons donc au niveau de l'hologramme une intensité :

$$I_H(x,y) = |E_O + E_R|^2 = \varepsilon_R^2(x,y) + \varepsilon_O^2(x,y) + \varepsilon_R \varepsilon_O(x,y) e^{i(\varphi-\alpha)} + \varepsilon_R \varepsilon_O(x,y) e^{-i(\varphi-\alpha)}$$

$$I_H(x,y) = |E_O + E_R|^2 = \varepsilon_R^2(x,y) + \varepsilon_O^2(x,y) + 2\varepsilon_R \varepsilon_O(x,y) \cos[\varphi(x,y) - \alpha]$$

On considère 4 hologrammes successifs où les ondes de référence présentent à chaque enregistrement un décalage de phase de $\pi/2$. Nous obtenons ainsi les 4 intensités suivantes :

$$I_0 = \varepsilon_R^2 + \varepsilon_O^2 + 2\varepsilon_R \varepsilon_O \cos \varphi$$

$$I_{\pi/2} = \varepsilon_R^2 + \varepsilon_O^2 + 2\varepsilon_R \varepsilon_O \cos(\varphi - \pi/2) = \varepsilon_R^2 + \varepsilon_O^2 - 2\varepsilon_R \varepsilon_O \cos \varphi$$

$$I_\pi = \varepsilon_R^2 + \varepsilon_O^2 + 2\varepsilon_R \varepsilon_O \cos(\varphi - \pi) = \varepsilon_R^2 + \varepsilon_O^2 - 2\varepsilon_R \varepsilon_O \cos \varphi$$

$$I_{3\pi/2} = \varepsilon_R^2 + \varepsilon_O^2 + 2\varepsilon_R \varepsilon_O \cos(\varphi - 3\pi/2) = \varepsilon_R^2 + \varepsilon_O^2 + 2\varepsilon_R \varepsilon_O \cos \varphi$$

La valeur du champ $\sqrt{E_O^2(x,y)}$ est obtenue en enregistrant une 5^{ème} image en bloquant le bras de référence. Le champ complexe $\varphi_O = E_O$ est alors entièrement défini par l'équation suivante :

$$\varphi_O(x,y) = \frac{1}{4\varepsilon_R} \left[(I_0 - I_\pi) + i(I_{3\pi/2} - I_{\pi/2}) \right]$$

En calculant numériquement cette valeur de φ_O , on supprime en même temps les termes d'ordre zéro ainsi que E_R . On obtient l'onde complexe de l'objet diffracté au niveau

du plan de l'hologramme. IL est alors possible de propager numériquement cette onde dans tous les plans de l'espace pour reconstruire l'image en amplitude et en phase.

À noter que la phase de l'onde objet peut directement être calculée à partir des différents hologrammes déphasés grâce au calcul :

$$\varphi(x,y) = \tan^{-1}\left(\frac{I_{\pi/2} - I_{3\pi/2}}{I_0 - I_{\pi}}\right)$$

Cette technique du décalage de phase est largement utilisée en métrologie et dans diverses applications [23,24]. Elle est également utilisée dans des dispositifs non interférométriques pour le profilage de surface [23,24]. L'idée de combiner différents hologrammes avec une différence de quadrature de phase avait déjà été pensée par Gabor et Gros [12,45]. Toutefois la complexité du système optomécanique nécessaire pour une telle réalisation ne leur a pas permis de mettre à l'époque leur idée en application. Différentes autres méthodes permettent d'aboutir au même résultat. Il est en effet possible avec seulement trois enregistrements de supprimer les termes parasites en appliquant des déphasages successifs de 0, $\pi/2$, et $-\pi/2$. Il est possible également, sans connaître la valeur du saut de phase, de calculer le champ complexe du bras objet à partir de seulement deux hologrammes.

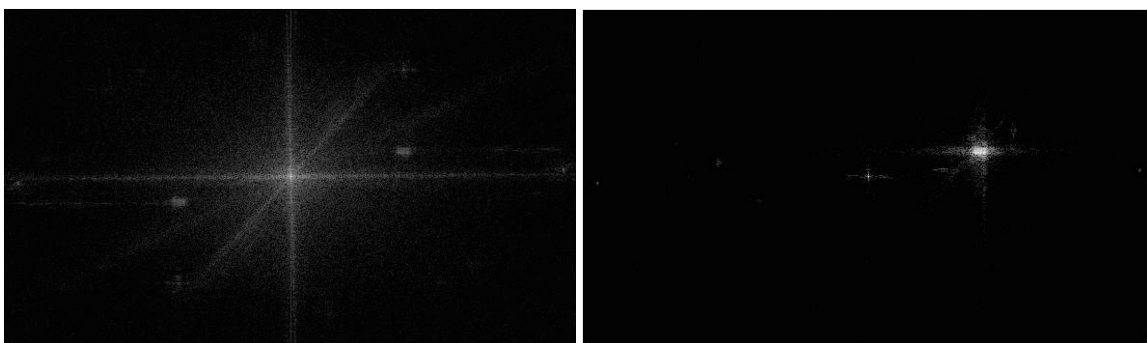


Figure 6. Plan de Fourier d'un hologramme avec les différents ordres de diffraction (gauche). Plan de Fourier de l'hologramme démodulé. On constate la quasi suppression des termes d'ordre zéro ainsi que de l'image virtuelle (droite). De plus le signal sur bruit a été augmenté.

3.3.2. Filtrage temporel avec modulateurs acousto-optiques

Afin de réaliser les sauts de phases au niveau du bras de référence, il est possible d'utiliser des modulateurs acousto-optiques (AOM). Ils possèdent la particularité de pouvoir diffracter et changer la fréquence de la lumière incidente en utilisant l'effet acousto-optique [39]. Par cette méthode, on produit un déphasage constant et linéaire de l'onde de référence par rapport au bras objet. Il est possible d'écrire les amplitudes des champs de la façon suivante :

$$E_R(x, y; t) = \varepsilon_R e^{-i\omega_R t}$$

$$E_O(x, y; t) = \varepsilon_O(x, y) e^{i\varphi(x, y) - i\omega_O t}$$

avec $\omega_R - \omega_O = \delta f$. On peut alors écrire l'intensité de l'hologramme comme une variable du temps et de l'espace 2D dans lequel elle est définie :

$$I_H(x, y; t) = \left| E_O + E_R e^{2i\pi\delta f t} \right|^2$$

$$I_H(x, y; t) = \varepsilon_R^2 + \varepsilon_O^2(x, y) + 2\varepsilon_R \varepsilon_O(x, y) \cos[\varphi(x, y) - \Omega t] \quad (3)$$

Afin d'enregistrer 4 images en quadrature de phase et en déduire le champ complexe $\varphi_O = E_O$, il est nécessaire de prendre les images à un temps t correspondant à $t = 2\pi n / N\delta f$, où N est le nombre d'hologrammes enregistrés I_n tel que $n = 0..N - 1$. Plus précisément, il est nécessaire d'intégrer sur le temps d'exposition du support numérique d'enregistrement. En démodulant le signal on retrouve donc $\varphi_O = E_O$:

$$\varphi_O = E_O = \left(\frac{1}{NE_R^*} \right) \sum_{n=0}^{N-1} I_n e^{i\frac{2\pi n}{N}}$$

Dans notre cas, $N=4$, et on retrouve donc $\varphi_O(x, y) = \frac{1}{4\varepsilon_R} \left[(I_O - I_x) + i(I_{3\pi/2} - I_{\pi/2}) \right]$

L'holographie hétérodyne permet donc de mesurer la phase en utilisant l'information obtenue à des temps différents alors que l'holographie numérique quant à elle permet

d'extraire la phase à partir des mesures faites sur les différents pixels de la caméra. L'intérêt d'un modulateur acousto-optique par rapport à un transducteur piézo-électrique est avant tout la précision, la cohérence et la répétitivité des mesures.

Dans le dispositif mis en place dans le cadre de cette thèse, on crée un décalage de phase δf de l'onde de référence en combinant deux modulateurs acousto-optiques (AA Opto-electronic, Orsay), AOM1 et AOM2 (voir figure 1), fonctionnant respectivement à $\Delta f + \delta f$ et à $-\Delta f$, où $\Delta f = 80 MHz$. Ainsi, on obtient un décalage de fréquence de $\delta f = 2.5 Hz$, correspondant à un temps d'acquisition de la caméra de 10Hz.

3.3.3. Filtrage temporel avec un transducteur piézoélectrique

Un miroir monté sur un transducteur piézoélectrique (PZT) peut également être utilisé pour créer un déphasage entre les deux bras d'un dispositif d'holographie numérique. Un tel dispositif a également été monté (figure 2). L'avantage du PZT par rapport aux AOM est la conservation de la qualité du faisceau du bras de référence. L'installation de PZT permet également de diriger des lasers à différentes longueurs d'onde à travers le même dispositif en suivant la même trajectoire. En supposant que l'onde incidente arrive sur le miroir avec un angle θ , et que le miroir se déplace horizontalement sur un axe orthogonal à sa surface sur une distance d , le déphasage créé correspond à $\Delta\Phi = \frac{2\pi}{\lambda} 2d \cos\theta$. L'angle θ inséré est dans notre cas de 45° . Par conséquent, pour obtenir un déphasage de $\pi/2$, il est nécessaire de faire translater le miroir d'une distance $d = \frac{\lambda}{4\sqrt{2}}$.

3.4. Filtrage spatial et temporel, traitement numérique

Grâce à la configuration hors-axe, Le filtrage spatial, ainsi que nous l'avons vu, permet de définir une zone d'intérêt autour du terme associé à l'image objet. En plus de supprimer les termes d'ordres zéro ainsi que l'image virtuelle, le filtrage spatial permet de supprimer les différents ordres parasites qui viendraient perturber le signal et d'obtenir une image de meilleur qualité. Le filtrage temporel quant à lui permet d'augmenter le signal sur bruit en plus de supprimer les termes de diffraction d'ordre zéro ainsi que le terme associé à l'image virtuelle.

La figure 7 représente un hologramme enregistré sur la caméra CCD selon le dispositif présenté en figure 1. Une mire USAF a été placée sur le trajet optique du bras objet à une distance de 22,72 cm de la caméra. La structure de la mire est diffractée et on peut distinguer les franges d'interférences entre l'onde objet diffractée et l'onde de référence. La transformée de Fourier de cet hologramme est représenté à la figure 8. Elle donne le spectre angulaire de l'hologramme enregistré. On distingue les différents ordres de diffraction de l'équation (1). La figure 8b est obtenue après démodulation du signal selon le procédé expliqué au §2.3.2. Le filtrage spatial est réalisé puis le résultat présenté à la figure 9.

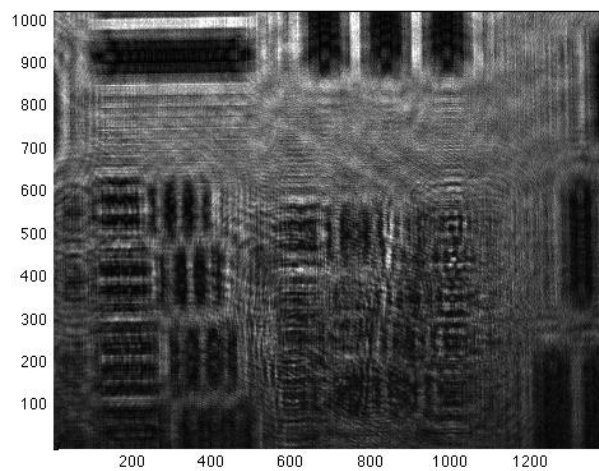


Figure 7. Hologramme de la mire USAF enregistré sur support CCD.



Figure 8. Spectre angulaire correspondant à l'hologramme de la figure 5 (gauche). Spectre angulaire démodulé numériquement à partir de 4 hologrammes déphasés (droite).



Figure 9. Filtrage spatial autour de la zone contenant le terme associé à l'image réelle. L'image est reconstituée dans un cadre de 512x512 pixels.

L'intensité dans l'espace des k d'un hologramme seul et d'un hologramme démodulé à partir de 4 enregistrements est représentée à la figure 10. On constate une amélioration considérable du signal sur bruit grâce à la démodulation de phase par 4 images. Les ordres de diffraction zéro ainsi que l'ordre correspondant à l'image virtuelle sont considérablement atténués. Il est important de choisir un angle dans la configuration hors-axe permettant une bonne séparation spatiale des ordres ainsi que la conservation d'une résolution optimale.

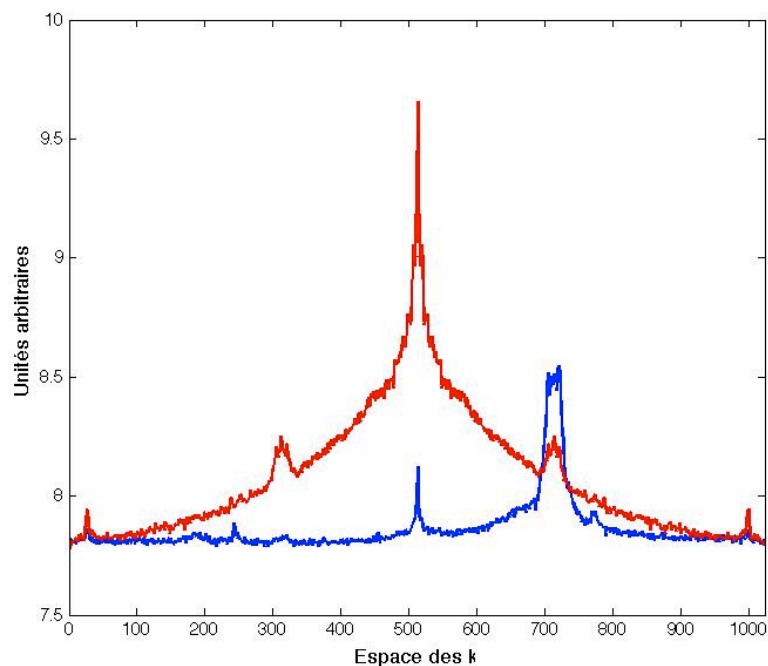


Figure 10. Intensité en échelle logarithmique du signal dans l'espace des k pour un hologramme non démodulé (rouge) ainsi que pour un signal démodulé (bleu).

3.5. Reconstruction numérique par propagation de Fresnel

L'ensemble des calculs présentés dans ce chapitre a été réalisé par l'auteur dans le cadre de cette thèse sous le programme Matlab.

Ainsi que nous l'avons vu au §1, l'holographie procède en deux étapes : l'enregistrement et la reconstruction. Nous avons jusque-là évoqué la manière utilisée pour enregistrer des hologrammes. Cette étape consiste à enregistrer sur un support numérique les franges d'interférences de l'onde de référence et de l'onde diffractée par un objet situé à une distance d de la caméra, les deux ondes étant issues de la même source cohérente.

La diffraction d'une onde lumineuse par une ouverture quelconque (Σ) située dans un plan (ξ, η) perpendiculaire à l'axe de propagation peut être décrite (sous certaines conditions) dans un plan (x, y) situé à une distance d de (Σ) par l'intégrale de Fresnel-Kirchhoff :

$$U(x, y) = \frac{e^{jkd}}{j\lambda d} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} U(\xi, \eta) \exp\left\{ \frac{jk}{2d} [(x - \xi)^2 + (y - \eta)^2] \right\} d\xi d\eta$$

que l'on peut également écrire sous la forme :

$$U(x, y) = \frac{e^{jkd}}{j\lambda d} e^{\frac{jk}{2d}(x^2 + y^2)} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \left\{ U(\xi, \eta) e^{\frac{jk}{2d}(\xi^2 + \eta^2)} \right\} \cdot e^{\frac{-j2\pi}{\lambda d}(x\xi + y\eta)} d\xi d\eta$$

Autrement dit, à un facteur multiplicateur près, l'intégrale de Fresnel-Kirchhoff peut être décrite par la transformée de Fourier de l'onde $U(\xi, \eta)$ que multiplie un facteur quadratique de phase $e^{\frac{jk}{2d}(\xi^2 + \eta^2)}$. Cette équation est à la base du développement numérique réalisé pour la reconstruction de l'onde complexe $U(\xi, \eta)$ décrivant l'objet diffracté. Dans ce cas, $U(\xi, \eta)$ est associée à l'hologramme démodulé: $h(\xi, \eta) = \left| \sqrt{I_H} \right| = \left| \sqrt{(I_O - I_\pi) + i(I_{3\pi/2} - I_{\pi/2})} \right|$

Nous avons vu dans l'équation (2) du §2.1 que dans le processus de reconstruction en holographie, il est nécessaire de multiplier l'hologramme par une onde de référence E_R . L'onde de référence dans notre dispositif peut être associée à une onde quasi-plane que l'on pourra décrire par : $E_R = e_R + j0 = e_R$.

L'équation de Fresnel peut alors s'écrire :

$$U(x,y) = \frac{e^{jkd}}{j\lambda d} e^{\frac{jk}{2d}(x^2+y^2)} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \left\{ e_R^* h(\xi,\eta) e^{\frac{jk}{2d}(\xi^2+\eta^2)} \right\} e^{-\frac{j2\pi}{\lambda d}(x\xi+y\eta)} d\xi d\eta \quad (4)$$

En utilisant cette équation il est alors possible de faire numériquement propager le champ complexe décrit par l'hologramme $h(\xi,\eta) = \sqrt{|I_H|}$ dans tous les plans de l'espace. Pour reconstruire l'objet il est alors nécessaire de propager l'onde à la distance $z = \pm d$ selon que l'on reconstruit l'image réelle ou virtuelle.

L'intensité du champ complexe dans le plan (x,y) est donné par $I_H(x,y) = |U(x,y)|^2$ et la

phase du champ par $\varphi(x,y) = \arctan \frac{\text{Im}[U(x,y)]}{\text{Re}[U(x,y)]}$.

Numériquement, on procède à la discrétisation de l'équation en introduisant les relations suivantes :

$$v = x/\lambda d \quad ; \quad \mu = y/\lambda d$$

L'équation (4) prend alors la forme suivante :

$$U(x,y) = \frac{e^{jkd}}{j\lambda d} e^{\frac{jk}{2d}(v^2+\mu^2)} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \left\{ e_R^* h(\xi,\eta) e^{\frac{jk}{2d}(\xi^2+\eta^2)} \right\} e^{-j2\pi(v\xi+\mu\eta)} d\xi d\eta$$

$$U(x,y) = \frac{e^{jkd}}{j\lambda d} e^{\frac{jk}{2d}(v^2+\mu^2)} \times \mathfrak{F} \left\{ e_R^* h(\xi,\eta) e^{\frac{jk}{2d}(\xi^2+\eta^2)} \right\}$$

La fonction $U(\xi,\eta)$ est enregistrée sur un support numérique contenant $N_x \times N_y = 1392 \times 1024$ pixels à des intervalles $\Delta x = \Delta y = 6,45 \cdot 10^{-6} \mu m$ correspondant à la taille des pixels.

La discrétisation de la transformée de Fresnel est alors exprimée de la façon suivante :

$$U(m,n) = \frac{e^{-jkd}}{j\lambda d} e^{i\pi\lambda d(m^2\Delta v^2 + y^2\Delta\mu^2)} \times \sum_{k=0}^{N-1} \sum_{l=0}^{N-1} e_R^*(k,l) h(k,l) e^{-i\frac{\pi}{\lambda d}(k^2\Delta x^2 + l^2\Delta y^2)} e^{i2\pi(k\Delta x m\Delta v + l\Delta y n\Delta\mu)} \quad (5)$$

avec $m = 0,1,\dots,N_x - 1$ et $n = 0,1,\dots,N_y - 1$.

Selon les règles de transformée de Fourier [45], on déduit les relations suivantes permettant de retrouver le pas de l'échantillonnage:

$$\Delta_{v,\mu} = \frac{1}{N_{x,y}\Delta x,y} \quad ; \quad \Delta x,y = \frac{\lambda d}{N_{x,y}\Delta x,y}$$

En substituant on obtient :

$$U(m,n) = \frac{e^{-jkd}}{j\lambda d} e^{i\pi\lambda d(\frac{m^2}{N^2\Delta x^2} + \frac{n^2}{N^2\Delta y^2})} \times \sum_{k=0}^{N-1} \sum_{l=0}^{N-1} e_R^*(k,l) h(k,l) e^{-i\frac{\pi}{\lambda d}(k^2\Delta x^2 + l^2\Delta y^2)} e^{i2\pi(\frac{km}{N} + \frac{ln}{N})} \quad (6)$$

L'équation (6) est l'expression discrétisée de la transformée de Fresnel. Numériquement elle a été calculée en multipliant $h(k,l)$ par $e_R^*(k,l)$ et en appliquant la transformée de Fourier inverse. Le facteur de phase apparaissant avant la sommation peut être négligé dans les calculs. Une mire USAF (figure 11) a été placée à une distance de 22.72cm devant la caméra CCD sur la trajectoire du bras objet.

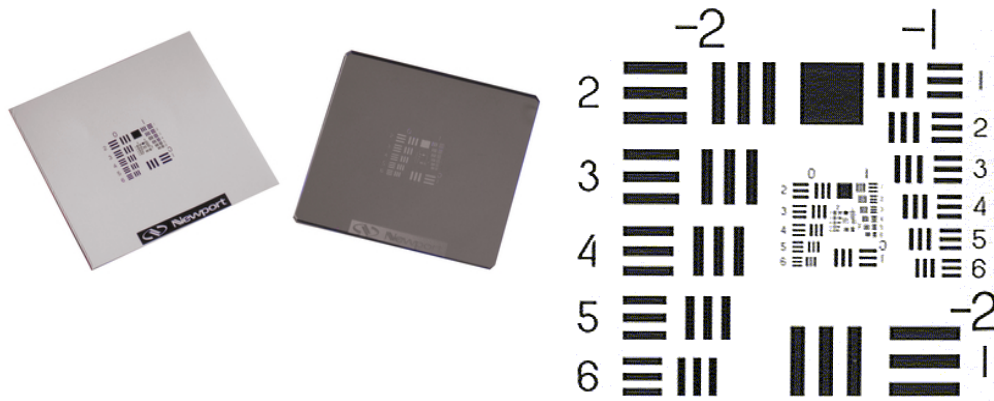


Figure 11. Mire de résolution USAF utilisée comme objet transparent

L'amplitude de $h(k,l)$ a été reconstruite numériquement à différentes distances de la caméra dans différents plans. Le résultat est présenté à la figure 12. En utilisant la transformée de Fresnel, on peut propager l'hologramme à la distance $\pm d$ afin de reconstruire la mire. Dans les autres plans de l'espace, la mire paraîtra floutée.

$h(k,l)$ contenant l'ensemble de l'information du champ complexe, il est également possible de reconstruire la phase du champ dans tous les plans de l'espace (figure 13). Tout l'intérêt de l'holographie numérique réside dans la possibilité d'enregistrer la phase et d'en tirer une information quantitative.

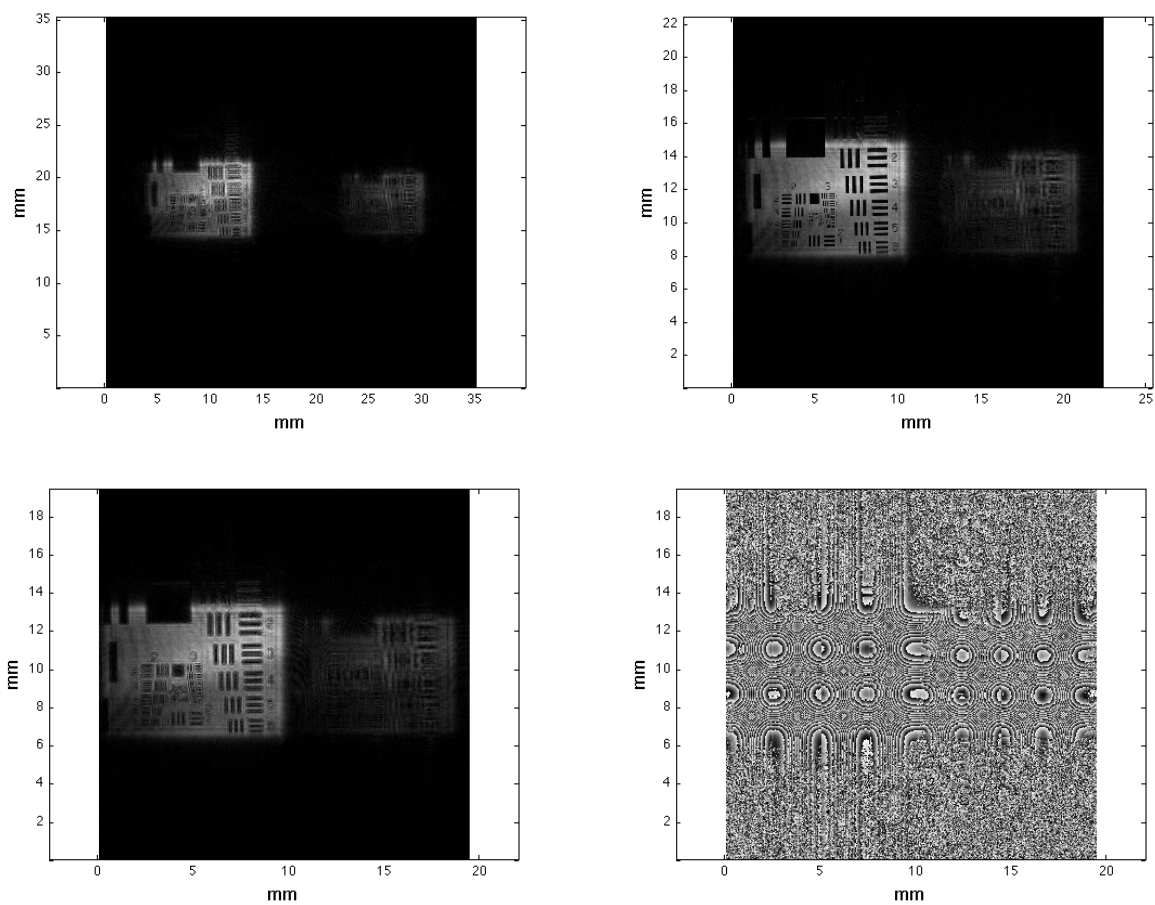


Figure 12. Reconstruction numérique de la mire dans différent plans, à une distances z du CDD : à 35 cm (a), 22,72 cm(b), et 19 cm(c). On peut distinguer l'image virtuelle derrière l'image réelle reconstruite. On observe la phase en (d).

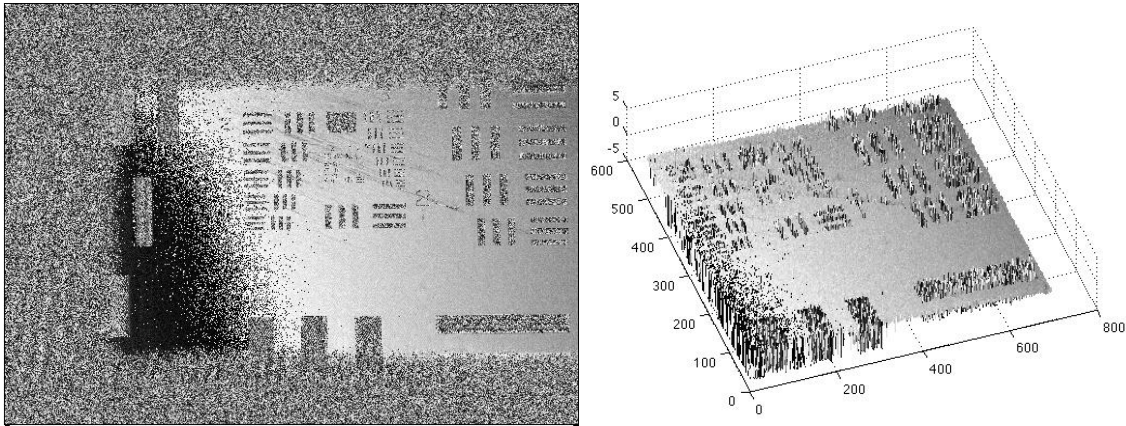


Figure 13. Reconstruction de la phase de la mire USAF à la distance $d=22,72$. Aux endroits où la mire est peinte, la phase non indéfinie, ce qui se traduit par un bruit.

La phase est une quantité définie entre $-\pi$ et π . Elle apparaît donc sous forme de « sauts » de phase sur la figure 12. Afin de la dérouler, il est possible d’appliquer un programme de déroulement de phase. Il est également possible d’enregistrer un hologramme de référence que l’on utilise pour normaliser la phase. C’est cette dernière possibilité qui a été utilisée ici.

Cela permet une multitude d’applications comme vu au §1, et a également été à l’origine, dans le cadre de mes travaux de thèse, du développement d’un nouvel outil de mesure holographique de l’intensité mutuelle d’une onde se propageant à travers un milieu diffusant.

3.6. Zéro padding

Lors de la reconstruction de l’image par propagation de Fresnel, on voit que l’image a été reconstruite sur un nombre de points inférieurs au nombre de pixels contenant la caméra CCD. Dans ce cas, la résolution est diminuée. On peut alors effectuer un « zéro padding », c’est à dire compléter la matrice contenant l’image reconstruite par des zéros de façon à obtenir une matrice correspondant au nombre de pixels de la caméra. L’échantillonnage de l’image correspond alors à la résolution intrinsèque donnée par la matrice de pixels. L’échantillonnage devient inférieur à la résolution, on augmente la définition de l’image sans pour autant augmenter sa résolution. Le dispositif construit permet d’atteindre une résolution de 80 lignes/mm.

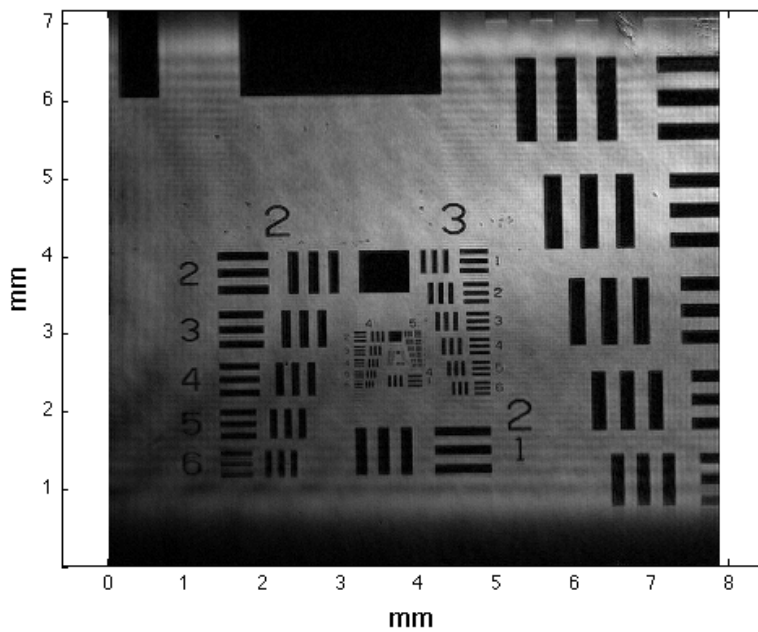
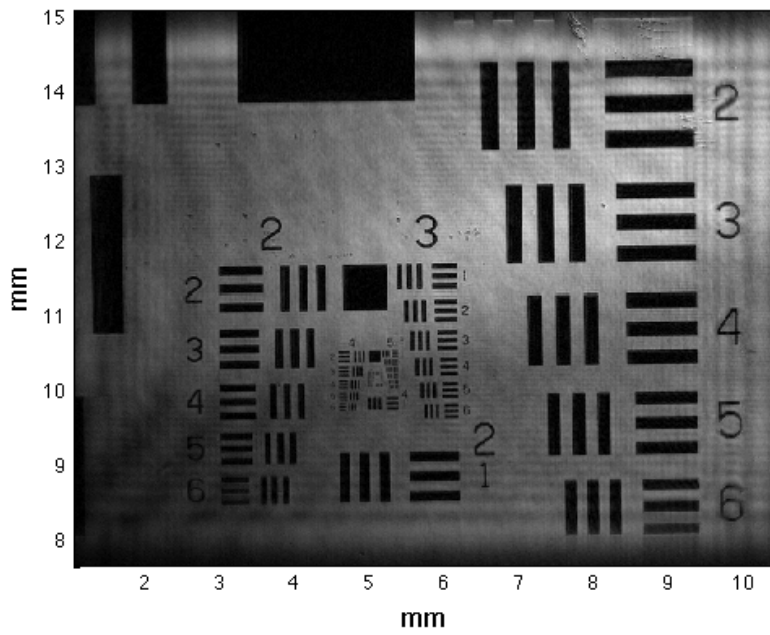


Figure 13b. Si la résolution de l'image reste inchangée, on voit un effet de lissage de l'image sur laquelle un zéro padding a été effectué (bas) par rapport à celle avant le zéro padding (haut).

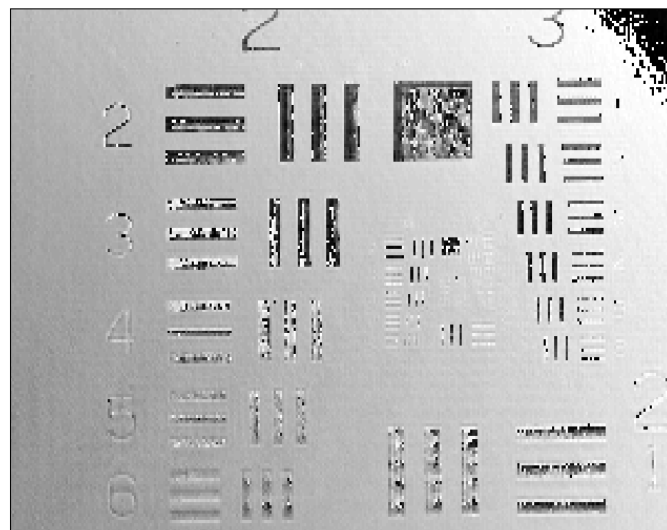
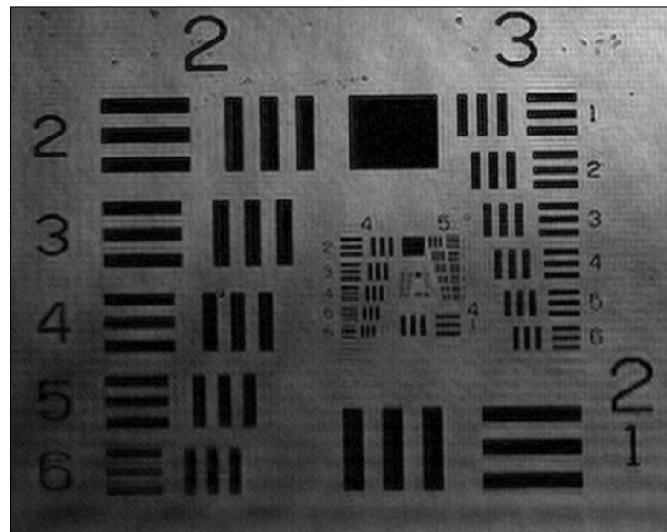


Figure 13c. Amplitude (haut) et phase (bas) de la mire après reconstruction numérique.

3. Mesure de la perte de cohérence à travers un milieu faiblement diffusant

3.1. Etat de l'art

Il existe de nombreuses méthodes interférométriques ou non interférométriques permettant de mesurer la cohérence spatiale d'une onde. La plus connue d'entre elle est celle des fentes d' Young [1]. En mesurant la visibilité des franges projetées par la double fente, on peut mesurer la cohérence spatiale d'une onde en fonction de la distance séparant les deux fentes. D'autres méthodes consistent à utiliser un masque contenant un certain nombre des trous périodiques [2,3]. Il existe également diverses méthodes interférométriques permettant de mesurer directement la cohérence spatiale du champ [41-44]. Nugent [7] a imaginé une méthode non interférométrique permettant de mesurer la cohérence spatiale, et dont la réalisation a été faite plus récemment [14,15]. Nous proposons ici une nouvelle méthode (à notre connaissance) permettant de mesurer la perte de cohérence spatiale d'une onde après traversée d'un milieu faiblement diffusant.

3.2. Considérations théoriques

L'intensité mutuelle $J(\vec{r}_1, \vec{r}_2; z)$ d'un champ scalaire monochromatique et partiellement cohérent est définie par [4]:

$$J(\vec{r}_1, \vec{r}_2; z) = \langle E(\vec{r}_1; z) E^*(\vec{r}_2; z) \rangle$$

où $E(\vec{r}; z)$ est le champ complexe scalaire décrit à la position \vec{r} dans le plan z , $E^*(\vec{r}; z)$ son complexe conjugué, et $\langle \dots \rangle$ la moyenne sur un ensemble de réalisations du champ.

L'intensité mutuelle permet de calculer la cohérence spatiale d'une onde, c'est-à-dire l'uniformité de son front d'onde, et sa capacité à interférer. Le facteur de cohérence complexe est donné par :

$$\mu = \frac{J(\vec{r}_1, \vec{r}_2)}{\sqrt{J(\vec{r}_1, \vec{r}_1)J(\vec{r}_2, \vec{r}_2)}}$$

Le facteur de cohérence complexe permet de déterminer le degré de cohérence spatiale d'onde. Il est défini entre 0 et 1.

La densité spectrale de puissance, selon le théorème de Wiener Khinchine est définie comme la transformée de Fourier de l'autocorrélation du signal :

$$W(\vec{r}, \vec{u}) = \frac{1}{2\pi} \int J(\vec{r}, \Delta\vec{r}) e^{-i\Delta\vec{r} \cdot \vec{u}} d\Delta\vec{r}$$

où $\vec{r} = \frac{\vec{r}_1 + \vec{r}_2}{2}$, et $\Delta\vec{r} = \vec{r}_1 - \vec{r}_2$. La transformée de Fourier de la fonction de corrélation spatiale est en fait appelée transformée de Wigner [5]. $W(\vec{r}, \vec{u})$ représente simultanément le signal en terme de position et de direction. On peut montrer qu'elle correspond à la radiance [5-7]. On rappelle que la radiance est définie en radiométrie comme une mesure de la quantité de lumière qui passe ou qui est émise par une surface autour d'un angle solide défini et dans une direction donnée. On voit donc qu'il existe une relation de transformée de Fourier directe entre la radiance et l'intensité mutuelle d'un champ scalaire complexe. La connaissance de l'intensité mutuelle d'un champ complexe permet d'accéder à toute l'information concernant une onde scalaire monochromatique partiellement cohérente. L'intensité du champ à un point \vec{r} est donnée par la projection de la radiance :

$$I(\vec{r}, z) = \int W(\vec{r}, \vec{u}; z) d\vec{u}$$

Bastiaans montre [5] que dans le cadre de l'approximation paraxiale, la propagation de la radiance d'une distance z peut être décrite par :

$$W(\vec{r}, \vec{u}; z) = W\left(\vec{r} - \frac{z\vec{u}}{k}, \vec{u}; 0\right)$$

De même que l'intensité mutuelle [4], la connaissance de la radiance dans un plan donné permet le calcul de celle-ci dans tous les plans de l'espace. Lorsqu'une onde traverse

un milieu optiquement diffusant, les relations de phases des ondelettes issues des différents diffuseurs du milieu seront modifiées. L'intensité mutuelle de l'onde sera modifiée en conséquence et la mesure de celle-ci permettra d'extraire un certain nombre d'informations sur le milieu diffusant. Nous proposons ici une méthode holographique de mesure de l'intensité mutuelle d'une onde transmise à travers un milieu faiblement diffusant. Nous avons vu que dans le cas d'un milieu faiblement diffusant, la quantité de lumière transmise vers l'avant est de plusieurs décades supérieure à celle transmise dans les autres directions de l'espace. Le dispositif d'holographie numérique hétérodyne hors-axe présenté dans ce chapitre est utilisé afin de reconstruire le front d'onde complexe perturbé et transmis à travers un échantillon faiblement diffusant. L'intensité mutuelle est alors reconstruite numériquement. Cheng et Raymer ont modélisé la propagation de l'intensité mutuelle d'un faisceau gaussien à travers un milieu diffusant [8].

3.3. Résultats expérimentaux sur échantillons diffusants

Un faisceau gaussien collimaté est transmis à travers un échantillon diffusant selon le schéma de la figure 14.

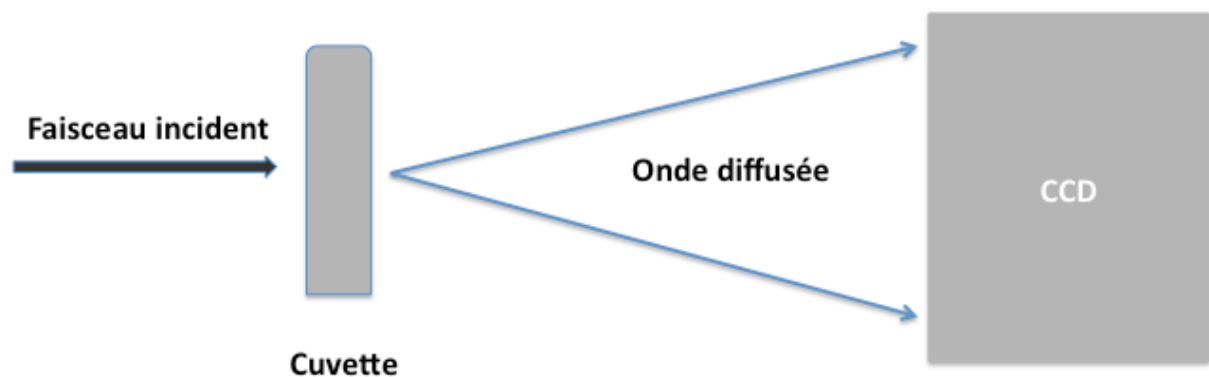


Figure 14. Schéma du bras objet. Un faisceau gaussien collimaté est transmis à travers une cuvette contenant l'échantillon diffusant. L'onde diffusée autour de l'axe optique est collectée par la caméra CCD.

3.3.1 Résultats sur Pastis

Afin de mesurer l'intensité mutuelle d'un faisceau gaussien après la traversée d'un milieu diffusant, nous avons placé dans une cuvette en quartz (1cm d'épaisseur) du pastis²⁶ dilué à différentes concentrations dans de l'eau. Le pastis, qui est un alcool préparé à partir de l'huile d'anéthol, extraite de l'anis est un liquide transparent, légèrement jaune. L'anéthol, lorsqu'il est mélangé avec l'eau, produit l'effet chimique de microémulsion. La microémulsion est une dispersion thermodynamique stable de deux liquides immiscibles. Les molécules d'anéthol se rassemblent et forment des petites gouttelettes de plusieurs micromètres de diamètre en suspension dans le mélange eau - alcool. Cela donne au breuvage un aspect brumeux (figure 15) et lui confère des propriétés diffusantes [9]. L'intensité mutuelle du champ transmis a été calculée par la méthode d'holographie numérique présentée ici. Les mesures ont été réalisées pour différentes proportions du mélange eau-pastis.

Dans le cas où un faisceau gaussien collimaté de 5 mm de diamètre traverse un milieu diffusant, sa radiance peut être analysée comme la somme de trois termes [13,14] :

$$W_{TOTAL} = W_{Ballistic} + W_{transmis} + W_{diffus}$$

Le premier terme de l'équation précédente décrit la composante balistique non diffusée de l'onde, le second terme décrit la contribution de la lumière transmise vers l'avant et le dernier terme, la diffusion aux angles importants. Dans la configuration utilisée, il est possible uniquement de mesurer les deux premiers termes. La figure 16 présente le profil du faisceau gaussien après la traversée d'un chemin optique de 1 cm d'épaisseur pour différentes concentrations de pastis dilué dans de l'eau. On observe pour l'amplitude une apparition progressive d'une figure de speckle lorsque la proportion pastis - eau augmente. La concentration de bulles micrométriques agissant comme des diffuseurs de Mie augmente effectivement avec celle de l'anéthol. Lorsque seul le Pastis n'est pas mélangé avec l'eau, le faisceau n'est pas diffusé. Sur la même figure, on peut constater une perturbation de la phase du faisceau après la traversé du milieu diffusant. La connaissance de cette phase pourrait permettre de calculer les aberrations introduites par les diffuseurs

²⁶ Pastis, Pernod Ricard, France

en calculant les polynômes de Zernike. Cela nécessite l'élaboration d'un programme permettant de calculer les polynômes sur une phase perturbée et présentant une figure de speckle. On voit la puissance de l'outil holographique par rapport aux autres méthodes de mesure de l'intensité mutuelle par des méthodes non interférométriques. L'accès à l'ensemble de l'information quantitative associée à une résolution importante permet de réaliser un ensemble de mesures métrologiques ouvrant l'accès à de nouvelles techniques d'imagerie.



Figure 15. Pastis dilué à différentes concentrations. A gauche, du pastis pur, au milieu la dilution dans l'eau provoque l'aspect « trouble » du mélange.

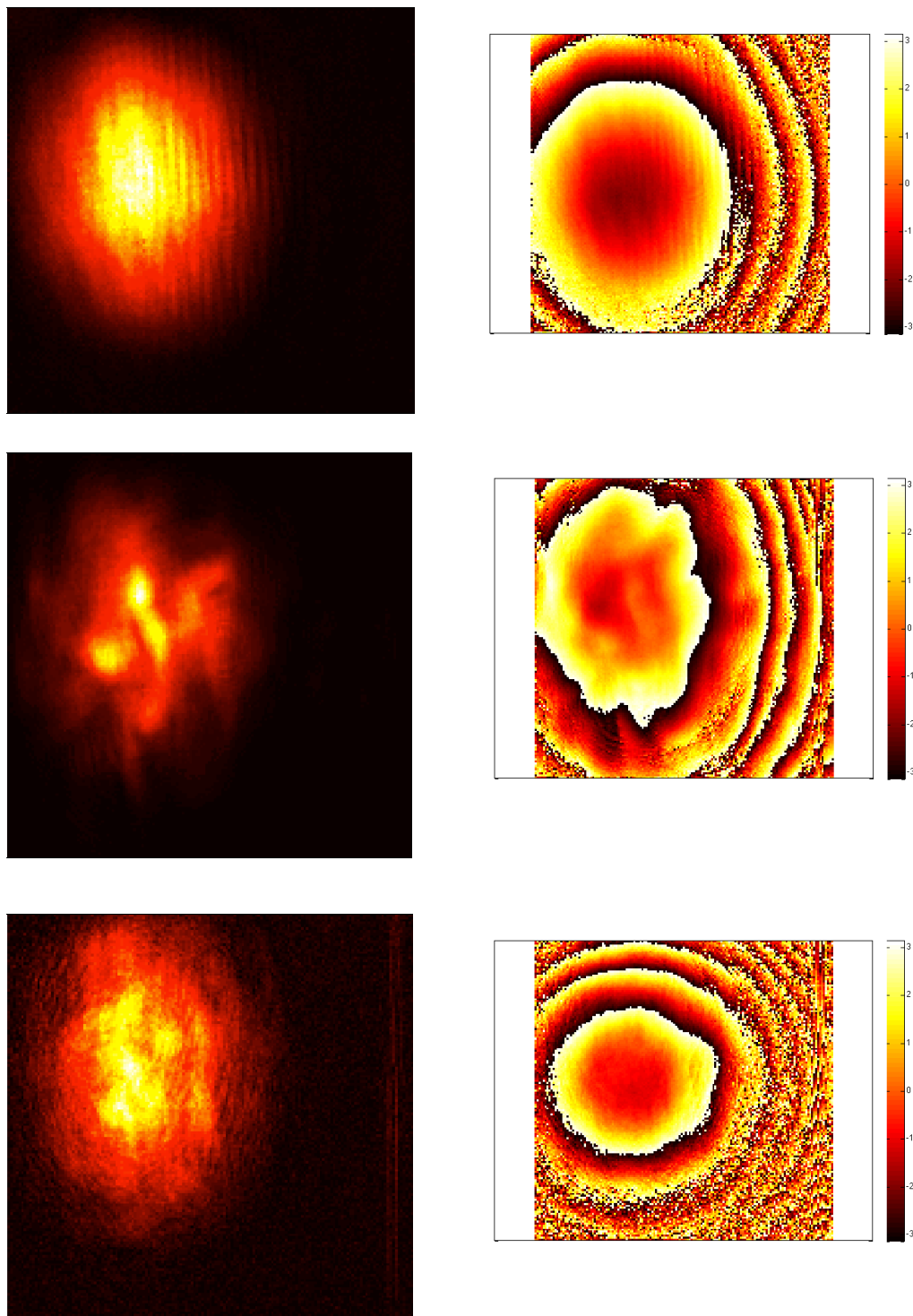


Figure 16. Amplitude (gauche) et phase (droite) d'un faisceau gaussien collimaté après traversé d'une microémulsion Pastis-eau. En haut, faisceau gaussien non perturbé, au milieu pour une proportion de Pastis - eau de 1:5 (0,5 ml Pastis, 2,5 ml eau), et en bas de 1:2 (1 ml Pastis, 2 ml eau).

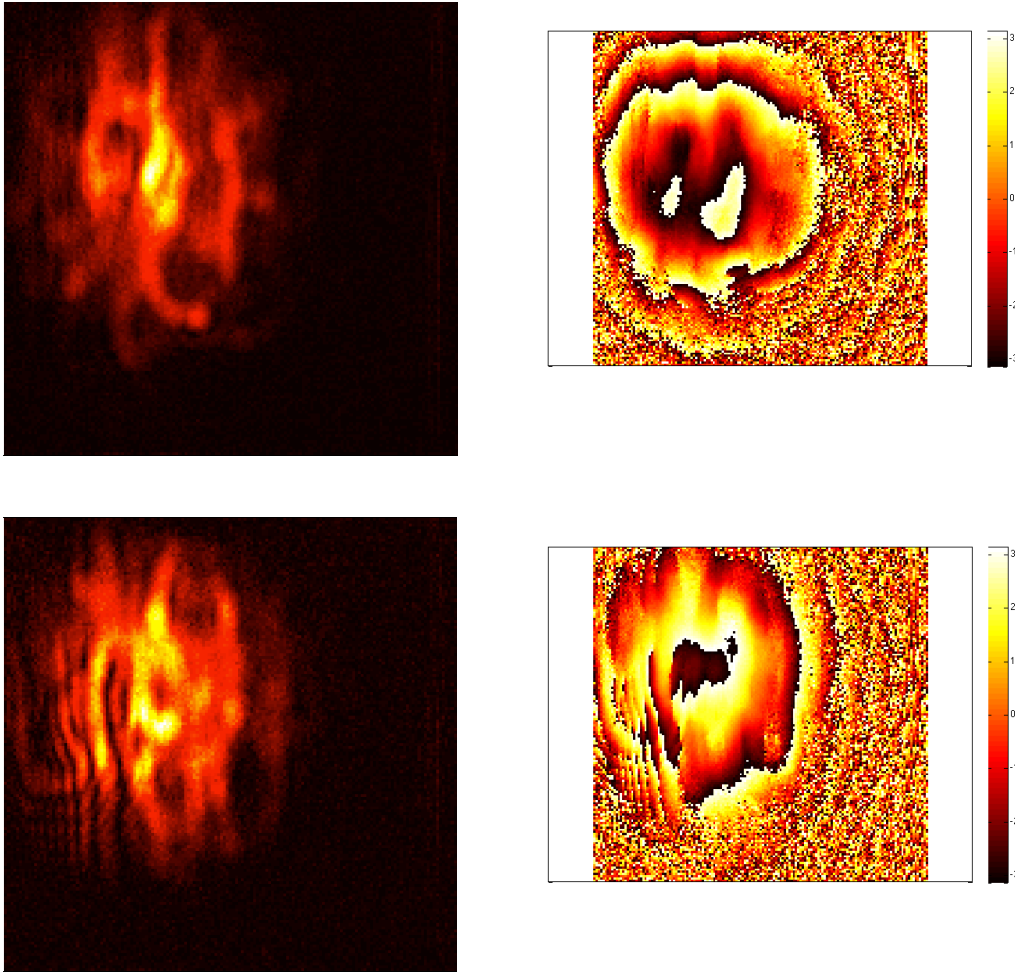


Figure 16 (suite). Amplitude (gauche) et phase (droite) d'un faisceau gaussien collimaté après traversée d'une microémulsion Pastis-eau. En haut, pour une proportion de Pastis-eau de 1:1 (1,5 ml Pastis, 1,5 ml eau), et en bas de 2:1 (2 ml Pastis, 1 ml eau).

À partir de ces résultats, l'intensité mutuelle du champ diffusé peut être calculée numériquement. Les résultats sont présentés à la figure 17. L'intensité mutuelle d'un faisceau gaussien collimaté non diffusé prend la forme [7,15]:

$$J(\vec{r}, \Delta\vec{r}; z) = \frac{1}{\pi a^2} \exp \left[\frac{|\vec{r}|^2 + \frac{|\Delta\vec{r}|^2}{4}}{a^2} \right]$$

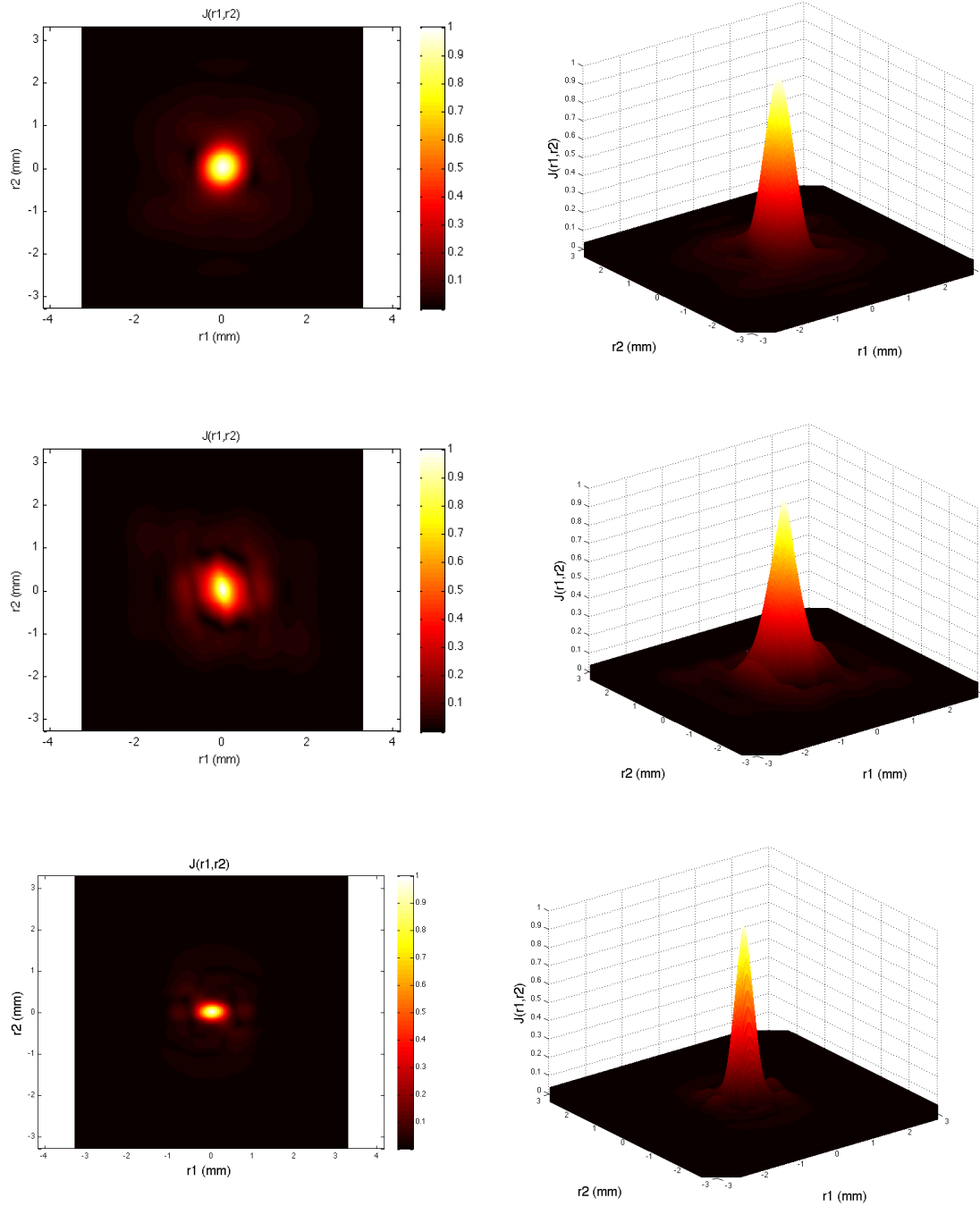


Figure 17. Intensités mutuelles normalisées du champ diffusé représentées pour différentes concentrations du mélange pastis-eau. En haut, pour un faisceau gaussien non-diffusé, au milieu pour une proportion de Pastis-eau de 1:5 (0,5 ml Pastis, 2,5 ml eau), et en bas de 1:2 (1 ml Pastis, 2 ml eau).

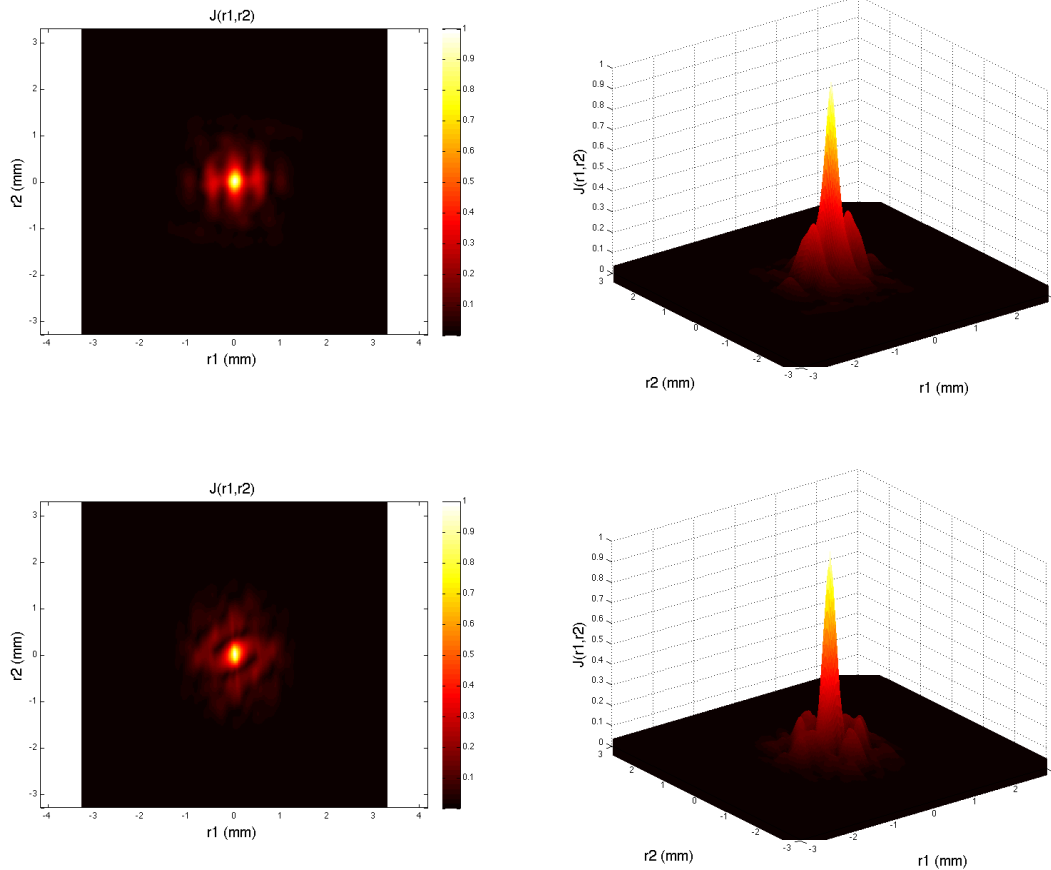


Figure 17 (suite). Intensités mutuelles normalisées du champ diffusé représentées pour différentes concentrations du mélange pastis-eau. En haut, pour une proportion de Pastis-eau de 1:1 (1,5 ml Pastis, 1,5 ml eau), et en bas de 2:1 (2 ml Pastis, 1 ml eau).

On retrouve donc l'aspect gaussien de l'intensité mutuelle (figure 17, haut) d'un tel faisceau. On peut comparer l'intensité mutuelle du champ lorsqu'il traverse un milieu diffusant. On constate que celle-ci, et donc la cohérence spatiale du faisceau, diminue avec une plus forte concentration de pastis, et donc de diffuseurs.

Cheng et Raymer ont mis en relation l'intensité mutuelle d'un champ diffusé par des diffuseurs de Mie possédant une certaine section efficace [8].

L'intensité mutuelle projetée sur un axe pour les différentes concentrations de pastis est représentée à la figure 18.

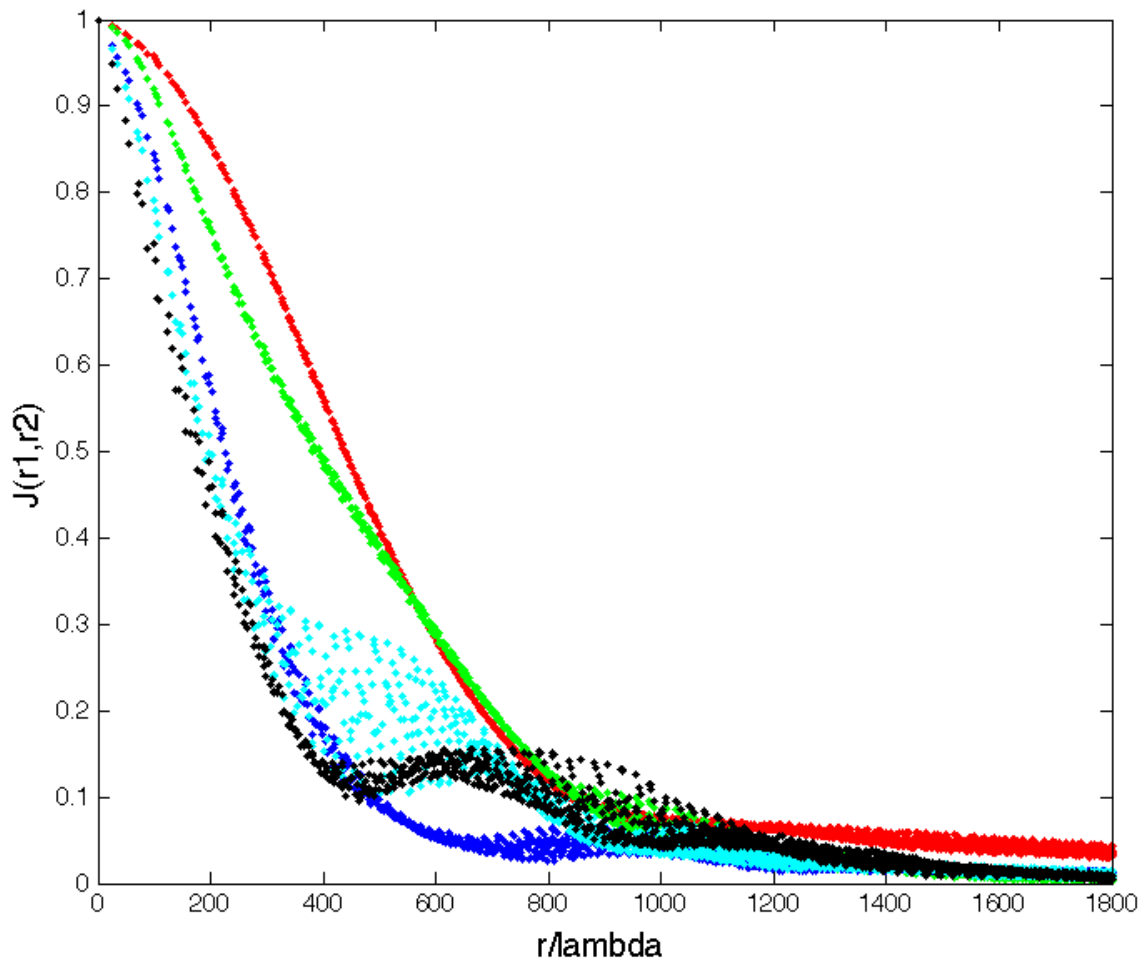
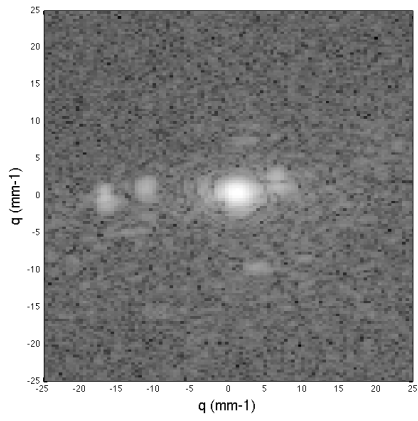
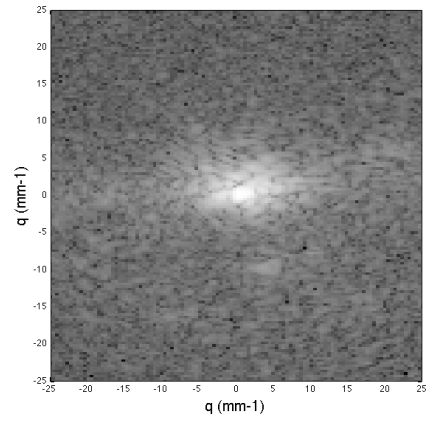


Figure 18. Intensité mutuelle normalisée d'un faisceau gaussien non perturbé (rouge), ayant traversé un mélange pastis-eau de proportion 1:5 (vert), 1:2 (bleu), 1:1 (cyan), et 2:1 (noir).

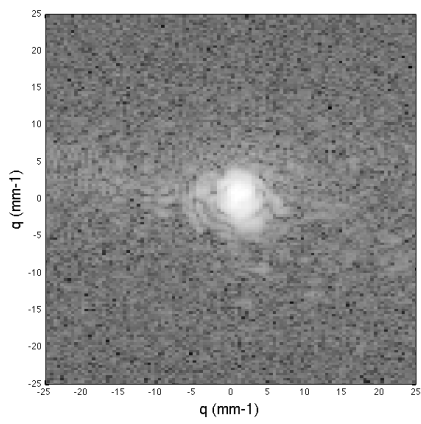
On voit clairement diminuer la cohérence spatiale de l'onde avec le niveau de diffusion du milieu. À partir de la relation de transformée de Fourier entre cohérence spatiale et radiance, on peut calculer cette dernière. La figure 19 représente les différentes radiances calculées pour les différentes concentrations de pastis dans l'eau. Elle montre la quantité de lumière orientée selon les différentes directions de l'espace et passant par le plan de la caméra. Il est possible de numériquement propager ces quantités et de les mesurer dans tous les plans de l'espace traversant l'axe optique. Cette représentation permet de visualiser l'augmentation de la diffusion et son élargissement angulaire. Lorsque la concentration de billes devient plus importante, l'intensité mutuelle fait apparaître les lobes correspondant aux polynômes de Bessel décrivant une diffusion de type Mie.



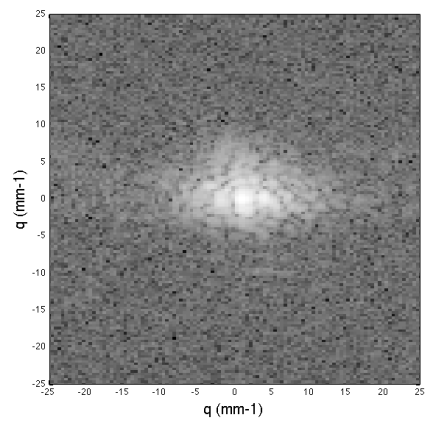
a)



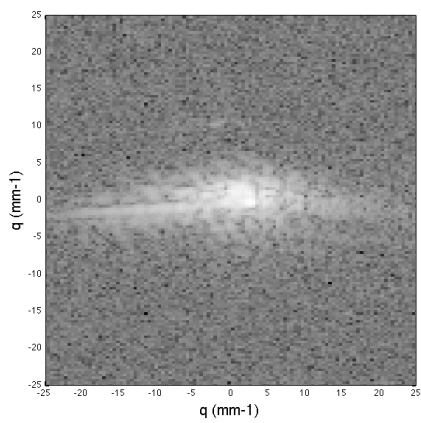
b)



c)



d)



e)

Figure 19. Radiances calculées pour, le faisceau non diffusé (a), et pour une proportion pastis-eau de 1:5 (b) , 1:2 (c), 1:1 (d), et 2:1 (e).

Des résultats similaires ont été obtenus sur des échantillons de billes micrométriques.

4. Résultats sur des cornées présentant différents degrés d'œdème

Dans le paragraphe précédent, nous avons montré comment un dispositif d'holographie numérique hétérodyne hors-axe pouvait permettre de mesurer la cohérence spatiale de faisceaux traversant un milieu diffusant. Cette méthode est appliquée pour mesurer l'intensité mutuelle de faisceaux traversant des cornées humaines provenant de banques des yeux. Nous avons vu effectivement au chapitre II que la corrélation spatiale des fibrilles de collagène dans le stroma cornéen influait sur le champ diffusé par le tissu, et donc sur l'intensité mutuelle et la cohérence spatiale du champ. Celle-ci n'a pas été prise en compte jusque-là dans les différents modèles proposés pour expliquer la transparence du tissu cornéen.

4.2. Cohérence spatiale du champ diffusé et autocorrélation des fibrilles

Au chapitre II, nous avons calculé la puissance diffusée par la cornée, montrant que celle-ci dépendait de l'autocorrélation des fibrilles. Un résultat similaire peut être obtenu en calculant la cohérence mutuelle du champ diffusé. On rappelle que l'onde incidente est décrite par : $\vec{E}_i = \vec{E}_0 e^{i(\vec{k}_0 \vec{r} - \omega_0 t)}$.

Le champ diffusé au point \vec{R}_1 correspondant pour le régime de Rayleigh à l'approximation dipolaire en champ lointain est :

$$\vec{E}_{diffusé} = \frac{E_0 \omega^2 \sin \theta}{4\pi c^2 R_1} e^{i(k_0 R_1 - \omega_0 t)} \int_V \chi(\vec{x}_1) e^{i(\vec{k}_0 - \vec{k}_1) \cdot \vec{x}_1} dx_1$$

où \vec{k}_1 est le vecteur d'onde du champ diffusé, θ l'angle séparant \vec{k}_0 et \vec{k}_1 , et $\chi(\vec{x}_1)$ la susceptibilité diélectrique de la cornée au point \vec{x}_1 . L'intégrale se fait sur l'ensemble du volume de la cornée.

On obtient immédiatement l'intensité mutuelle du champ diffusé [40] :

$$J(\vec{r}_1, \vec{r}_2) = \left(\frac{E_0 \omega^2}{4\pi c^2}\right)^2 \frac{\sin\theta_1 \sin\theta_2}{R_1 R_2} e^{ik(R_1 - R_2)} \int_V dx_2 \int_V dx_1 \langle \chi(\vec{x}_1) \chi^*(\vec{x}_2) \rangle e^{i(\vec{k}_0 - \vec{k}_1) \cdot \vec{x}_1 - i(\vec{k}_0 - \vec{k}_2) \cdot \vec{x}_2}$$

La susceptibilité diélectrique de la cornée peut être décrite par : $\chi(\vec{x}) = \chi_m + \Delta\chi(\vec{x})$ où χ_m est la susceptibilité moyenne de l'ensemble de la cornée et $\Delta\chi(\vec{x})$ la déviation par rapport à χ_m au point \vec{x} . La corrélation spatiale due aux fluctuations de la susceptibilité électrique dans la cornée correspond à la corrélation spatiale des fibrilles de collagène et est donnée par :

$$c(\vec{x}_1, \vec{x}_2) = \frac{\langle \Delta\chi(\vec{x}_1) \Delta\chi^*(\vec{x}_2) \rangle}{|\Delta\chi|^2}.$$

Après quelques simplifications, on peut écrire finalement [40] la cohérence spatiale du champ diffusé en champ lointain par le tissu sain comme :

$$J(\vec{r}_1, \vec{r}_2) = K |\Delta\chi|^2 e^{ik_0(R_1 - R_2)} \int_V dx_2 \int_V dx_1 c(\vec{x}_1, \vec{x}_2) e^{i(\vec{k}_0 - \vec{k}_1) \cdot \vec{x}_1 - i(\vec{k}_0 - \vec{k}_2) \cdot \vec{x}_2}$$

$$\text{avec } K = \left(\frac{E_0 \omega^2}{4\pi c^2}\right) \frac{\sin\theta_1 \sin\theta_2}{R_1 R_2}$$

Finalement on a :

$$J(\vec{r}_1, \vec{r}_2) = K e^{ik(R_1 - R_2)} \mathfrak{S}\{c(\vec{x}_1, \vec{x}_2)\}$$

On peut voir dans ce dernier résultat une similitude avec le théorème de Van-Cittert Zernike qui montre l'existence d'une relation de transformée de Fourier entre la distribution spatiale de l'intensité d'une source incohérente et sa fonction de cohérence mutuelle. Il existe donc une relation directe entre la distribution spatiale des diffuseurs de Rayleigh que sont les fibrilles de collagène de la cornée, et l'intensité mutuelle diffusée en champ lointain. C'est cette dernière que nous mesurons expérimentalement pour différentes cornées humaines.

4.3 Porte échantillon

Afin de respecter la courbure naturelle de la cornée et limiter les effets de surface, un porte-échantillon a été conçu sur modèle similaire de celui présenté au §1.3 du chapitre III. Deux lentilles plan-concave et plan-convexe²⁷ possédant des rayons de courbure similaires à la cornée viennent la recueillir de part et d'autre. Une lentille de collimation a été ajoutée afin de corriger la divergence créée par la succession de lentille

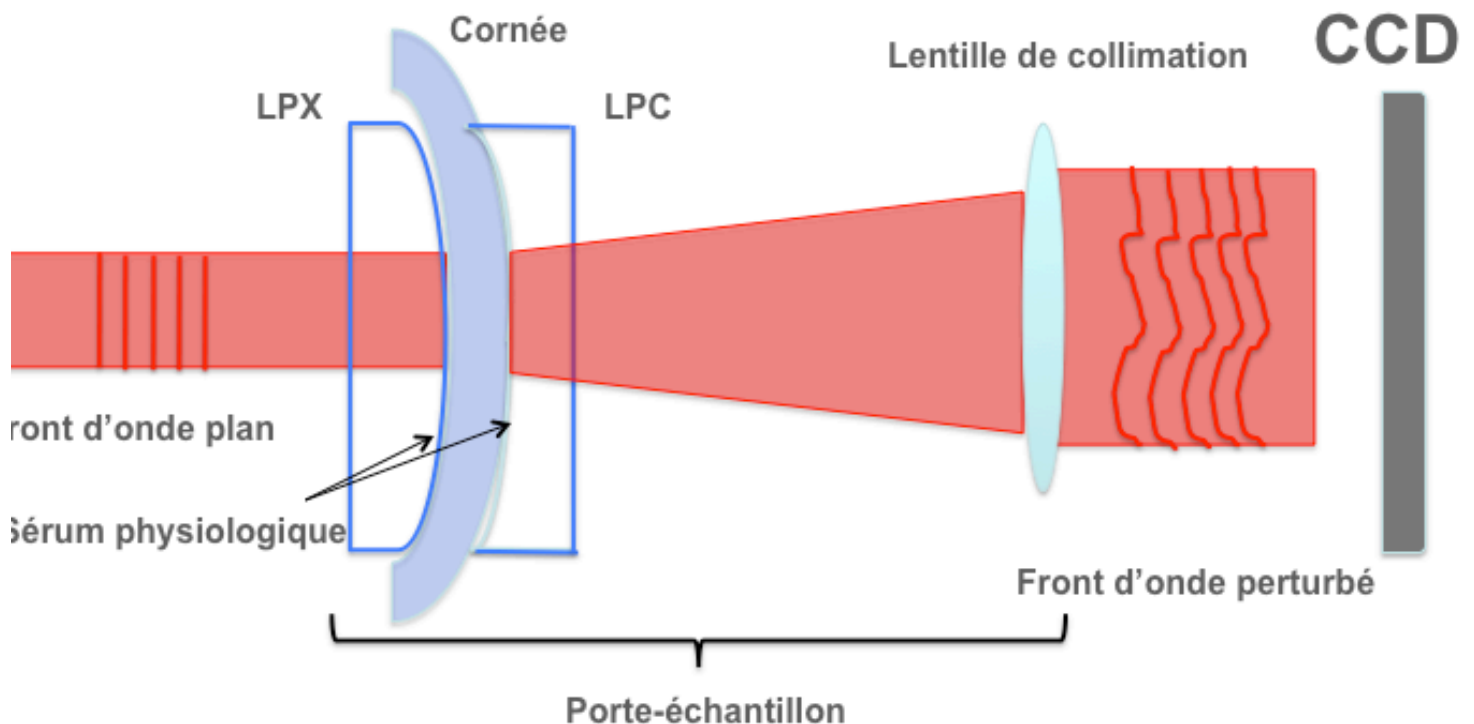


Figure 20a. Disposition du bras objet. Le porte-échantillon est constitué d'une lentille plan-convexe (LPX), d'une lentille plan concave (LPC), ainsi que d'une lentille de collimation corrigeant la divergence de la succession LPX-cornée_LPC.

(figure 20). Cette configuration diffère par conséquent de celle présentée à la figure 14 du §3.3 où aucune lentille n'a été placée sur le trajet du faisceau laser.

²⁷ Thorlabs, France, références LC 1906 pour la plan-concave et LA1576 pour la plan convexe.

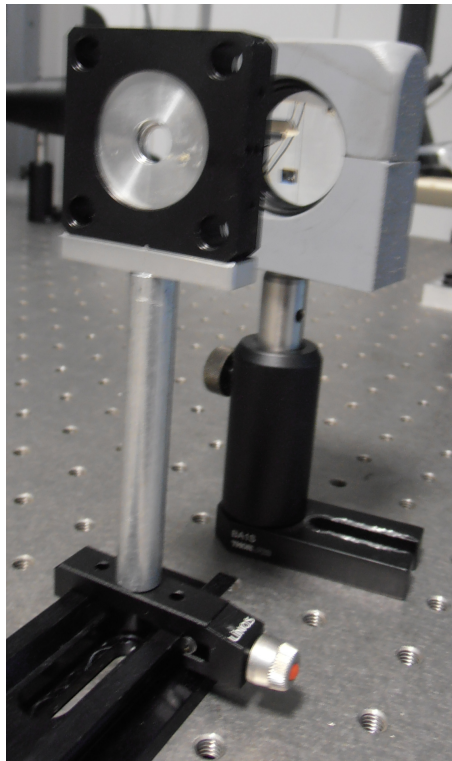


Figure 20b. Photo du porte échantillon adapté à la cornée.

4.4. Résultats

Les calculs présentés au paragraphe précédent ont été réitérés pour les échantillons de cornées humaines. Le protocole de déturgescence appliqué aux cornées est celui déjà présenté aux chapitres II et III. Une série de 20 cornées a été utilisée pour cette étude. Chacune d'entre elles a subi un processus de déturgescence et une mesure de la perturbation du champ a été faite à des temps différents du processus. La figure 21 représente le champ diffusé à une distance de 30 cm d'une cornée présentant une épaisseur physiologique et un aspect transparent.

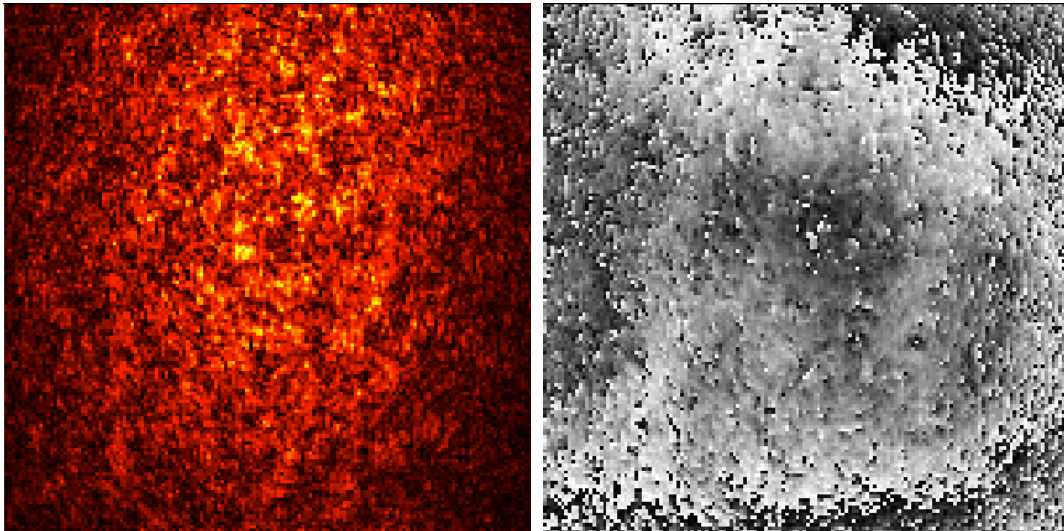
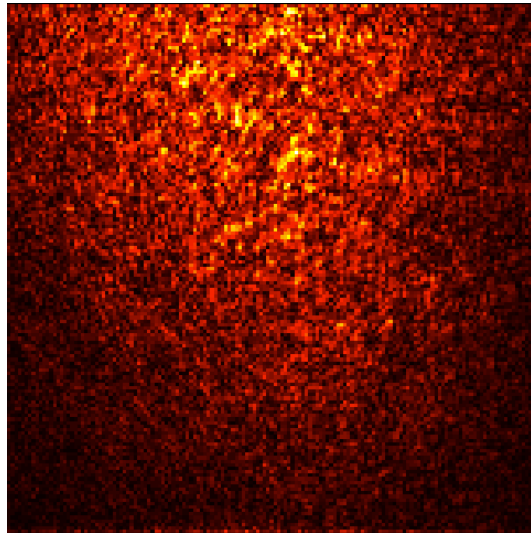


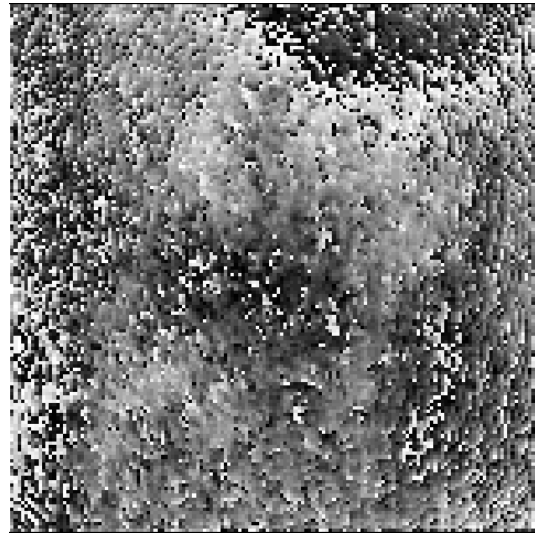
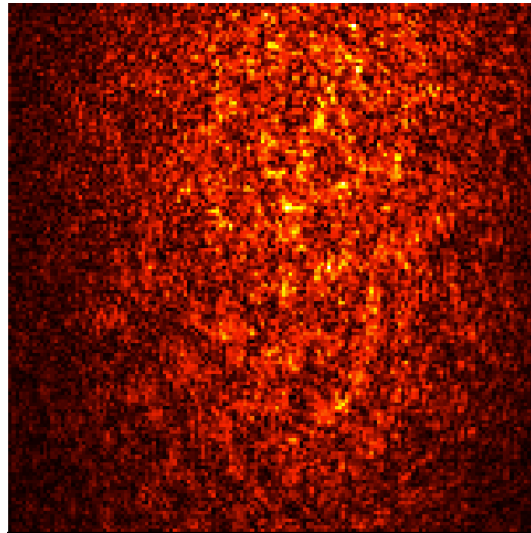
Figure 21. Amplitude (gauche) et phase (droite) d'un champ diffusé par une cornée d'épaisseur physiologique. (longueur d'onde utilisée : 632,8 nm).

On constate l'apparition d'une figure de speckle au niveau de la CCD. La phase paraît également légèrement perturbée. Cet aspect apparaît dans le cas d'une cornée pourtant transparente. En effet, le laser, qui est une onde cohérente, interagit avec la distribution spatiale des fibrilles de collagène dans le plan de Fourier. Celle-ci est statistique, bien que l'espacement interfibrillaire soit relativement constant dans le cas d'une cornée fine. On explique ainsi l'apparition de speckle dans le cas de cornées même transparentes. Si les fibrilles de collagène étaient disposées selon un ordre parfaitement cristallin, le laser aurait gardé sa cohérence après la traversée du tissu. Ce premier constat corrobore la thèse selon laquelle la cornée présente un ordre local des fibrilles de collagènes, ainsi que les observations faites en imagerie.

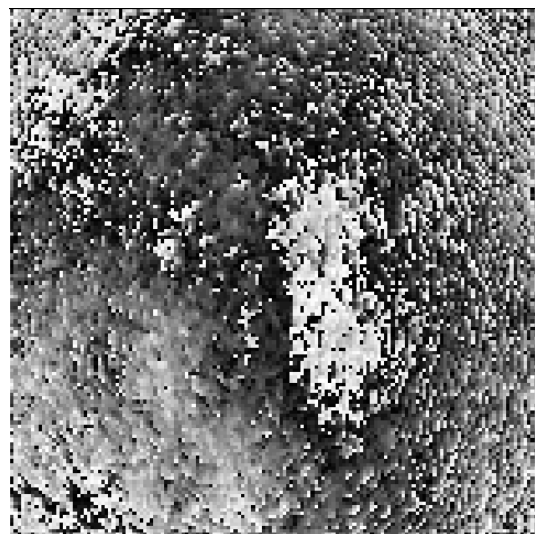
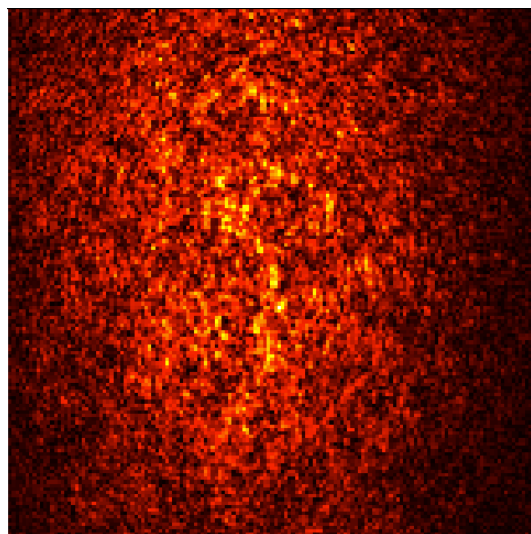
À la figure 22 les phases et amplitudes de cornées de différentes épaisseurs sont représentées.



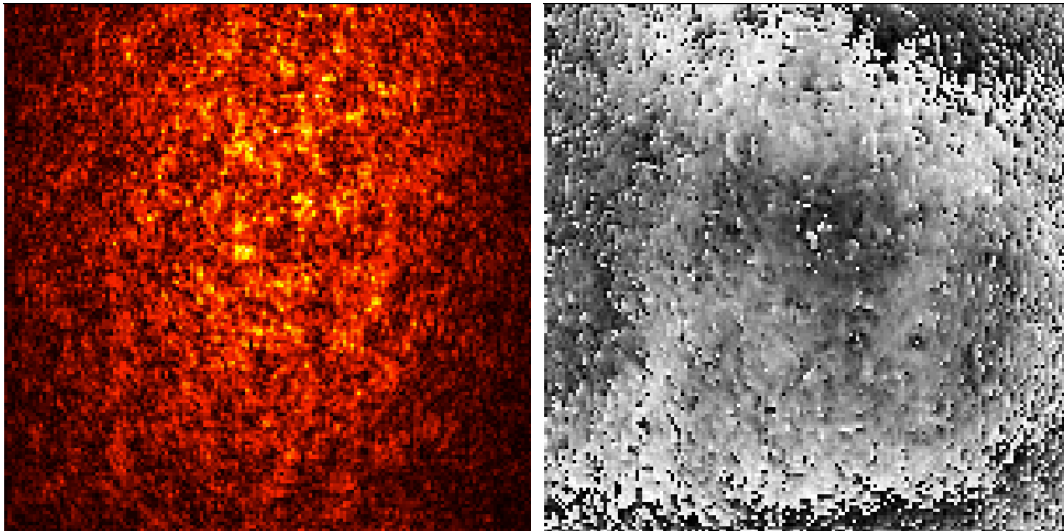
a.



b.



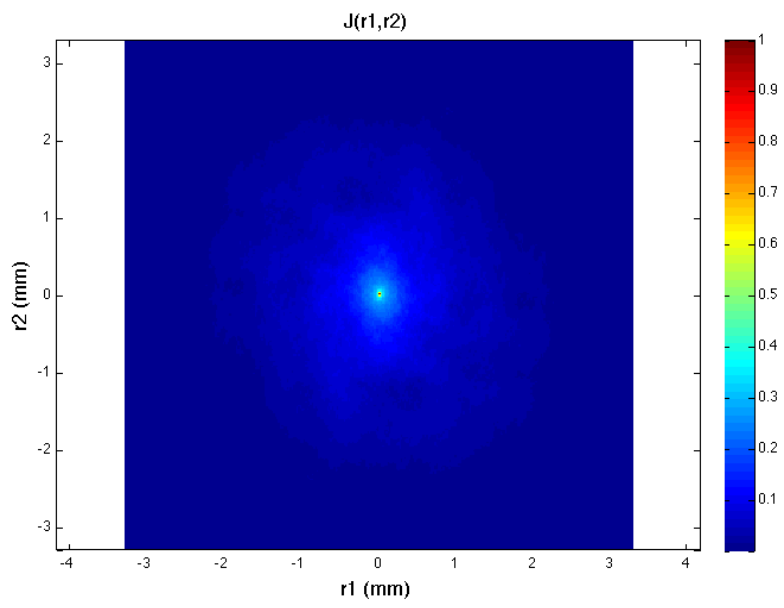
c.



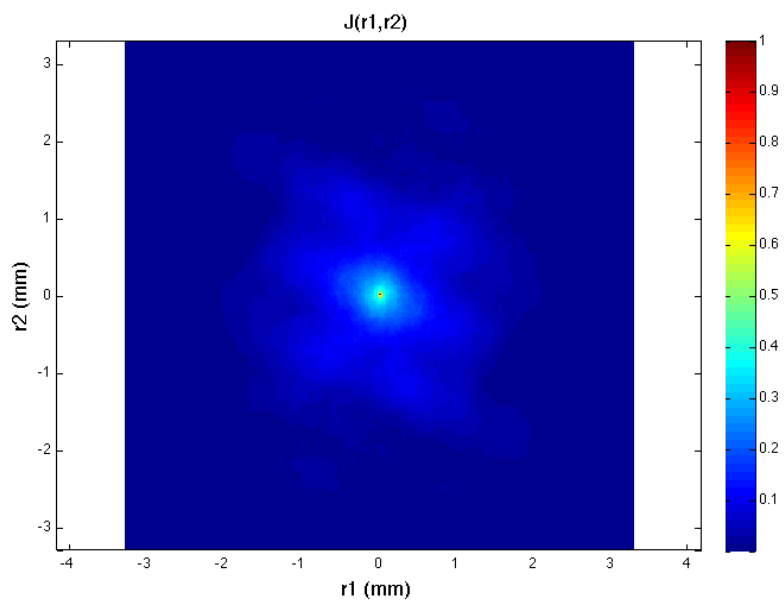
d.

Figure 21. Amplitude (gauche) et phase (droite) d'une cornée à différentes épaisseurs : 1100 μm (a) , 790 μm (b), 640 μm (c), et 580 μm (d).

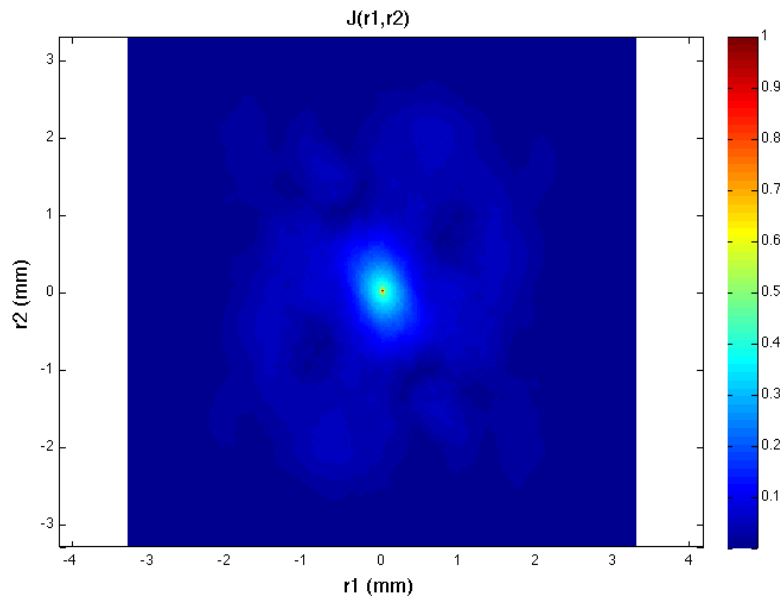
Les intensités mutuelles des champs diffusés par des cornées présentant différents degrés d'œdème sont représentées pour quelques épaisseurs à la figure 22. On constate que la perte de cohérence du faisceau diffusé vers l'avant augmente avec le degré d'œdème du tissu cornéen. Une autre représentation de l'intensité mutuelle est donnée à la figure 23 où les contours de celle-ci ont été dessinés. Ces résultats ont été obtenus sur une même cornée à différents stades du processus de déturgescence. Cette évolution est représentée à la figure 24 où l'intensité mutuelle est représentée en coordonnées polaires. La comparaison est faite avec l'intensité mutuelle d'un faisceau passant à travers le porte-échantillon contenant du sérum physiologique (sans cornée). On remarque une allure de l'intensité mutuelle similaire pour les cornées, quelque soit leur épaisseur. Contrairement au faisceau de référence dont l'intensité mutuelle a une forme gaussienne, les cornées possèdent une intensité mutuelle semblant présenter un double comportement : un pic central plus prononcé au centre qui s'élargit environ à mi-hauteur. L'interprétation de cette allure n'est pas triviale et requiert un travail de simulation numérique. Nos partenaires de l'ESPCI-ParisTech travaillent à ce jour à l'élaboration d'un modèle numérique permettant d'expliquer cette allure particulière observée. On pourrait toutefois supposer que la présence de différents types de diffuseurs pourrait être à l'origine de ce comportement dans la configuration adoptée.



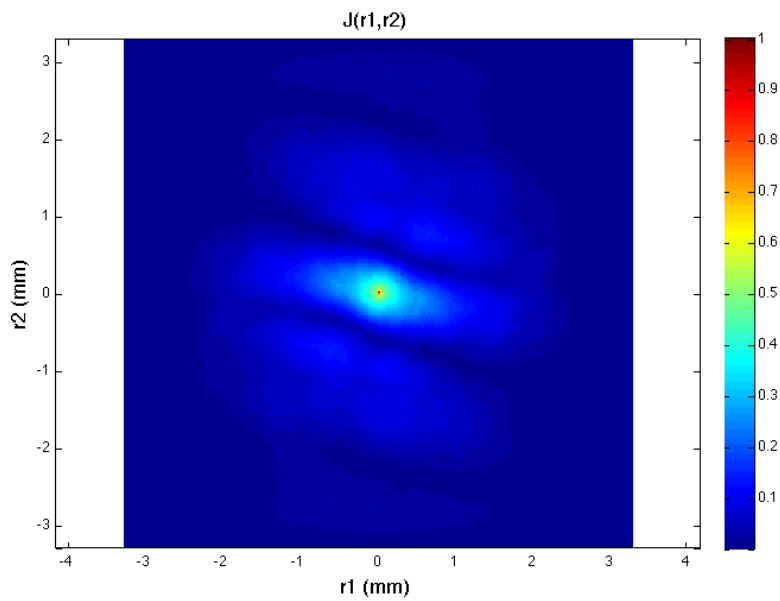
a.



b.

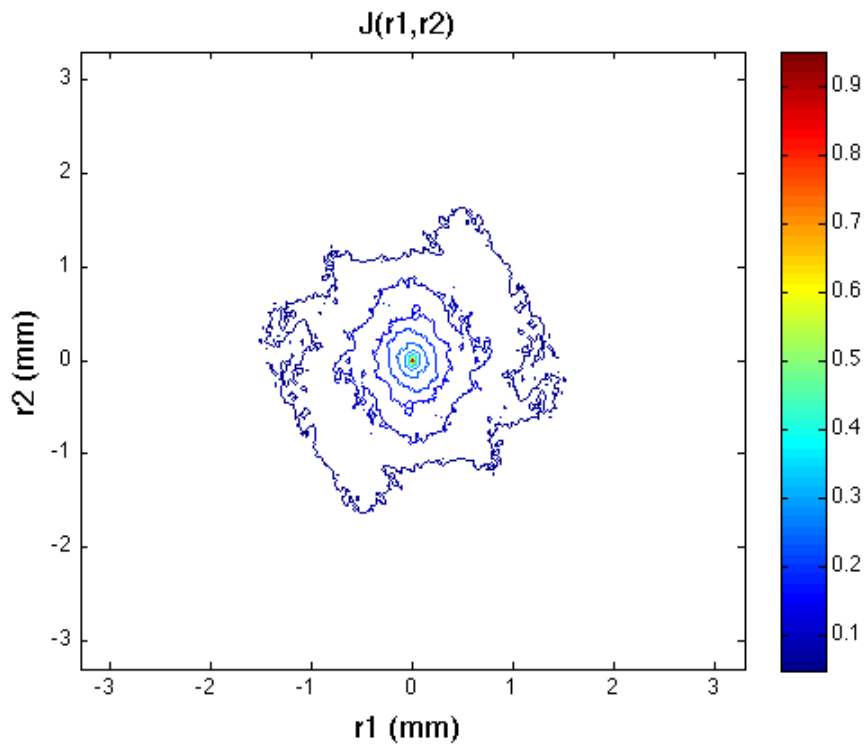


c.

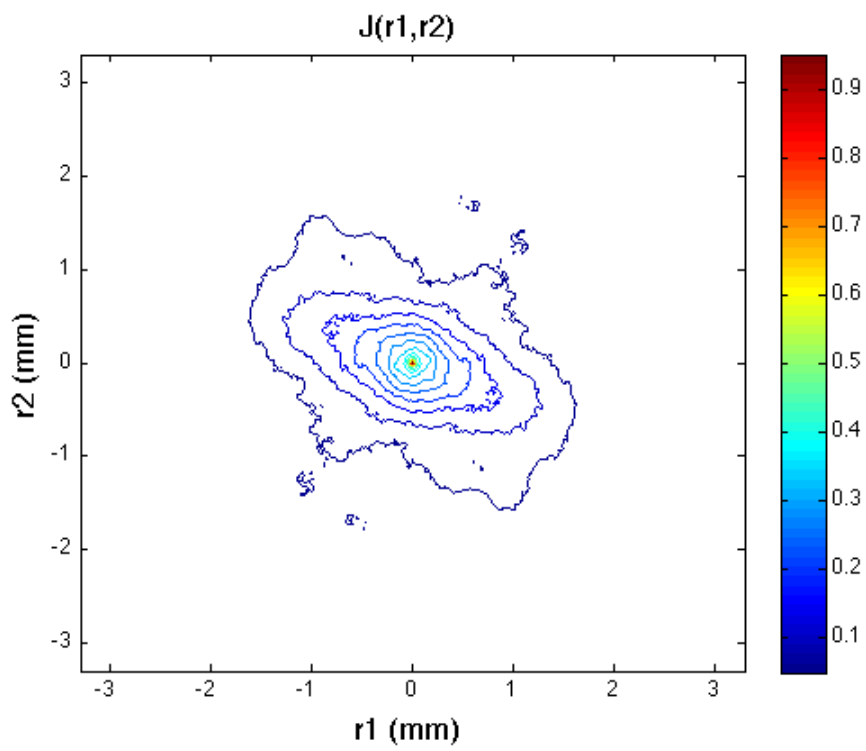


d.

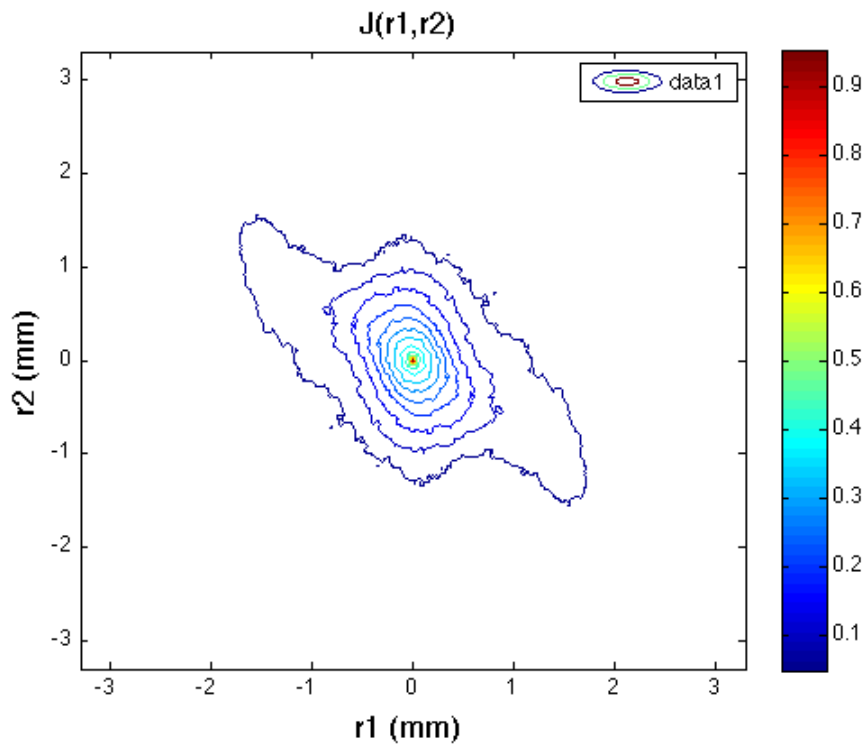
Figure 22. Intensités mutuelles d'une cornée à différentes épaisseurs : $1100\ \mu\text{m}$ (a), $790\ \mu\text{m}$ (b), $640\ \mu\text{m}$ (c), et $580\ \mu\text{m}$ (d).



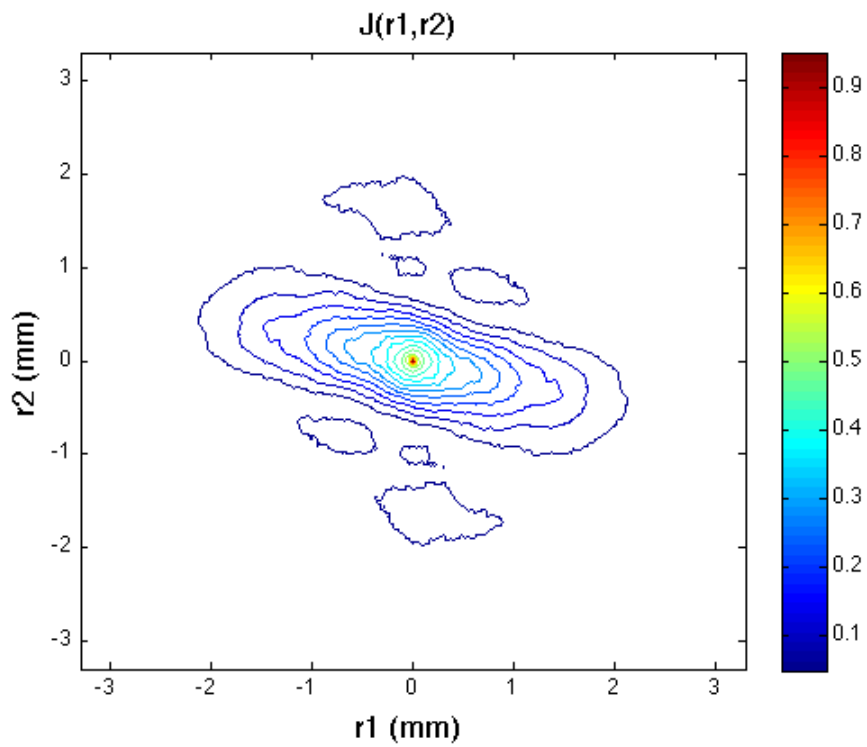
a.



b.



c.



d.

Figure 23. Contour des intensités mutuelles d'une cornée à différentes épaisseurs : 1100 μm (a), 790 μm (b), 640 μm (c), et 580 μm (d).

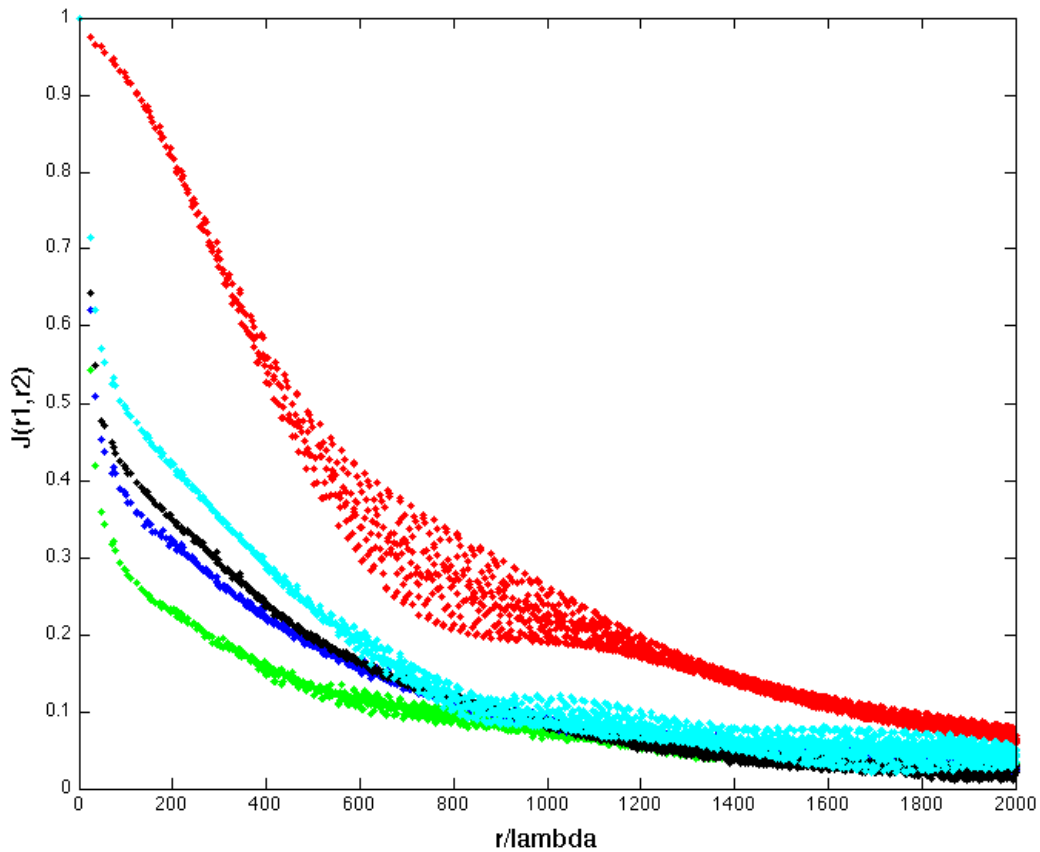


Figure 24. Intensité mutuelle en coordonnées polaires projetée sur un axe. En rouge, l'intensité mutuelle d'un faisceau gaussien après traversée du porte échantillon. En vert, pour une cornée à 1100 μm , en bleu pour 790 μm , en noir pour 640 μm , et en cyan pour 580 μm .

On observe une évolution de l'intensité mutuelle avec l'épaisseur du tissu. La cohérence du faisceau diffusé diminue avec l'épaisseur du tissu. La corrélation spatiale interfibrillaire diminue effectivement avec le degré d'œdème selon les observations réalisées par imagerie (chapitre II).

Le volume sous la surface de cohérence a été calculé pour l'ensemble des mesures réalisées dans une même configuration afin d'évaluer l'évolution de la cohérence spatiale d'une onde diffusée par la cornée. Dans la littérature, il est courant d'évaluer la surface de cohérence, ou la largeur à mi-hauteur de l'intensité mutuelle. Cependant, du fait de l'allure de l'intensité mutuelle d'une onde diffusée par une cornée, nous avons choisi de calculer le volume que recouvre l'intensité mutuelle.

Les résultats sont présentés à la figure 25. On constate d'abord qu'il n'existe pas de relation de linéarité entre épaisseur de la cornée et perte de cohérence du faisceau. L'intensité mutuelle évolue lentement pour les épaisseurs importantes (700-1000 μm). Lorsque les

cornées approchent de l'épaisseur physiologique, le volume de cohérence augmente de façon beaucoup plus prononcée.

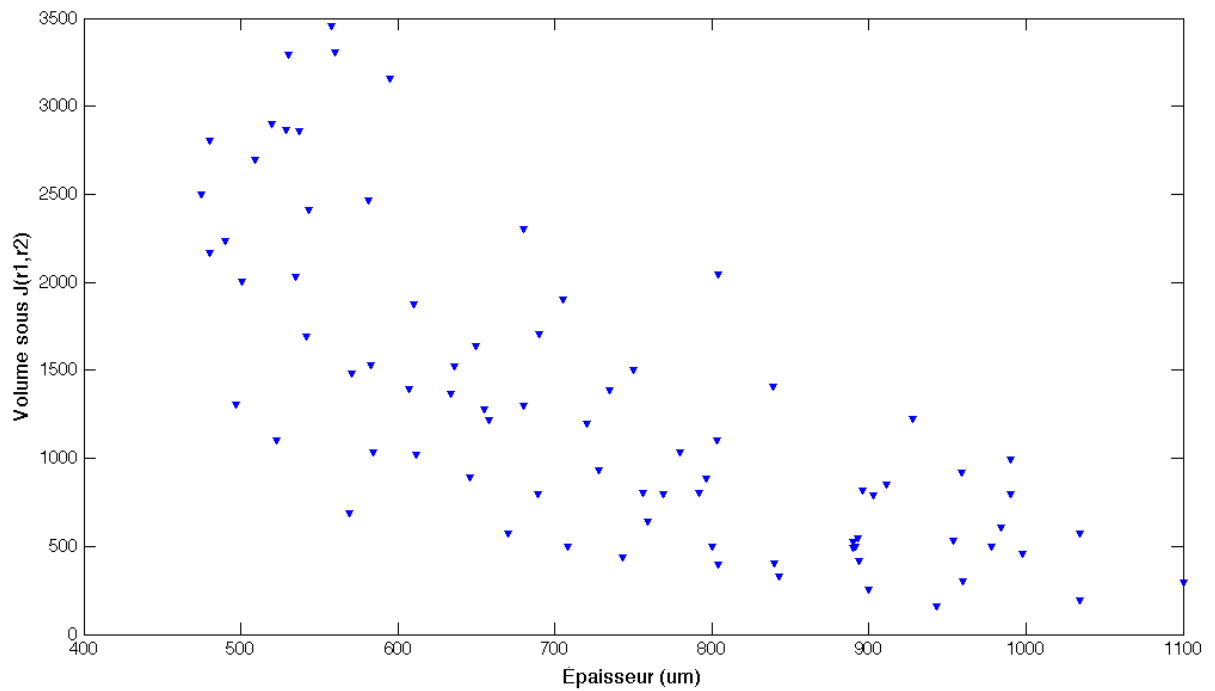


Figure 25. Évolution de l'intensité mutuelle en fonction de l'épaisseur cornéenne.

La cornée devient en effet transparente du fait de l'organisation spatiale des fibrilles de collagène. Ces résultats semblent appuyer ceux obtenus en OCT (chapitre III). Lorsque les cornées deviennent très œdémateuses, on observe l'apparition des lacs. On se trouve alors dans un régime de diffusion différent. L'intensité mutuelle de l'onde diffusée vers l'avant semble être influencée de manière moins importante par ce type de diffusion.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté un nouveau moyen de mesure de l'intensité mutuelle d'une onde diffusée vers l'avant par holographie numérique hors-axe. Le dispositif a été calibré à l'aide de solution de pastis présentant plusieurs niveaux de dilution dans l'eau. Cette méthode a ensuite été appliquée afin d'évaluer la perte de cohérence d'un faisceau traversant la cornée claire et œdémateuse. Dans les chapitres précédents, la diffusion de la cornée a été mesurée par différentes méthodes. Il s'agit ici d'évaluer la perturbation de la phase lors de la traversée du tissu. Il existe une corrélation entre cette perturbation de phase et le niveau de diffusion. Les résultats des mesures effectuées sur des tissus de différentes épaisseurs montrent également une corrélation importante entre l'épaisseur de la cornée et la perte de cohérence du faisceau. Toutefois, on remarque, que pour les cornées approchant de l'épaisseur physiologique, la cohérence spatiale semble présenter une augmentation plus prononcée. Cela corrobore l'existence de deux types de diffusions déjà observés par les mesures du chapitre III : l'une qui est une diffusion de Rayleigh due aux fibrilles de collagène et modulée par le facteur de structure, l'autre due aux lacs dont la présence semble affecter de manière moins prononcée la cohérence spatiale du champ.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Takayama Y et. Al, Measurement of the cohérence of synchrotron radiation. J. Synchrotron Radiat. **5**, 456-458 1998.
- [2] Mejia Y, Gonzales A. Measuring spatial coherence by using a mask with multiple apertures. Optics communication 273 (2003) 428-434
- [3] Lin J.A.A, Paterson D, Peele A.G, McMahon P.J, Chantler C.T, Nugent K.A. Measurement of the spatial cohérence function of undulator radiation using a phase mask. Phys. Rev. Lett. **90**, 074801 (2003).
- [4] Goodman, Statistical Optics, Wiley Interscience Publication, 2000.
- [5] Bastiaans J. Application of the Wigner distribution function to partially cohérent light. J. Opt. Soc. Am . A 3 1227-1238 (1986)
- [6] Romain Pierrat. Propagation et émission du rayonnement en milieu diffusant. Application à l'imagerie des milieux complexes. Thèse de doctorat, Ecole centrale Paris, 2007.
- [7] Nugent K.A, Wave Field Determination Using Three-Dimensional Intensity Information. Physical Review Letter, Vol 68, Numb 15, 1992.
- [8] Cheng C.C, Raymer M.C, Propagation of transverse Optical cohérence in random mutliple scattering media. Physical review A, Volume 62, 023811, 2000.
- [9] Grillo I. Small-angle neutron scattering study of a world-wide known emulsion: Le PastisColloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects, vol. 225, n° 1-3, septembre 2003.
- [10] Gabor D. A new microscopic principle. Nature 161 :777-778
- [11] Gabor D. Microscopy by reconstructed wavefront. Proc Roy Soc 197 :454-487
- [12] Gabor D. Microscopy by reconstructed wavefront : 2. Proc Roy Soc 64 :449-469
- [13] Wax A, Thomas J E. Measurement of smoothed Wigner phase-space distribution for Small angle scattering in a turbid medium. J. Opt. Soc. Am. A, 15, 1896, (1998)
- [14] Aruldoss C K, Dragomir N, Nugent K A, Roberts A. Coherence properties of light propagated through a scattering medium

- [15] Aruldoss C K, Dragomir N M, Roberts A. Non interferometric characterization of partially coherent scalar wave fields and application to scattered light. *J. Opt. Soc. Am. A*, Vol.24, No. 10, October 2007.
- [16] Haine M E, Mulvey T. Diffraction Microscopy with X-rays. *Nature* **170**, 202-203 1952.
- [17] Leith E N, Upatnieks J. Reconstructed wavefronts and communication theory. *J. Opt. Soc. Am.* 52, 1123-1130 (1962).
- [18] Leith E N, Upatnieks J. Wavefront reconstruction with continuous tone objects. *J. Opt. Soc. Am.* 53, 1377-1381 (1963).
- [19] Leith E N, Upatnieks J. Wavefront reconstruction with diffused illumination and three dimensional objects. *J. Opt. Soc. Am.* 54, 1295-1301 (1964).
- [20] Denisyuk Y N. On the reproduction of the optical properties of an object by the wave field of its scattered radiation. *Opt. & Spectr.* 15, 279-284, 1963.
- [21] Denisyuk Y N. On the reproduction of the optical properties of an object by the wave field of its scattered radiation. *Opt. & Spectr.* 18, 152-157, 1965.
- [22] Benton S A. Hologram reconstruction with extended incoherent sources. *J. Opt. Soc. Am.* 59, 1545-1546, 1969.
- [23] Powell R L, Stetson K A. Interferometric vibration analysis by wavefront reconstructions. *J. Opt. Soc. Am.* 55, 1593-1598, 1965.
- [24] Stetson K A, Powell R L. Interferometric hologram evaluation and real-time vibration analysis of diffuse objects. *J. Opt. Soc. Am.* 55, 1694-1695, 1965.
- [25] Goodman J W, Lawrence R W. Digital image formation from electronically detected holograms. *Appl. Phys. Lett.* 11 :77-79.
- [26] Schnars U, Jüptner W. Principles of direct holography for interferometry. Dans : Jüptner W, Osten W (ds) *FRINGE 93 Proc. 2nd international Workshop on automatic Processing of Fringe Patterns*. Akademie, Berlin, pp 115-120, 1993.
- [27] Schnars U, Jüptner. Direct recording of holograms by a CCD-target and numerical reconstruction. *Applied Optics* 33 (2) :179-181, 1994.
- [28] Schnars U, Jüptner. *Digital holography: digital hologram recording, numerical reconstruction, and related techniques*. Springer ed, 2004.
- [29] Cuhe E, Bevilacqua F, Depeursinge C. Digital holography for phase contrast Imaging. *Optics letters*, Vol. 24, Issue 5, 291-293, 1999.

- [30] Cuche E, Marquet P, Depeursinge C. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of off-axis holograms. *Applied Optics*, Vol.38, Issue 34, 6994-7001, 1999.
- [31] Pierre Marquet, Benjamin Rappaz, Pierre J. Magistretti, Etienne Cuche, Yves Emery, Tristan Colomb, and Christian Depeursinge. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. *Optics Letters*, Vol 30, Issue 5, 468-470, 2005.
- [32] O. Coquoz et al., Numerical reconstruction of images from endoscopic holograms, présenté à la 14^e Annual International Conference of the IEEE - EMBS, Paris, IEEE, p.338-339, 1992.
- [33] Zhang Y, Wu L Y, Zhang J. Study on the Phase Modulation Characteristics of Liquid Crystal Spatial Light Modulator. 2006 *J. Phys.: Conf. Ser.* 48 790, 2006
- [34] Yamaguchi I, Zhang T. Phase-shifting digital holography. *Optics Letters*, 22(16) :1268–1270, August 1997.
- [35] F. Le Clerc, L. Collot, and M. Gross. Numerical heterodyne holography with two-dimensional photodetector arrays. *Optics Letters*, 25(10) :716–718, May 2000.
- [36] M. Atlan, M. Gross, and E. Absil. Accurate phase-shifting digital interferometry. *Optics Letters*, 32(11) :1456–1458, June 2007.
- [37] M. Gross and M. Atlan. Digital holography with ultimate sensitivity. *Optics Letters*, 32(8) :909–911, April 2007.
- [38] F. Verpillat, F. Joud, M. Atlan, and M. Gross. Digital Holography at Shot Noise Level. *IEEE/OSA Journal of Display Technology*, pages 1–9, 2010.
- [39] Debye P, Sears F W. On the scattering of light by supersonic waves. *PNAS*, Vol 18, June 15, 1932.
- [40] Gori F, Sette D. Spatial coherence of light scattered from liquids. *Physical Review Letters*, Vol.17 No 7, 1966.
- [41] Iaconis C, Walmsley I A. Direct measurement of the two-point field correlation function. *Optics Letters*, Vol.21, No.21, 1996.
- [42] Lurie M. Fourier transform holograms with partially coherent light : holographic measurement of spatial coherence. *J. Opt. Soc. Am*, Vol. 58, No. 5, 1966.
- [43] Weingärtner I. Measurement of mutual coherence functions by image holography. *J. Opt. Soc. Am*, Vol. 60, No. 4, 1966, 1969.

[44] Mirandé W, Weingärtner I. Recording of inhomogeneous mutual coherence functions in one hologram by using a combinaison of image and Fourier (Fresnel) holography. Optics Communications, Vol.2, Issue 3, 1970.

[45] Goodman, Fourier Optics, Roberts et Company, édition IV.

:

CHAPITRE V : Étude de l'interaction entre un laser à impulsions ultra-brèves et le tissu cornéen

L'invention du laser par Maiman et Gould²⁸ au début de l'année 1960 a permis un saut technologique considérable et une multitude d'applications dans des domaines très différents comme l'aéronautique, l'imagerie, la communication ou la médecine. Dans chacune de ces applications, les effets physiques ou chimiques des lasers sur la matière avec laquelle ils interagissent peuvent être très différents selon les caractéristiques des lasers et les propriétés de la matière. Nous nous intéresserons plus spécifiquement dans ce paragraphe à l'interaction entre un laser et le tissu cornéen. Nous avons développé au sein du groupe (en collaboration avec nos partenaires académiques et industriels) des sources lasers avec des longueurs d'ondes optimisées permettant de réaliser des découpes dans le tissu dans le cadre d'applications chirurgicales et plus particulièrement dans le cas de la greffe de la cornée. Ces travaux ont donné lieu à deux thèses précédentes au sein du groupe. Dans ce paragraphe, je vais présenter les résultats d'une étude plus fondamentale de l'interaction entre un laser à impulsion femtoseconde et le tissu.

Je commencerai pour cela par décrire l'interaction laser-tissu et présenter un dispositif d'holographie numérique sur lequel je me suis basé pour étudier l'interaction entre une unique impulsion et la cornée. Ces expériences ont été menées à l'Institut de FORTH Héraklion en Crète, Grèce, dans le cadre d'une collaboration financée par le projet européen LaserLab qui nous a été attribué dans le cadre de ma thèse.

¹ C'est à Gould qu'on doit l'acronyme laser. Maiman et Gould revendiquaient tous deux l'invention du laser à travers une guerre de brevets qu'ils se menaient via les tribunaux.

On peut distinguer deux types de lasers, les lasers continus et les lasers pulsés. La durée des impulsions pour ces derniers peut varier de 10ms pour un laser pompé par lampe flash, à 5f s pour des lasers titane-saphir à blocage de mode autodéclenché. La durée de l'impulsion va essentiellement déterminer le type d'interaction avec le tissu. La longueur d'onde, elle, va déterminer la profondeur de pénétration du laser dans le tissu ainsi que la proportion de lumière diffusée ou absorbée par le tissu. Ces deux paramètres sont les paramètres essentiels à prendre en compte lors de l'étude de l'interaction entre un laser à impulsions et un tissu biologique. Cependant, d'autres paramètres seront à prendre en considération, comme la densité d'énergie, qui va surtout déterminer le seuil à partir duquel l'effet pourra se produire et l'importance de cet effet. Les effets qui nous intéressent dans les applications médicales ont couramment lieu à des densités d'énergie se situant entre 1 J/cm² et 1000 J/cm². Un dernier paramètre qu'on peut prendre en compte est l'intensité effective avec laquelle on fait interagir le tissu. Il s'agit du rapport de la densité d'énergie et de la durée d'impulsion. Les différents régimes d'interaction selon la durée de l'impulsion laser sont résumés dans le tableau 1. Nous nous intéressons ici au régime femtoseconde qui permet d'obtenir un effet très localisé dans le tissu et de créer de la photodisruption, qui est l'effet recherché dans le cas de la découpe de tissu.

Durée d'interaction	Processus d'interaction
> 100 ms	Interaction photothermique et photobiostimulée
entre 10 ⁻⁵ s et 1 s	Interaction photothermique
entre 10 ⁻⁹ s et 10 ⁻⁷ s	Photoablation
entre 10 ⁻¹² s et 10 ⁻⁸ s	Interaction photochimique
entre 10 ⁻¹³ s et 10 ⁻¹⁰ s	Interaction par génération de plasma
< 10 ⁻¹² s	photodisruption (régime des impulsions ultracourtes)

Tableau 1. Régimes principaux d'interaction entre un laser à impulsions et le tissu selon la durée de l'impulsion [1]

1. Interaction d'un laser à impulsions ultra-brèves avec le tissu

Le processus d'interaction d'un laser femtoseconde avec un diélectrique transparent comprend un ensemble de processus physiques complexes. Les trois phénomènes principaux, présentés sur une échelle de temps à la figure 1 sont :

- 1 L'excitation des porteurs de charges, correspondant à l'absorption des photons par les électrons et à la ionisation du diélectrique dans le volume focal. Il s'agit d'un phénomène hautement non linéaire qui a lieu dans un laps de temps équivalent à la durée du pulse.
- 2 La thermalisation correspond à l'équilibre thermique atteint par la diffusion des électrons phonons autour de la région de focalisation du laser. Cet effet a lieu quelques picosecondes après l'interaction.
- 3 Les modifications structurelles du matériau. La durée de thermalisation est trop courte pour qu'il puisse y avoir une relaxation acoustique. Les contraintes thermoélastiques sont ainsi confinées dans le volume focal. Une onde de choc dont les forces de tensions conduisent à une disruption est ainsi créée [3,4].

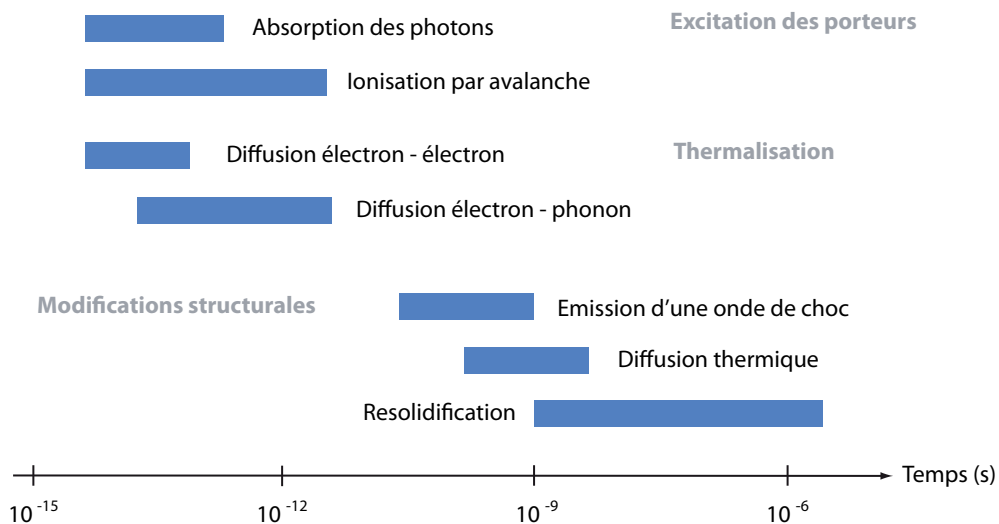


Figure 1. Echelle de temps indiquant le moment où interviennent les différents phénomènes physiques ayant lieu lors de l'interaction d'un laser femtoseconde avec un diélectrique transparent. [2]

Lorsque l'intensité du laser au point de focalisation atteint un seuil énergétique, il y a claquage optique et donc modification structurale de la matière. Celui-ci a lieu après génération d'un plasma par des effets d'ionisations non-linéaires du tissu. Dans le cas où

on se retrouve au dessus du seuil de claquage optique, une bulle de cavitation se forme, puis se résorbe, donnant lieu à une disruption localisée dans le volume du tissu. Différentes études expérimentales ont montrés que le claquage optique dans un tissu biologique comme la cornée était proche de celui ayant lieu dans l'eau [1,2]. Au sein d'un gaz, le claquage optique donne lieu à la génération d'électrons libres, alors que dans le cas d'un liquide, ces électrons sont considérés comme quasi-libres. On peut alors considérer que l'eau comme un semi-conducteur amorphe [3] avec une énergie d'excitation de $\Delta=6,5$ eV [8]. L'énergie nécessaire pour induire la photoionisation est de l'ordre de 10^{12} à 10^{13} W.cm²[4-8]. Les électrons excités par l'énergie apportée par le laser entrent en collisions avec les atomes et les molécules du milieu environnant et sont accélérés par absorption linéaire [4,9-13](effet Bremsstrahlung inverse) sous l'effet du champs électrique induit par le laser. Les électrons peuvent ainsi acquérir une énergie cinétique supérieure à l'énergie d'ionisation par collision et faire émerger de nouveaux électrons libres dans le milieu, eux-mêmes accélérés à leur tour, et engendrant de nouveaux électrons libres par collision. Ce processus, appelé ionisation par effet avalanche, génère un plasma de faible densité électronique. On considère couramment, depuis Vogel [9] que la densité d'électrons libres nécessaire au claquage optique est de $\rho = \frac{\omega_L^2 m_e \epsilon_0}{e^2} = 10^{21} \text{ cm}^{-3}$. La figure 2 représente les différents processus d'ionisation décrits ci-dessus.

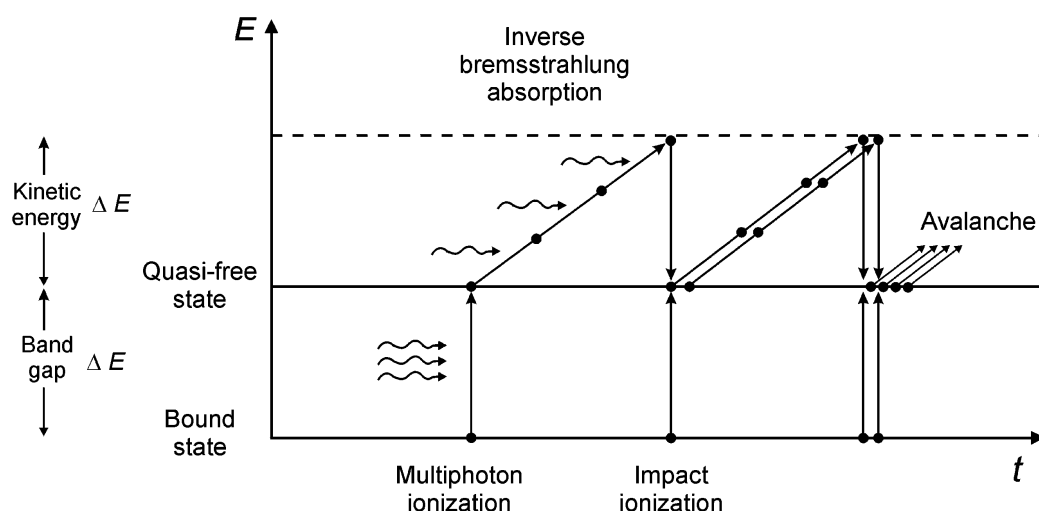


Figure 2. Schéma relatant les différents processus d'ionisation non linéaires [9].

1.1 Ionisation induite par un laser femtoseconde

La densité d'électrons libres générée par la photoionisation, et le taux d'ionisation par cascade sont contrebalancés par le taux de recombinaison des électrons ainsi que le taux des électrons diffusés en dehors du volume focal. On peut décrire cette densité d'électrons libres $\rho(t)$ par l'équation suivante [4,9] :

$$\frac{d\rho(t)}{dt} = W_{PI}(I) + \eta_{cascade}\rho I - \eta_{diffusion}\rho - \eta_{recombinaison}\rho^2 - \frac{\rho}{\tau_{cap}} \quad (1)$$

où, $W_{PI}(I)$ représente le taux de photoionisation non linéaire, I étant l'intensité incidente de l'impulsion, $\eta_{cascade}\rho I$ est le taux d'ionisation par cascade, $\eta_{diffusion}\rho$ le taux de diffusion des électrons libres en dehors du volume focal, $\eta_{recombinaison}\rho^2$ le taux de recombinaison des électrons, et $\frac{\rho}{\tau_{cap}}$ correspond aux électrons piégés dans les énergies interbandes. Dans le

cas des impulsions femtosecondes, les trois derniers termes n'ont qu'une influence très faible. La diffusion en dehors du volume focal ainsi que la recombinaison ne se produisent, en effet que pour des temps d'interaction à partir de la nanoseconde. Quant au dernier terme, s'il peut avoir une influence dans certains matériaux [13], on peut toutefois le négliger dans notre cas.

La photoionisation possède deux contributions. La première est la ionisation directe par absorption multiphotonique, et la seconde, l'ionisation par effet tunnel suivie par effet avalanche. Chacune de ces contributions sera prédominante sur la seconde suivant la longueur d'onde, l'intensité de la lumière incidente, et le potentiel d'ionisation de la matière. L.V Keldysh [14] a développé une expression générale à partir de l'expression d'ionisation non-linéaire afin d'estimer la contribution de chacun de ces phénomènes à la photoionisation. Cette théorie est valable lorsque les énergies des photons dans le champ du laser incident sont largement inférieures au potentiel d'ionisation du milieu Δ .

Le paramètre adiabatique γ introduit par Keldysh [14] est donné par l'équation suivante :

$$\gamma = \frac{\omega_L}{eE} \sqrt{\Delta} = \frac{\omega_L}{e} \left[\frac{m_e^* n_i^* c \epsilon_0 E_{GAP}}{I} \right]^{1/2} \quad (2)$$

où E_{GAP} est le gap énergétique, e la charge électronique, m_e^* la masse réduite de l'électron, ω_L la pulsation du laser, I son intensité, c la vitesse de la lumière dans le vide, et n_r^* la partie réelle de l'indice de réfraction du matériau.

Selon que le paramètre γ sera grand ou petit par rapport à 1, les effets de ionisation par effet tunnel ou par ionisation multiphotonique vont respectivement prédominer, ainsi que le décrit la figure 3.

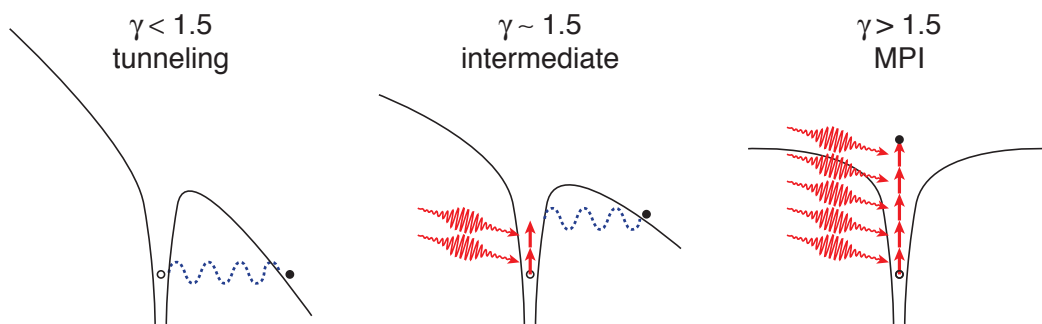


Figure 3. Différents processus d'ionisation dominants selon le paramètre de Keldysh [2]

La figure 4 présente l'évolution du taux de photoionisation non linéaire W_{PI} en fonction de l'intensité. On voit que selon le modèle de Keldysh, l'intensité correspondant à $\gamma=1$, c'est à dire l'intensité pour laquelle on a une proportion égale d'ionisation par effet tunnel et par ionisation multiphotonique, est $I=1,9.10^{13} \text{ W.cm}^{-2}$. L'intensité nécessaire au claquage optique étant du même ordre que cette dernière, la théorie complète de Keldysh doit être considérée (en trait plein sur la figure 4), et pas seulement l'ionisation multiphotonique. Le modèle de Drude [4,10,11,12] permet de décrire l'ionisation par effet avalanche par la relation suivante :

$$\eta_{cascade} = \frac{\sigma}{\varepsilon_{crit}} \quad (3)$$

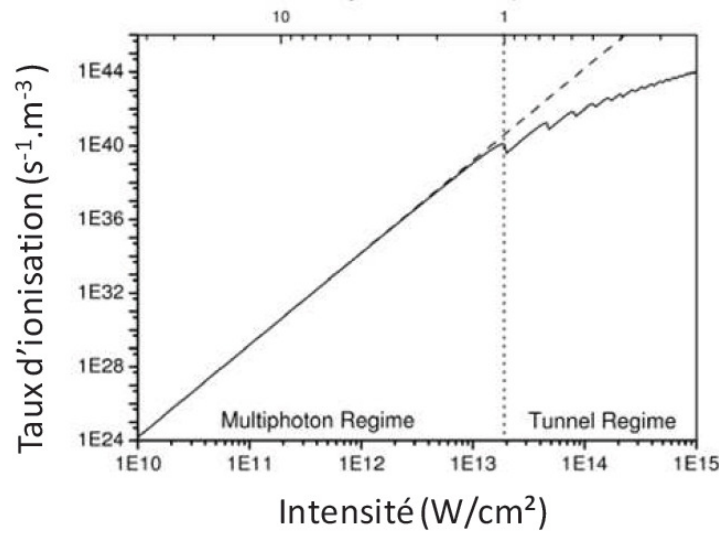


Figure 4. Taux d'ionisation non linéaire totale W_{PI} (trait plein) et réduit à la seule absorption multiphotonique (trait pointillé) en fonction de l'intensité et du paramètre de Keldysh pour une longueur d'onde de 780nm et $\Delta=6.56\text{eV}$ [14]

$$\sigma = \frac{n}{c} \cdot \frac{e^2}{\epsilon_0 n^2 m^*} \cdot \frac{\tau_p}{1 + \omega^2 \tau_p^2} \quad (4)$$

où σ est la section efficace du processus de Bremsstrahlung inverse [4], m^* la masse effective des quasi électrons libres, τ_p le temps de collision entre les électrons libres et les particules lourdes dans le plasma. Les lois de conservation d'énergie et de la quantité de mouvement étant simultanément vérifiées, les photons sont absorbés lors de ces collisions, et τ_p est donc également lié à la vitesse d'ionisation par avalanche. Il est de l'ordre de 1fs.

Le modèle de Drude connaît des limites. En effet, tous les électrons libres n'atteignent pas une énergie cinétique suffisante (c'est à dire supérieure à ϵ_{crit}) pour libérer d'autres électrons par collisions. Par conséquent, le taux d'ionisation par avalanche est probablement surestimé dans ce modèle. Rethfeld [15,16] propose ainsi un modèle plus complet prenant en compte la dynamique énergétique dans la bande de conduction. Ce modèle est utilisé pour déterminer le seuil de claquage optique dans les tissus biologiques [17,18].

1.2 Propagation non-linéaire des impulsions ultra-brèves

Le seuil de claquage optique dans le tissu correspond à des intensités élevées de l'ordre de 10^{13} W/cm². Des impulsions ultra-courtes focalisées dans le tissu correspondant à de telles intensités engendrent un grand nombre de phénomènes physiques (figure 5). On peut observer les phénomènes d'autofocalisation, de modulation de phase, de génération de super continuum, de génération de troisième harmonique, la formation de stries [6,7,17,18], la filamentation [19,20] ou la défocalisation du plasma au point focal.

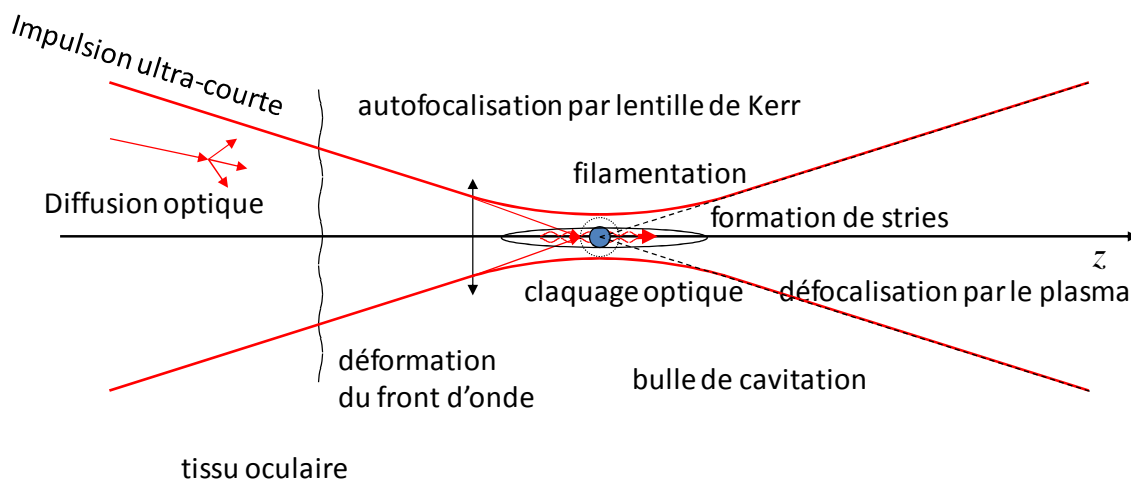


Figure 5. Les hautes intensités des impulsions ultra-courtes focalisées dans le tissu font intervenir de nombreux phénomènes physiques [1].

Ainsi, les impulsions ultra-brèves, du fait de leurs intensités élevées, modifient le tissu dans lequel elles se propagent, et ce dernier, à son tour peut altérer les impulsions et modifier leur propagation. Le plasma généré par la ionisation du milieu a une durée de vie de l'ordre de la nanoseconde. L'indice de réfraction change également en conséquence. Par exemple, la modification de l'indice du milieu par effet thermique a une durée de vie de l'ordre de la milliseconde. La modification peut être également permanente comme dans le cas de la photoablation ou de la photodisruption. La modification de l'indice de réfraction du milieu va directement influencer sur la propagation de l'impulsion. Nous allons brièvement discuter des sources de modification non-linéaires de l'indice de réfraction du milieu. L'effet Kerr, qui est une non-linéarité optique de troisième ordre, est à l'origine

d'une variation positive de l'indice, alors que la formation du plasma par ionisation du milieu résulte en une variation négative de l'indice du milieu.

1.2.1 Effet Kerr

L'effet Kerr porte le nom du physicien écossais qui l'a découvert en 1875. Il consiste en une biréfringence créée dans un matériau transparent par l'application d'un champ électrique important extérieur à celui-ci. En effet, le champ électrique modifie la susceptibilité électrique du milieu en créant une polarisation. Lorsque l'intensité du laser incident sur le tissu est très élevée, on devra prendre en compte ces contributions non-linéaires à la polarisation du milieu. La biréfringence créée par effet Kerr varie selon le carré du champs électrique appliqué, c'est à dire selon l'intensité et peut être décrite par l'équation suivante :

$$\Delta n = n_{//} - n_{\perp} = \lambda K E^2$$

où K est la constante de Kerr, λ la longueur d'onde dans le vide, $n_{//}$ et n_{\perp} respectivement, l'indice de réfraction pour une onde polarisée selon la direction du champ électrique appliqué, et perpendiculairement au champ électrique appliqué.

Si le champ électrique dû à l'onde incidente est petit en comparaison du champ électrique atomique, on peut développer la polarisation P_i en série de puissance du champ électrique :

$$\vec{P} = \vec{P}^{(1)} + \vec{P}^{(2)} + \vec{P}^{(3)} + \dots$$

où $\vec{P}^{(i)}$ est la polarisation d'ordre i en puissance du champ électrique.

On peut écrire :

$$P_i = \chi_{ij}^{(1)} E_j + \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k + \chi_{ijklm}^{(3)} E_j E_k E_m + \dots$$

$\chi^{(n)}$ est le tenseur d'ordre (n+1) représentant la réponse à l'ordre n du matériau, P_i et E_i sont les composants vectoriels de la polarisation et du champ électrique respectivement. Les termes de l'équation sont la réponse linéaire du matériau, la réponse non-linéaire de second ordre, et la réponse non-linéaire de troisième ordre. Les réponses non-linéaires peuvent générer une polarisation de fréquence différente de celle de l'onde incidente. Le second terme de l'équation est responsable de la génération de seconde harmonique (SHG). Nous ne nous intéressons pas dans cette étude à la SHG. Le terme de troisième ordre est responsable de la variation non-linéaire de l'indice de réfraction[21] :

$$P^{NL} = \chi^{(3)}|E|^2 E$$

En effet nous avons la relation: $\chi = n^2 - 1$.

La réponse du matériau transparent soumis à une forte intensité lumineuse est telle que son indice de réfraction n possède une contribution linéaire constante, ainsi qu'une contribution non-linéaire dépendant de l'intensité de l'onde lumineuse.

Nous avons [22,23] :

$$n = n_0 + n_2 I$$

avec n_0 l'indice de réfraction du milieu, n_2 le coefficient de Kerr du matériau et I l'intensité du faisceau lumineux. On notera que le coefficient de Kerr, selon la longueur d'onde et la durée de l'impulsion peut être positif ou négatif. Pour des impulsions de l'ordre de la microseconde et au delà, les effets thermiques seront prédominants dans le milieu, ce qui résulte en un coefficient de Kerr négatif. On peut le comprendre par une variation négative de la densité due au réchauffement. Inversement, pour des impulsions plus courtes que la picoseconde, les effets thermiques ne pourront être observés, et les contributions essentielles proviendront de la réponse électronique du matériau (de l'ordre du femtoseconde) ainsi que de la réponse moléculaire (de l'ordre de la picoseconde).

Lorsque l'effet de Kerr a une valeur positive, le faisceau laser se propageant dans le milieu connaîtra un effet d'autofocalisation. En effet l'indice de réfraction ne dépend que de l'intensité selon l'équation précédente. Autrement dit, un faisceau laser dont le profil est gaussien verra ses composantes de haute intensité proche de l'axe optique retardées par

rapport aux intensités du profil de faisceau en périphérie de l'axe optique. Cet effet de Kerr induit donc un profil de phase transverse équivalent à une lentille convergente. Une impulsion laser connaîtra un effet d'autofocalisation lorsque sa puissance excèdera une valeur critique définie par la relation [22]:

$$P_{critique} = \frac{\pi(0.61)^2 \lambda^2}{8n_0 n_2}$$

À la valeur critique, les effets non-linéaires sont exactement compensés par les effets de diffraction ; le faisceau est auto-piégré et se propage avec un diamètre constant. Il s'agit là d'un équilibre instable. Lorsque la puissance du faisceau est en deçà de la puissance critique, celui-ci va diffracter, et lorsque la puissance est au delà de la valeur critique, l'effet de focalisation perdurera jusqu'à entrer en concurrence avec d'autres phénomènes non-linéaires qui vont pondérer cet effet. Avec l'effet d'autofocalisation, le diamètre du faisceau va en diminuant augmentant ainsi la puissance de la lentille jusqu'à la création d'un plasma absorbant qui provoque la défocalisation (cela peut mener par exemple à la formation de solitons). Lorsque la puissance de l'impulsion sera bien supérieure à celle de la valeur critique (deux ordres de grandeurs et au delà), le faisceau va se briser en une multitude de filaments, chacun d'entre eux portant une puissance de l'ordre de la puissance critique. Si les conditions d'équilibre entre autofocalisation et défocalisation sont réunies, la propagation par filamentation peut s'étendre sur des distances bien supérieures à la distance de Rayleigh. L'intensité permettant cet équilibre est dans l'eau de l'ordre de 10^{13} W.cm^2 [19]. Il est à noter, pour ce qui concerne les considérations pratiques de chirurgie ophtalmique, que pour de faibles ouvertures numériques de l'objectif utilisé pour focaliser le faisceau dans le tissu cornéen, la filamentation a davantage de chances de se produire que le claquage optique. Ce dernier phénomène devient dominant pour de grandes ouvertures numériques [24,25,26]. Dans l'eau, pour une longueur d'onde de 780 nm, avec $n_2 = 2.10^{-20} \text{ m}^2.W$ [5], la puissance critique vaut $3,4.10^6 \text{ W}$.

Un autre phénomène non-linéaire qui concurrence le claquage optique est la formation de stries [27,28]. Ce phénomène est dû à la défocalisation du faisceau par le plasma lors du claquage optique. La densité du plasma augmente au fur et à mesure de la propagation de l'impulsion. Ainsi le début de l'impulsion ne sera que peu affectée par le

plasma alors que la fin de l'impulsion subira une forte absorption et une forte défocalisation. Cela induit une asymétrie temporelle et spatiale, et on observe des formes de stries. Le collagène se trouvant dans la cornée est également modifié par cette géométrie.

1.2.2 Changement d'indice du fait de la génération de plasma

Nous avons vu que la formation de plasma dans un tissu est rendue possible par l'interaction avec des impulsions laser ultra-courtes selon deux processus (§1.1). Lorsque l'intensité des filaments excède le seuil de claquage optique du tissu, des électrons libres sont générés. Lorsque le régime impulsionnel est de l'ordre du femtoseconde, le mécanisme dominant de photoionisation sera l'absorption multiphotonique. Un seul électron va absorber plusieurs photons, ce qui entraîne l'ionisation du milieu. Le plasma généré entraîne une variation de l'indice de réfraction. Cette variation peut rivaliser avec celle induite par l'effet Kerr précédemment décrit. Cette variation d'indice due à la génération de plasma est décrite par :

$$\Delta n = \sqrt{1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2}} - 1 \approx \frac{-\omega_p^2}{2\omega^2}$$

avec ω la fréquence angulaire du laser, et ω_p la fréquence du plasma qui est donnée par :

$$\omega_p = \frac{Ne^2}{\epsilon_0 m}$$

N est la densité d'électrons, $e=1,6.10^{-19}$ C est la charge électronique, $m=9,1.10^{-31}$ kg la masse de l'électron et $\epsilon_0=8,85.10^{-12}$ C²s²m⁻³kg⁻¹ est la permittivité de l'air. La densité de plasma peut donc être déduite de la variation d'indice de réfraction. Cette variation d'indice peut stabiliser l'autofocalisation de l'effet Kerr[28,29,30]. Lorsque le faisceau se focalise, l'intensité augmente et la variation d'indice devient davantage négative. Cette variation finalement va être assez importante pour diminuer la densité de plasma et défocaliser le faisceau, entraînant ainsi un nouveau cycle de focalisation et de défocalisation. Durant le processus d'ionisation, des pertes énergétiques ont lieu, et le cycle d'autofocalisation et de défocalisation se termine lorsque la puissance critique est

atteinte. En l'absence de création de plasma, un effet non-linéaire de cinquième ordre vient contrebalancer la focalisation par une saturation d'indice [31]. L'effet qui va dominer dépend des propriétés du matériau ainsi que de la durée des impulsions.

1.2.3 Considérations pratiques pour la chirurgie cornéenne.

Il existe une finalité pratique et consiste à cette étude, et qui consiste en l'élaboration de lasers médicaux paramétrés afin de pratiquer des coupes dans le volume du tissu sain et œdémateux en provoquant un minimum de dommages collatéraux mécaniques ou thermiques. Les résultats obtenus pour les découpes sur tissus seront présentés au chapitre VI. Le seuil de claquage optique (ou disruption optique) dépend donc de plusieurs paramètres et il peut varier selon la durée de l'impulsion, la longueur d'onde, l'ouverture numérique de l'objectif de focalisation dans le tissu, les valeurs énergétiques... De plus, la précision de la découpe et l'apparition de dommages collatéraux seront également influencées par ces différents paramètres. Afin de s'en affranchir il est préférable d'utiliser des énergies les plus faibles possibles par impulsion ainsi qu'une fluence la plus faible possible. Il est également important de préciser une fois de plus que chaque tissu est unique et a un assemblage et une ultrastructure qui lui est propre, ce qui peut également faire sensiblement varier les paramètres.

De nombreuses études ont été réalisées dans le but de déterminer la dépendance du seuil de claquage optique par rapport à la durée des impulsions dans différents milieux transparents tels que l'eau, la silice ou la cornée [32-40]. Ces études ont été réalisées en surface car le seuil de claquage optique est bien plus simple à constater qu'en volume. En effet, la génération de plasma en volume devient dépendante des conditions de propagation dans le milieu qui sont extrêmement variables comme nous l'avons constaté dans les chapitres précédents. Le nombre de paramètres croît donc considérablement lorsqu'on veut étudier le seuil de claquage dans le volume du tissu. Il n'existe pas d'étude très approfondie à ce jour sur le seuil de claquage selon tous ces différents paramètres que ce soit dans l'eau ou dans les tissus biologiques. Vogel et al. ont mesuré le seuil de claquage optique en volume dans l'eau à 1040 nm à la fréquence double et triple [41]. Olivieri et al. ont mesuré le seuil de claquage à la surface d'une cornée, notamment pour différentes longueurs d'ondes entre 800 et 1450 nm [42]. En effet ce dernier paramètre est essentiel dans l'étude du seuil du claquage optique. Il a été constaté

que le seuil augmente de façon significative lorsqu'on passe de l'UV au proche infrarouge. Au delà, les variations deviennent plus faibles. Il faut également tenir compte du fait que lors de la modification de la longueur d'onde, la taille de la tâche focale varie également. Celle-ci a une dimension caractéristique A_{Focale} qui est proportionnelle au carré de la longueur d'onde, λ^2 (le volume focal $A_{Focale} \propto \lambda^3$). On peut noter qu'en ce qui concerne la propagation non-linéaire de l'impulsion, la puissance critique pour l'autofocalisation $P_{critique}$ est proportionnelle à λ^2 dans la mesure où n_2 peut être considéré constant. Une longueur d'onde double de l'impulsion incidente correspondrait pour une fluence identique, à une augmentation du seuil de claquage quatre fois plus important. Les effets non-linéaires par contre, ne connaissent pas de modification induite par un changement de longueur d'onde. On constate de manière générale que la fluence nécessaire au claquage optique décroît avec la diminution de la durée des impulsions. La pente du seuil de claquage optique augmente faiblement entre 100fs et 1ps. Au delà de la picoseconde, la pente croît de façon plus prononcée.

À notre connaissance, l'interaction entre une impulsion femtoseconde et le tissu biologique en volume n'a pas été étudiée à ce jour. Je présente dans ce chapitre les résultats de l'étude de la propagation d'une impulsion femtoseconde dans le volume du tissu cornéen par holographie numérique. Cette étude a été menée à l'Institut FORTH Héraklion en Crète avec la collaboration de Dr Stelios Tzortzakis et de Dr Dimitris Papazoglou qui ont conçu et mis en place ce dispositif d'holographie numérique. Cette étude a été rendue possible grâce au financement de LASERLAB que j'ai obtenu après avoir rédigé mon projet scientifique. Nous avons également pris des mesures sur une solution de collagène, que l'on compare avec les résultats obtenus sur la cornée. Les résultats de cette étude sont très concluants et ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'étude de l'interaction laser-tissu.

2. Image de la propagation non-linéaire d'une impulsion femtoseconde par holographie numérique

Comme nous l'avons vu, la compréhension de la propagation d'une impulsion femtoseconde dans le tissu présente un très grand intérêt tant sur le plan scientifique que technologique. En effet, la durée très courte de l'impulsion permet d'explorer des phénomènes physiques fondamentaux avec une très grande résolution, comme les réactions chimiques ayant lieu au niveau atomique, ou les changements ultra-rapides des propriétés physique et chimique ayant lieu au sein du tissu exploré peuvent être mesurés. Ces observations peuvent également s'étendre à d'autres domaines comme les télécommunications en observant la formation et la propagation de solitons [43,44] ou la génération d'une lumière blanche cohérente, ou laser blanc [45]. Les solitons, comme l'indiquent leur noms, sont ces ondes solitaires pouvant se propager sur une longue distance sans être altérés ou modifiés dans leur propriétés et pouvant interagir avec d'autres solitons.

Il existe différentes méthodes permettant de visualiser la propagation d'une impulsion femtoseconde. On peut par exemple visualiser et mesurer les dommages irréversibles dans le matériau, et ainsi reconstruire le profil du faisceau. On peut aussi dans le cas d'un liquide visualiser la traînée laissée en y insérant un produit fluoresçant et en enregistrant cette fluorescence [46]. On peut également visualiser la lumière émise par le plasma généré par l'impulsion.

Les dispositifs pompe-sonde sont les plus couramment utilisés de nos jours pour ce type d'étude. La pompe correspond à l'impulsion femtoseconde qui va induire l'effet non-linéaire qu'on souhaite observer. Elle va marquer l'origine des temps de l'expérience. La seconde impulsion laser dite « sonde » va permettre d'analyser le système avec un certain délai temporel sur lequel on peut idéalement agir. On peut ainsi reconstruire l'ensemble de l'évolution temporelle d'un évènement en combinant différentes mesures faites avec des délais temporels différents. La technique FTOP [47] (*femtosecond Time Resolved Optical Polarigraphy*) permet de mesurer les variations non-linéaires d'indice de réfraction dues à l'effet Kerr en observant les changements de polarisation de la sonde résultants de la biréfringence du milieu. Cette méthode n'est sensible qu'à la biréfringence et non à une variation isotropique de l'indice tel que cela se passe dans le plasma. La

méthode expérimentale que nous utilisons est basée sur l'holographie numérique. Elle a été développée et mise en place par les Professeur Dimitris Papazoglou et Stelios Tzortzakis de l'institut de FORTH Héraklion en Crète[48,49,50]. Je présenterai brièvement le dispositif, ainsi que les résultats obtenus sur le tissu cornéen.

2.1 Dispositif d'holographie numérique « En-ligne » pompe-sonde

Le principe d'imagerie à l'aide d'un dispositif d'holographie numérique pompe-sonde est très similaire à un dispositif classique d'holographie numérique tel que nous en avons présenté dans les chapitres précédents. L'intérêt d'un dispositif «En-ligne » réside dans le fait qu'il n'est pas nécessaire d'avoir une onde de référence en plus de l'onde objet ainsi qu'on peut le faire dans un dispositif hors-axe tel que décrit auparavant. En effet, l'objet transparent est illuminé avec une onde plane, et la partie diffractée va interférer dans le plan de l'hologramme avec la partie non diffractée. C'est de cette façon que l'hologramme sera donc enregistré sur un support numérique, puis reconstruit numériquement. Cette méthode de reconstruction sera d'autant plus efficace que la quantité de lumière diffractée sera petite par rapport à la partie transmise.

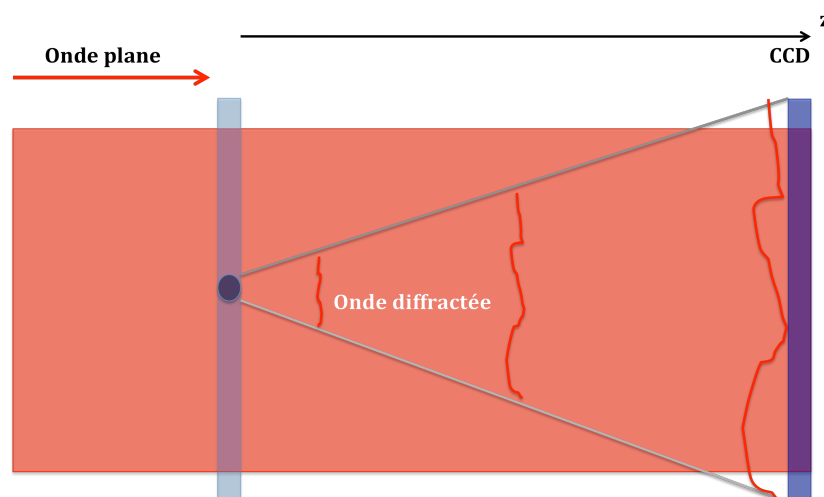


Figure 6. L'onde plane interagit avec l'objet transparent. La partie diffractée va interférer avec la partie non diffractée pour créer l'hologramme au niveau de la caméra.

Le dispositif d'holographie numérique en-ligne pompe-sonde est présenté à la figure 7. Il comporte un laser amplifié Ti:Sa produisant des impulsions d'une durée de 35 femtosecondes à une longueur d'onde de 800 nm. Cette longueur d'onde est celle actuellement disponible dans le cas de certains de lasers cliniques. Le laser séparé en deux bras par une lame séparatrice. L'un des bras servira de pompe et est focalisé dans l'objet étudié avec un objectif de microscope comportant une ouverture numérique de 0,2 est un agrandissement 10X. C'est le bras sonde qui va créer l'interaction non-linéaire entre le matériau transparent étudié, et le laser.

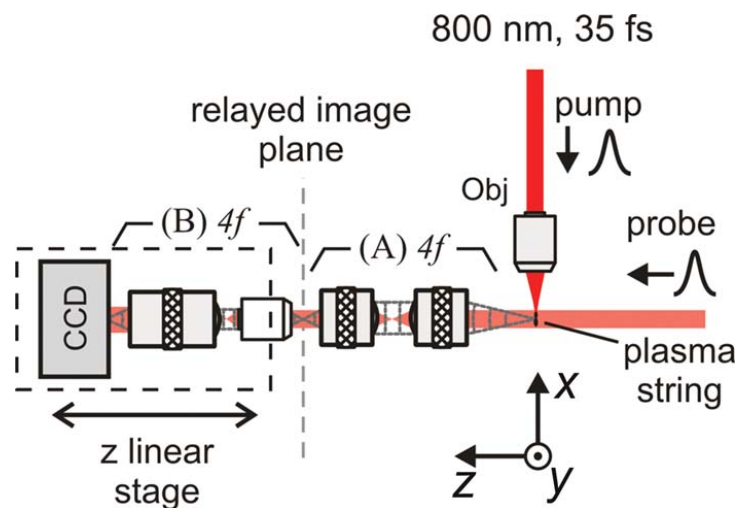


Figure 7. Dispositif expérimental d'holographie numérique En-ligne [48].

Le deuxième bras, le bras-sonde, est constitué d'un faisceau collimaté qui va interagir avec la pompe au niveau de la région focale et avec des délais différents. Le faisceau sonde est alors imagé au niveau d'une caméra CCD à travers un système optique de microscopie bitélécentrique permettant d'obtenir à la fois une résolution importante supérieure à $1,5 \mu m$ ainsi qu'un champ large. Ainsi que le montre la figure 7, on peut distinguer dans ce système optique deux parties. La première (A sur la figure 7) permet de produire un relai optique grâce à un système bitélécentrique 4f. Celui-ci est composé de deux objectifs photographiques permettant un agrandissement effectif de 1.4X pour une ouverture numérique de 0.26. Ce système de relais présente l'avantage d'offrir une distance de travail importante, de l'ordre de 50 mm. Un autre avantage important est la conservation tant de l'amplitude que de la phase du champ qui est relayée avec un minimum de distorsions. La partie B est elle aussi un système bitélécentrique 4f composée d'un objectif

de microscope présentant un agrandissement 10X et une ouverture numérique de 0,25. Il est également composé d'une deuxième lentille de zoom photographique. La partie B est reliée à la caméra CCD présentant 1024x768 pixels. On peut ainsi imager le plasma créée par la pompe dans l'échantillon étudié. Le sous-système B avec la caméra CCD est monté sur une monture de translation permettant d'enregistrer plusieurs images issues de plans différents. Des images de références dénuées de pompe sont enregistrées et soustraites des images obtenues afin de supprimer le bruit de fond.

2.2 Traitement numérique

Au niveau de la région de focalisation de la pompe, la sonde va interagir avec la pompe et être diffractée. Après une propagation libre dans l'espace on peut considérer que la sonde connaît une diffraction de Fresnel. On identifie alors les composantes de Fourier du champ complexe $U(x,y;z)$ comme étant les composantes du spectre angulaire, c'est à dire comme des ondes planes se propageant dans des directions différentes. On peut alors calculer le champ complexe dans tout plan de l'espace en tenant compte du déphasage induit par une propagation libre dans l'espace, et en additionnant les contributions des toutes ces ondes planes. On a donc :

$$U(x,y;z) = \iint P_{Z_0}(l_x, l_y) e^{i2\pi(z-z_0)\sqrt{1-l_x^2-l_y^2}} e^{i2\pi(l_x x + l_y y)} dl_x dl_y$$

x, y et z sont les coordonnées spatiales, P_{Z_0} est le spectre angulaire dans un plan normal à la coordonnée z_0 suivant l'axe optique. Il correspond à la transformée de Fourier du champ complexe $U(x,y;z_0)$ à la position z_0 . Enfin, l_x et l_y sont les cosinus directeurs correspondant à chaque onde plane $P_{Z_0}(l_x, l_y)$.

On enregistre donc l'amplitude $|U(x,y;z)| = \sqrt{I(x,y;z)}$ du champ diffracté au niveau de la caméra CCD.

L'objet étudié est illuminé avec une onde plane que l'on peut normaliser. Le champ complexe au niveau du plan objet peut donc être décrit par :

$$U_0(x,y) = 1 + O(x,y)$$

où $O(x,y)$ est la perturbation du champ induite par le matériau transparent à laquelle on ajoute une onde plane pour décrire l'ensemble du champ complexe dans le plan de l'objet. Au niveau du plan de la caméra où on enregistre l'hologramme, le champ est donc donné par :

$$U_H(x,y) = [1 + O(x,y)] \otimes h_z(x,y)$$

où $h_z(x,y)$ est le noyau de Fresnel décrit par :

$$h_z(x,y) = \frac{e^{ikz}}{ikz} e^{\frac{jk}{2z}(x^2+y^2)}$$

On enregistre donc l'hologramme au niveau du support numérique qui est décrit par l'équation suivante :

$$H(x,y) = |U_H(x,y;z)|^2 = |[1 + O(x,y)] \otimes h_z(x,y)|^2$$

Le champ reconstruit $U_R(x,y)$ peut donc également être décrit par :

$$U_R(x,y) = H(x,y) \otimes h_{-z}(x,y) = 1 + O(x,y) + O^*(x,y) \otimes h_{-2z}(x,y)$$

Ainsi que nous l'avons évoqué dans les chapitres précédents, l'hologramme enregistré comporte donc différents termes, et la reconstruction de l'amplitude $O(x,y;0)$ de l'image réelle va de pair avec celle de l'image virtuelle qui s'y superpose $O^*(x,y;-2z)$. Il est donc nécessaire de supprimer cette dernière. La méthode appliquée ici et décrite en [23] consiste en une approche itérative où l'on utilise un certain nombre d'hologrammes enregistrés au niveau de différents plans z_i . On propage numériquement selon la méthode de Fresnel les amplitudes et phases des ondes d'un plan à un autre en considérant une phase constante pour le premier hologramme enregistré. Ensuite, la phase calculée pour un plan donné par cette méthode est associée numériquement à l'amplitude mesurée expérimentalement. L'étape suivante consiste à de nouveau propager numériquement

l'onde complexe ainsi obtenue au plan suivant, puis la procédure est répétée dans le deux sens, vers l'avant et vers l'arrière, jusqu'à la reconstruction des amplitudes et phases pour tous les plans où les hologrammes ont été enregistrés. La figure 8 décrit schématiquement ce processus.

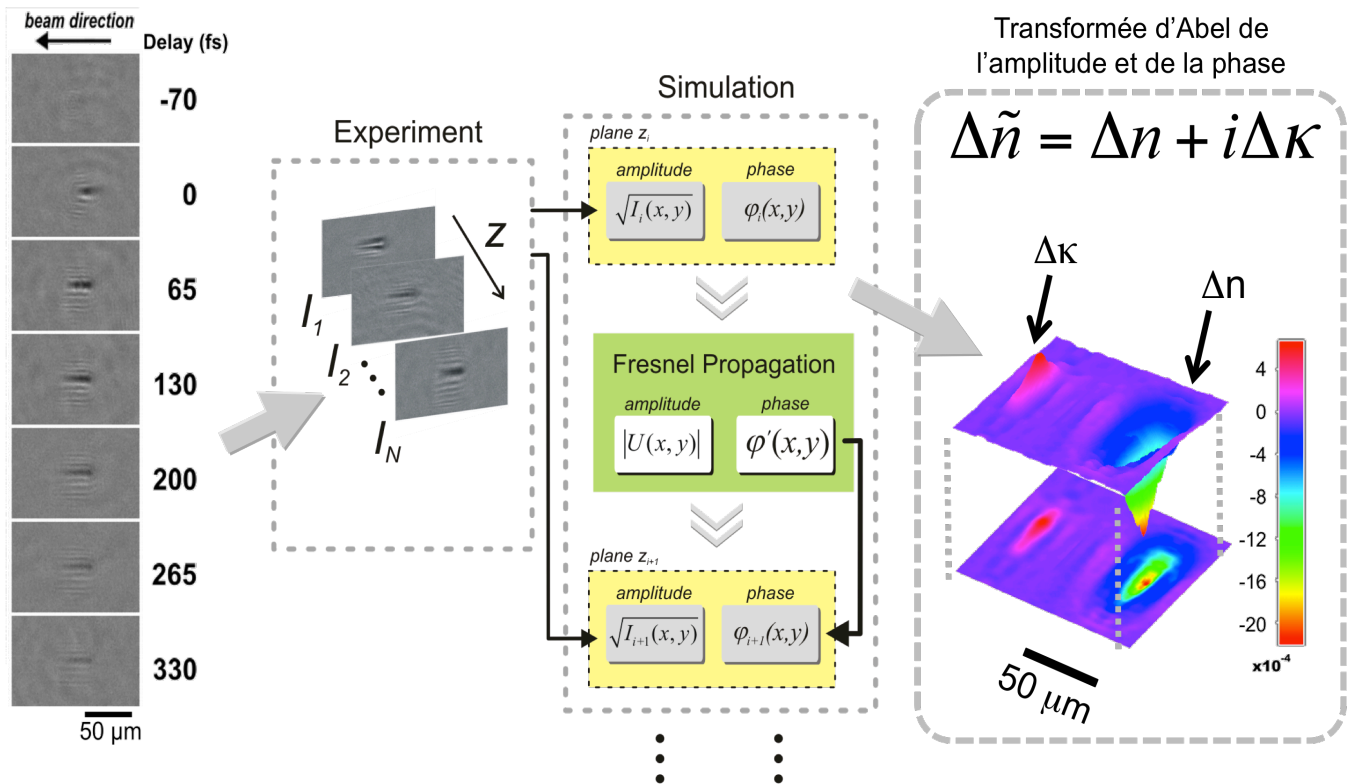


Image de diffraction pour différents délais

Figure 8. Procédure de la reconstruction numérique schématisée. Les détails se trouvent dans le texte [48].

L'interaction laser-matière se traduit par une filamentation observée qui est de l'ordre de quelques microns. Cela nécessite donc une ouverture numérique supérieure à 0,15 afin de pouvoir être visualisée au niveau de la caméra CCD. Celui-ci transforme l'onde plane en une onde sphérique induisant de ce fait une distorsion du spectre angulaire. C'est pourquoi on utilise un système télécentrique permettant de récupérer une onde plane à la sortie avec l'agrandissement désiré tel que représenté à la figure 6.

L'amplitude et la phase étant reconstruites, on peut en déduire les variations non-linéaires de l'indice de réfraction. En effet, la sonde qui va traverser le matériau qui

connaît une variation d'indice induite par la pompe, va accumuler un déphasage proportionnel à la variation d'indice du matériau :

$$\Delta\Phi(x,y) = \frac{2\pi}{\lambda} \int_0^L \Delta n(x,y,z) dz$$

où L est la longueur du matériau ayant vu une variation d'indice. L peut être calculé à partir de la taille du faisceau D , de l'angle séparant la pompe et le faisceau et d'une constante A selon la formule :

$$L = \frac{D}{\sin(\theta/2)} A$$

On estime donc aisément la variation d'indice de réfraction moyennée sur la distance L :

$$\langle \Delta n(x,y) \rangle = \frac{\Delta\phi(x,y)\lambda}{2\pi L}$$

Pour estimer la variation 3D d'indice de réfraction sur l'ensemble de la région d'intérêt, on applique une transformée de Fourier-Hankel de la transformée inverse d'Abel, ainsi que décrit à la référence [48]. On peut donc en déduire la variation d'indice de réfraction selon la direction de propagation de l'impulsion et pour des délais différents de la sonde. La figure 9 décrit un tel résultat obtenu dans l'air.

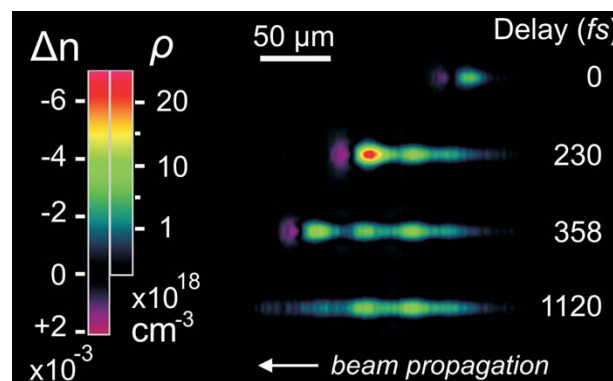


Figure 9. Evolution spatio-temporelle de l'indice de réfraction lors de la propagation non-linéaire d'une impulsion femtoseconde dans l'air [48]

On peut observer, comme nous l'avons décrit, que les variations positives d'indice de réfraction coïncident avec la position de l'impulsion et sont le résultat de l'effet Kerr.

Derrière, on peut observer une variation négative d'indice de réfraction qui indique la présence du plasma (durée de vie de l'ordre de la nanoseconde) et qui se manifeste par une traînée derrière l'impulsion.

3. Résultat obtenus sur une solution de collagène et des cornées de porcs

Je présenterai dans ce paragraphe les résultats obtenus sur une solution de collagène de type I ainsi que sur des tissus cornéens de porc, et comparer ces résultats. À notre connaissance, c'est la première fois qu'on a pu imager l'interaction non-linéaire entre un laser à impulsions ultra-courtes et le tissu cornéen. Différents auteurs et principalement Vogel et al, ont étudié les seuils de claquage optique dans l'eau, sur tissu ou solution de collagène et imagés en surface la destruction macroscopique du tissu [51-54]. Les effets chimiques et thermiques ont également été étudiés pour différentes énergies et différentes durées des impulsions. Vogel et al. ont de plus imagés la formation de bulles de cavitation dans l'eau qui suivent l'interaction laser-matière, ainsi que la dynamique du processus d'ablation notamment dans la peau. Lors de cette étude, je vais présenter les résultats obtenus pour l'interaction entre une unique impulsion et la cornée, et la comparaison avec les résultats également obtenus pour une solution de collagène grâce au dispositif d'holographie numérique pompe-sonde en ligne de l'Institut de FORTH Héraklion.

3.1 Solution de collagène

La cornée est principalement constituée de fibrilles de collagène de type I. Une solution à base de collagène de type I est donc idéale pour mimer le tissu cornéen et servir de modèle pour l'étude de l'interaction laser-tissu. Vogel [51] et Oraevsky [55,56] ont notamment montré un comportement très similaire pour ces deux matériaux lors d'interaction avec des lasers femtoseconde. Oraevsky [55] a déterminé que l'interaction est gouvernée par la formation de plasma. Nous montrons ici des conclusions similaires.

Nous avons utilisé une configuration orthogonale entre la sonde et la pompe ainsi qu'indiquée sur la figure 10.

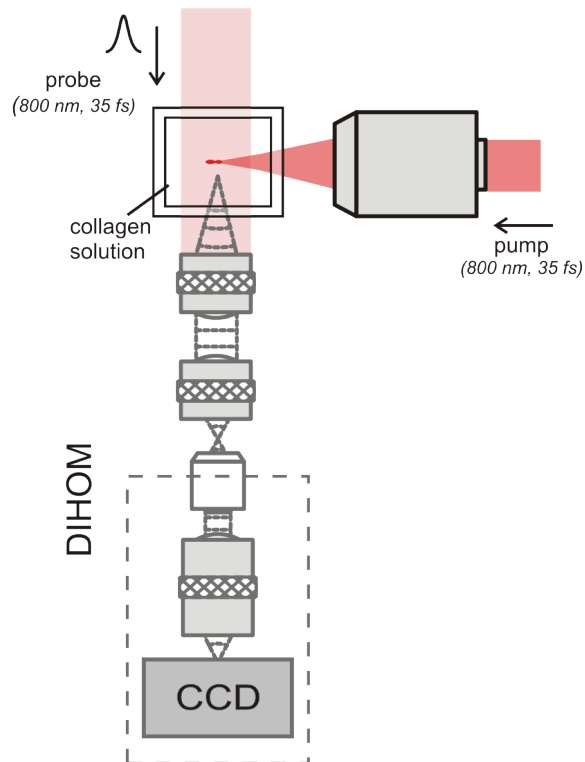


Figure 10. La pompe interagit avec la solution de collagène placée dans une cuve et la sonde se propage dans une direction orthogonale.

La solution de collagène de type I provenant de la société Sigma-Aldrich a été placée dans une cuve de verre transparente. Les images reconstruites selon la procédure indiquée dans le paragraphe 2 sont présentées à la figure 11.

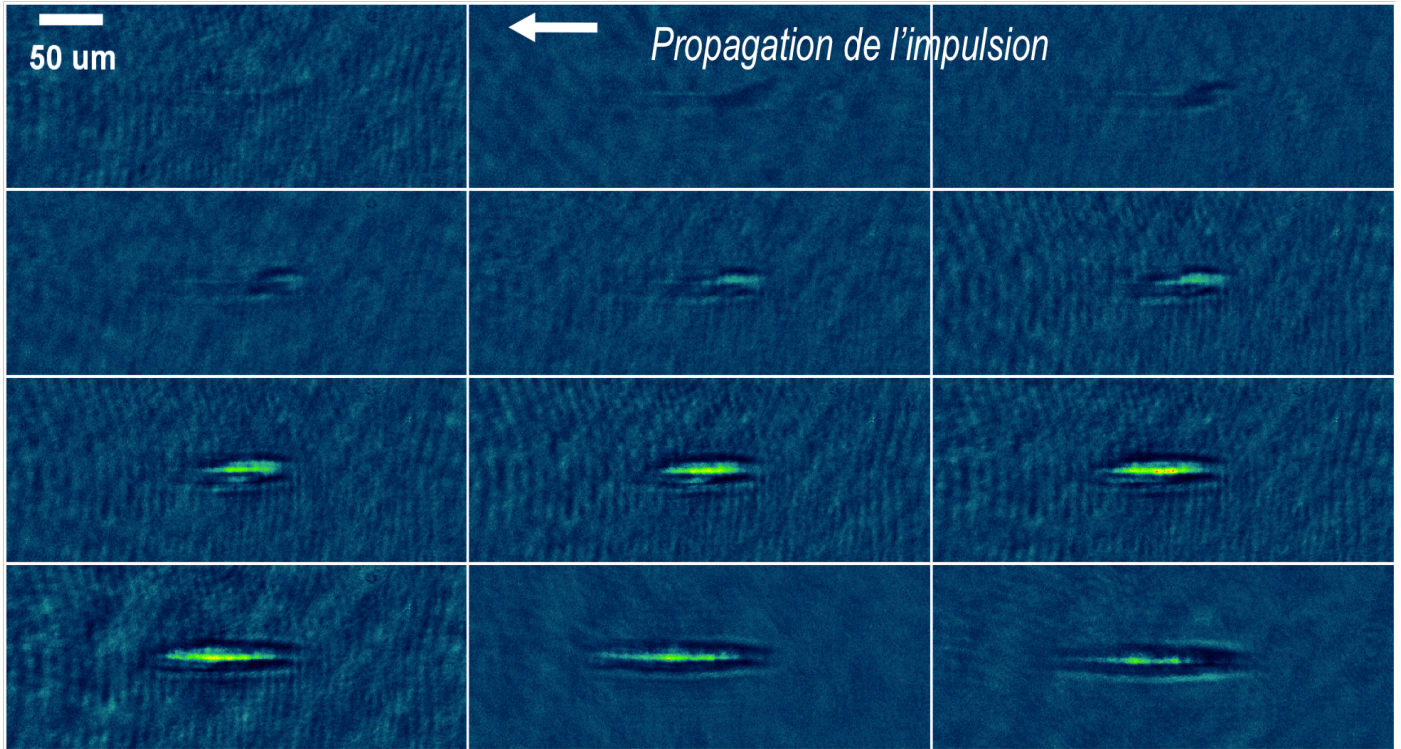


Figure 11. Amplitude reconstruite de la sonde après avoir interagi avec la région focale. Les différentes images ont été obtenues avec des délais pour la sonde de 330fs. La propagation se fait depuis l'image en haut à droite jusqu'à celle en bas à gauche tel qu'indiqué sur la figure.

Pour chaque image obtenue par délai, l'intensité a été moyennée le long de l'axe de propagation et la dynamique du signal a ainsi été obtenue. Ces mesures ont été effectuées pour des énergies de la pompe de $0,3 \mu\text{J}$ et $3 \mu\text{J}$, c'est à dire des énergies proches du seuil de claquage optique [57,58]. Le résultat obtenu est présenté à la figure 12. Les résultats pour des impulsions de $0,3 \mu\text{J}$ sont présentés par des carrés noirs. Lors de l'interaction avec le laser au temps zéro, on observe un très rapide pic correspondant à l'excitation des électrons, suivi par une relaxation plus longue de plusieurs picosecondes. On observe à 2,5 picosecondes un second pic. Un résultat similaire est obtenu pour une énergie de $3 \mu\text{J}$ avec cependant un temps de relaxation plus important. La représentation logarithmique permet de trouver un temps de relaxation proportionnel à $t^{-2.1}$ et $t^{-0.4}$ pour les énergies d'impulsions respectivement de $0,3$ et $3 \mu\text{J}$.

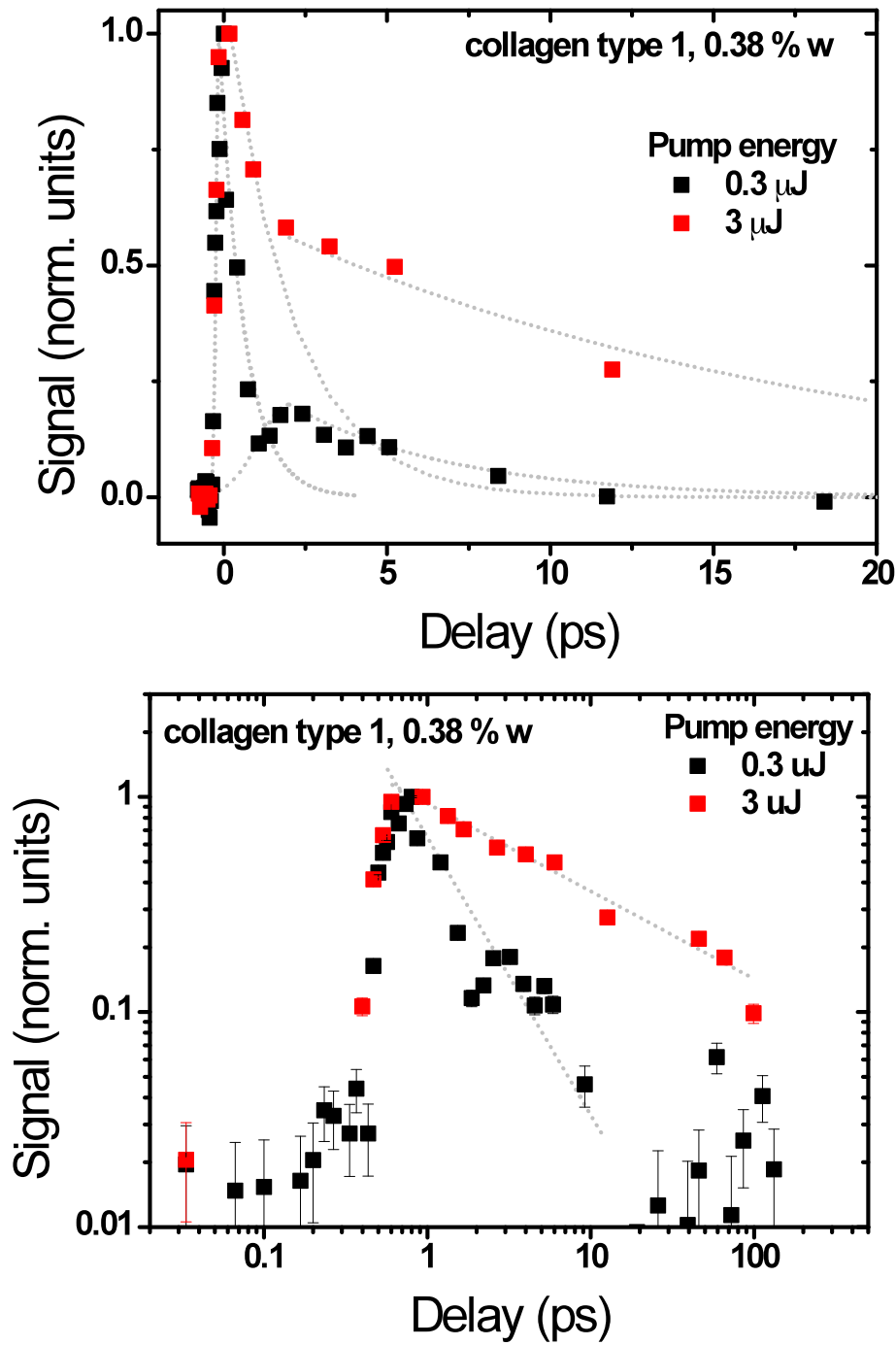


Figure 12. Profil de la dynamique temporelle obtenu pour deux énergies sur une solution de collagène de type I. En bas, la même représentation en échelle logarithmique.

À partir de la reconstruction de la phase selon la même procédure, la variation d'indice de réfraction a été calculée pour un délai proche du pic maximal d'excitation des électrons.

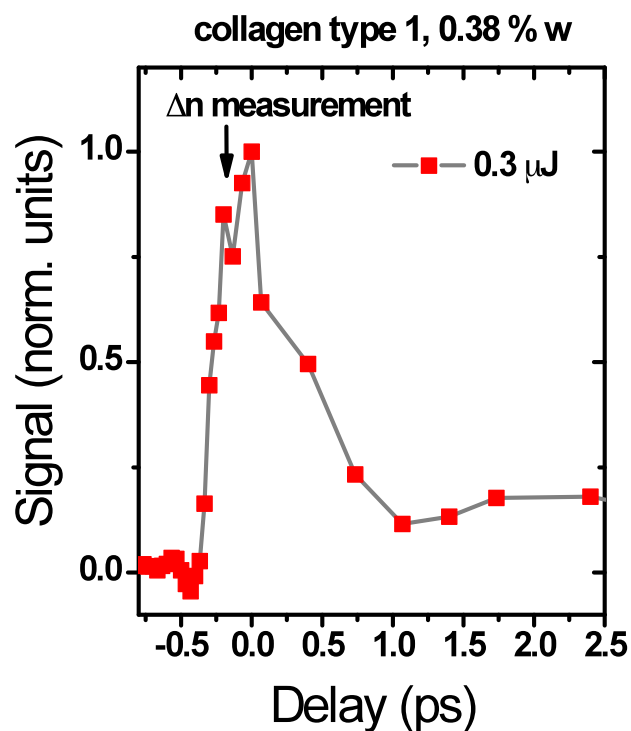


Figure 13. La mesure de la variation d'indice de réfraction a été effectuée à l'emplacement indiqué sur la figure.

Cette variation d'indice est représentée par le graphe de la figure 14.

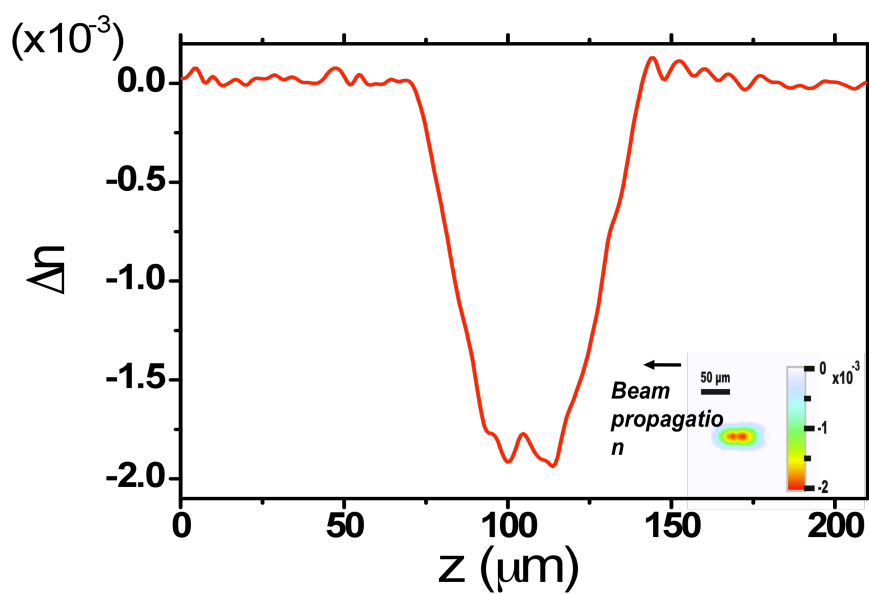


Figure 14. Variation de l'indice de réfraction au niveau du point focal tel que mesurée par le dispositif holographique.

On observe clairement une variation négative de l'indice de réfraction, ce qui correspond à l'ionisation du milieu. On a donc imagé la propagation de l'impulsion et le plasma engendré par l'interaction avec la solution de collagène.

3.2 Cornée de porc

Les cornées de porcs, par leur structure sont très proches de la cornée humaine. Elles présentent un rayon de courbure supérieur à cette dernière et une épaisseur physiologique plus importante (environ 750 μm). Les structures des cornées humaines et de porcs ont été comparées [59] dans la littérature. Les cornées de porcs sont très utiles par leur similarité pour étudier l'interaction laser plasma et très utilisées dans la littérature [55]. Elles présentent l'avantage d'être facilement disponibles. De plus nous prélevons les cornées de porcs sur les globes oculaires que nous récupérons dans des abattoirs le jour même ou l'animal a été abattu. Les yeux de porcs nous ont été fournis par l'abattoir d'Héraklion et les cornées ont été prélevées et séparées du reste de la chambre antérieure (iris, cristallin...). Elles ont été ramenées à leur épaisseur physiologique grâce à une solution de déturgescence contenant 5% de Dextran préparée selon la procédure indiquée au chapitre II. Un porte-échantillon spécialement conçu a été réalisé, et permet de maintenir le tissu cornéen entre deux lames de microscopie contenant du liquide physiologique dans les interstices. Les mesures ont été réalisées directement après le prélèvement des tissus. Le porte échantillon a été placé dans une configuration quasi-transverse selon le schéma de la figure 15.

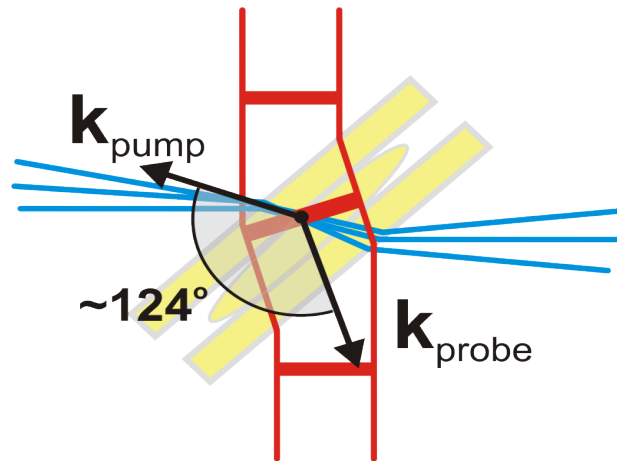


Figure 15. Le porte échantillon en jaune contenant la cornée est placé dans une configuration quasi-transverse. La pompe et la sonde forment ainsi un angle de 124 degré.

La cornée, bien que transparente macroscopiquement est un tissu diffusant. Nous avons largement évoqué ce sujet dans les chapitres précédents. Au niveau du support numérique on observe donc une figure de *speckle*. On retrouve donc l'information sur l'amplitude, mais il est plus difficile de reconstruire la phase dans de telles conditions au niveau du plan d'interaction.

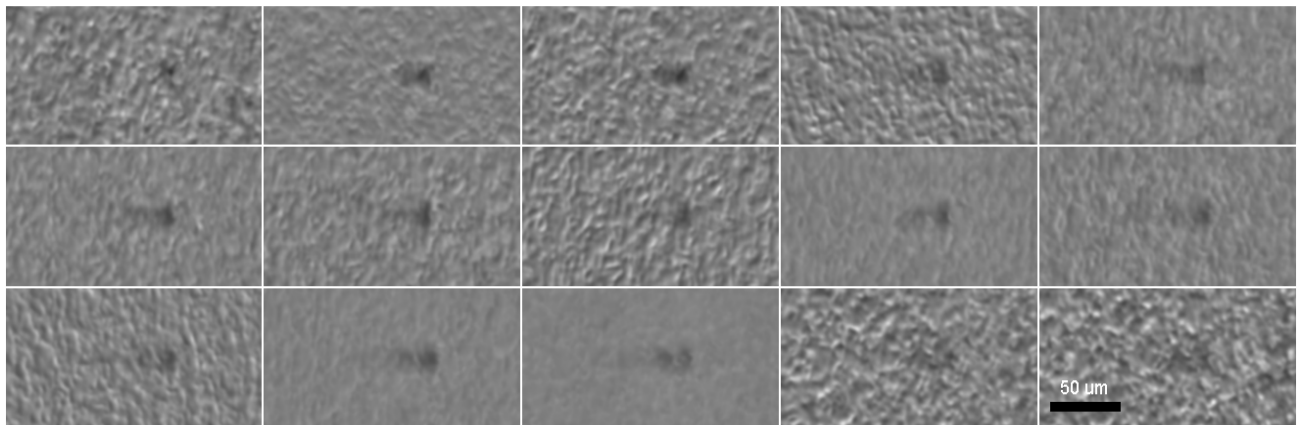


Figure 16. Propagation de l'impulsion dans la cornée pour des délais de 330fs. On remarque une figure de tavelure venant brouiller l'image. La reconstruction de la phase s'avère difficile. Au niveau de l'interaction, on observe une absorption qui se caractérise par un filament sombre.

Dans le cas du collagène, une énergie de $3\mu\text{J}$ pour la pompe a été utilisée. Le rapport signal sur bruit a été amélioré en retirant une image de référence préalablement enregistrée et en moyennant sur plusieurs images.

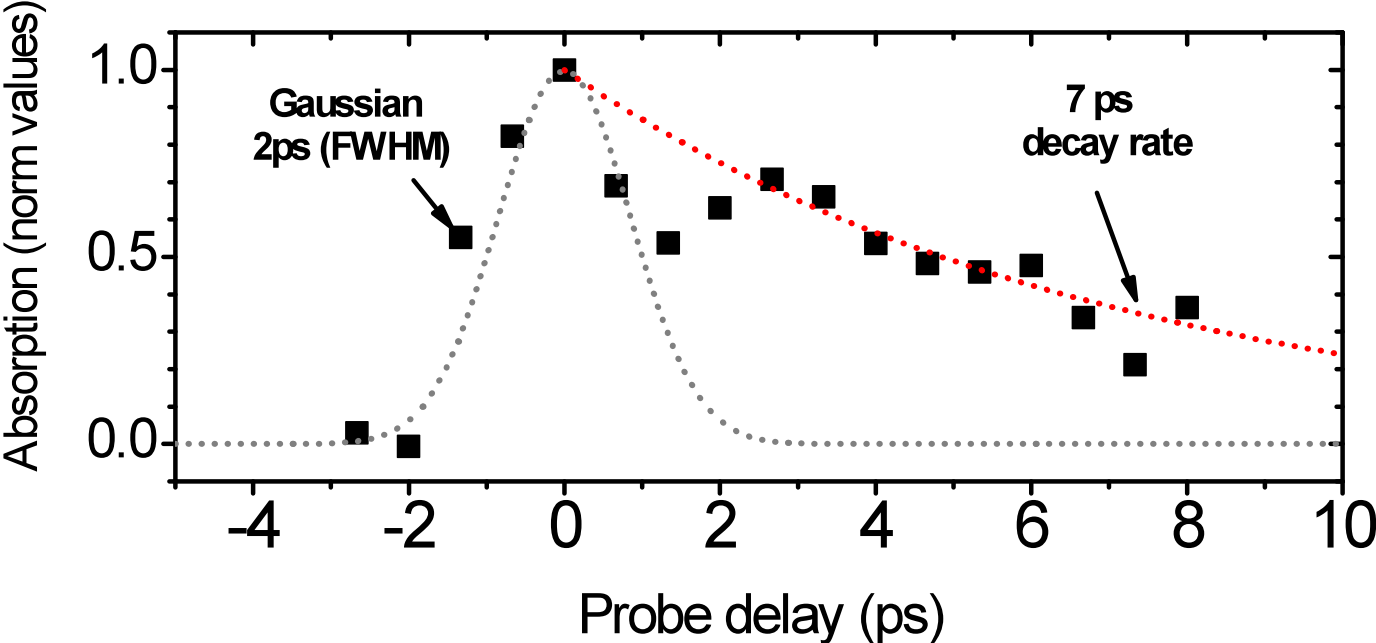


Figure 17. Profil de la dynamique de l'absorption lors de l'interaction entre la sonde et le tissu cornéen.

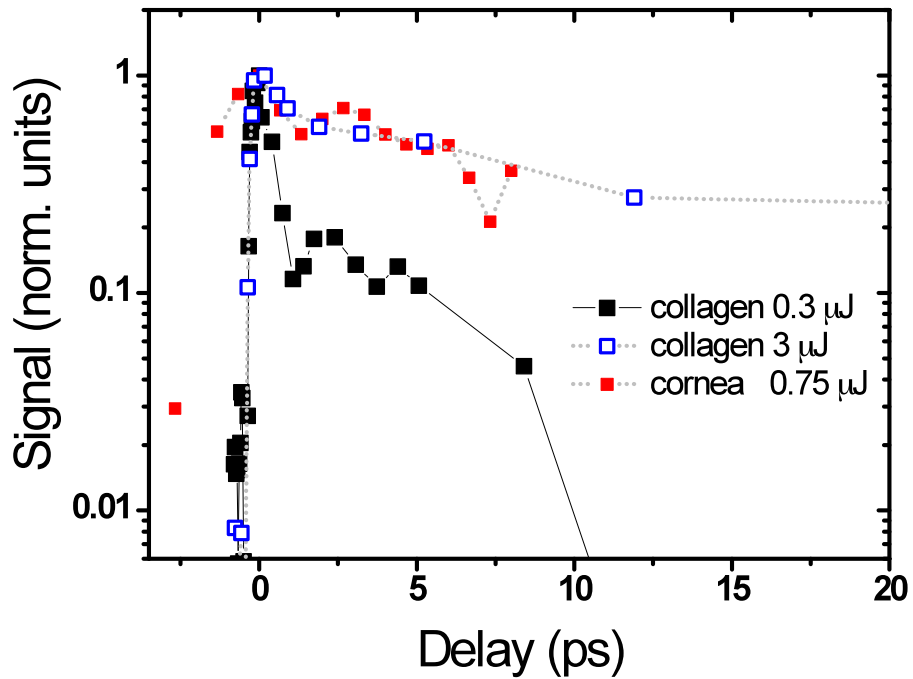
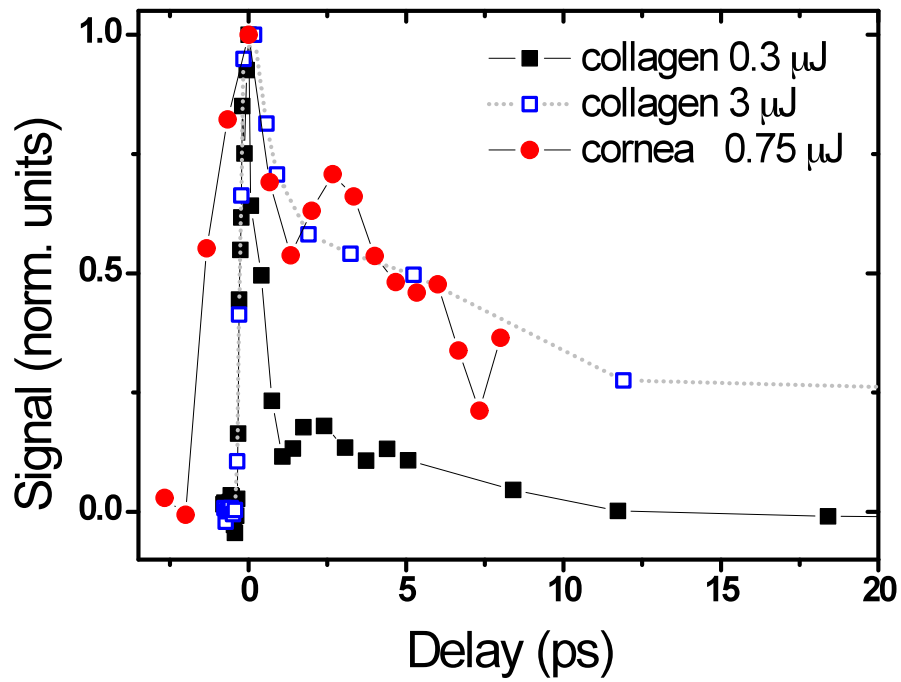


Figure 18. Profil de la dynamique temporelle obtenu pour deux énergies sur une solution de collagène de type I ainsi que pour l'accornée de porc. En bas, la même représentation en échelle logarithmique.

Dans le cas de la cornée, on observe un comportement très similaire à celui observé pour la solution de collagène, avec une dynamique comparable. On observe également un deuxième pic d'absorption à 3ps. Nous n'avons pas trouvé d'explication satisfaisante pour

ce phénomène qui semble toutefois se conformer dans le cas de la cornée, comme dans celui du collagène. On attribue donc ce comportement à la présence du collagène. La nature diffusante du tissu ne semble pas avoir modifié de façon importante la propagation de l'impulsion, et nous observons des filamentations de dimensions similaires dans les deux cas. Si nous ne sommes pas en mesure de reconstruire la phase dans le cas de la cornée, on peut supposer qu'elle se comporte au vu des résultats, d'une façon très similaire et lui attribuer une variation négative due à l'ionisation de la matière. Des mesures supplémentaires ont été effectuées dans une configuration colinéaire pour la sonde et la pompe et les résultats sont présentés en annexes. Ils présentent toutefois des artéfacts de mesure dues à des effets d'interférences entre la sonde et la pompe qui sont issues de la même source.

4. Conclusion

Nous avons dans ce chapitre revu les phénomènes importants liés à l'interaction entre un laser femtoseconde et le tissu. Un dispositif d'holographie numérique en ligne pompe sonde a été utilisé pour imager la propagation d'une impulsion unique dans une solution de collagène ainsi que dans la cornée de porc. Les dynamiques de propagation de l'impulsion sont extrêmement similaires dans les deux cas. Pour la première fois à notre connaissance, de telles mesures ont été réalisées sur le tissu cornéen. De plus cette étude permet de confirmer la solution de collagène comme un très bon modèle pour étudier l'interaction laser-cornée. Cette étude offre des perspectives très intéressantes pour l'étude de l'interaction laser-cornée. En s'affranchissant des problèmes de diffusion, et en reconstruisant la phase, on obtiendra une information complète qui permettra de modéliser et mesurer la propagation de l'impulsion dans la cornée avec une grande précision.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Plamann K et al. 2010, "Ultrashort pulse laser surgery of the cornea and the sclera" J Opt12 084002
- [2] R. R. Gattass and E. Mazur. Femtosecond laser micromachining in transparent materials. Nature Photonics, 2 :219 – 225, 2008.
- [3] M. Sakakura, M. Terazima, Y. Shimotsuma, Miura, K., and K. Hirao. Observation of pressure wave generated by focusing a femtosecond laser pulse inside a glass. Optics Express, 15 :5674 – 5686, 2007.
- [4] M. Sakakura and M. Terazima. Initial temporal and spatial changes of the refractive index induced by focused femtosecond pulsed laser irradiation inside a glass. Physical Review B, 71 :024113, 2005.
- [4] Kennedy PK 1995 IEEE J. Quantum Electron.31 2241-49
- [5] Liu W, Kosareva O, Golubtsov IS, Iwasaki A, Becker A, Kandidov VP and Chin SL, 2003 ApplPhys B76 215-29 [94] Kolesik M, Katona G, Moloney JV and Wright EM 2003 Phys Rev Lett91 043905
- [6] Arnold CI, Heisterkamp A, Ertmer W and Lubatschowski H 2005 Apply Phys B80 247-53
- [7] Couairon A, Sudrie L, Franco M, Prade B and Mysyrowicz A 2005 Phys Rev B71 125435
- [8] Williams F, Varma SP and Hillenius S 1976 J ChemPhys 64 1549-54
- [9] Vogel A, Noack J, Huttman G and Paltauf G 2005 ApplPhys B81 1015-47
- [10] De Michelis C 1969 IEEE J Quantum Electron5 188-202
- [11] Bloembergen N 1974 IEEE J Quantum Electron 10 375-86
- [12] Stuart BC, Feirt MD, Rubenchik AM, Shore B and Perry MD 1995 Phys Rev Lett74 2248-2251
- [13] Quere F, Guizard S and Martin P, 2001, EurophysLett. 56 138-44
- [14] Keldysh LV 1965 SovPhysJEPT20 1307-14
- [15] Rethfeld B 2004, Phys Rev Lett 92 147401
- [16] Rethfeld B 2006, Phys Rev B 73 035101

- [17] Arnold CL, Heisterkamp A, Ertmer W and Lubatschowski H, 2007 Opt Express15 10303-17
- [18] Arnold CL, Heisterkamp A and Lubatschowski H, 2009 J L M N4 39-44
- [19] Couairon A and Mysyrovicz A, "Femtosecond filamentation in transparent media", 2007 Physics Reports441 47-189
- [20] Maatz G, Heisterkamp A, Lubatschowki H, Barcikowski S, Fallnich C, Welling H and Ertmer W, 2000 J Opt A2 59-64
- [21] R. Boyd, *Nonlinear optics* (Academic Press, San Diego, 2003).
- [22] G. P. Agrawal, *Nonlinear fiber optics* (Academic Press, San Diego, 1995).
- [23] M. Centurion. Study of the non linear propagation of femtosecond laser pulses. Thesis, Caltech, 2005.
- [24] Ilkov FA, Ilkova LS and Chin SL, 1993 Opt Lett18 681-3
- [25] Nguyen NT, Salimia A, Liu W, Chin SL and Vallée R, 2003 Opt Lett28 1591-3
- [26] Ashcom JB, Gattass RR, Schaffer CB and Mazure E 2006 Opt Express23 2317-22
- [27] Heisterkamp A, Ripken T, Mamon T, Drommer W, Welling H, Ertmer W and Lubaschowki H, 2002 ApplPhys B74 419-25
- [28] Bukarov IM, Bulgakova NM, Stoian R, Mermillod-Blondin A, Audouard E, Rosenfeld
- [29] A. Braun, G. Korn, X. Liu, et al., Optics Letters **20**, 73 (1995).
- [30] A. Couairon, S. Tzortzakis, L. Berge, et al., Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics **19**, 1117 (2002).
- [31] A. Piekara, IEEE Journal of Quantum Electronics **QE 2**, 249 (1966).
- [32] Stuart BC, Fait MD, Herman S, Rubenchik AM, Shore BZ and Perry MD, 1996 Phys Rev B 53 1749-61
- [33] Du D, Liu X, Korn G, Suier J and Mourou G, 1994 ApplPhysLett64 9071-3
- [34] Loesel FH, Niemz JF, Bille MH and Juhasz T, 1996 IEEE J Quantum Electron 32 1717-22
- [35] Lenzner M, Krüger J, Sartania S, Cheng Z, Spielmann C, Mourou G, Kautek W and Krausz F, 1998 Phys Rev Lett80 4076-9
- [36] Tien AC, Backus S, Kapteyn H, Murnane M and Mourou G, 1999 Phys Rev Lett82 3883-6
- [37] Kim BMn Fait MD, Rubenchik AM, Joslin E, Celliers PM, Eichler J and Da Silva LB, 2001 J Biomed Opt 6 332-8
- [38] Jia TQ, Xu ZZ, Li XX, Li RX, Suai B and Zhai FL, 2003 ApplPhysLett82 4382-4

- [39] Giguère D, Olivié G, Vidal F, Toetsch S, Girard G, Ozaki T, Kieffer JC, Nada O and Brunette I, 2007 *J Opt Soc Am A* 24 1562-8
- [40] Sun H, Han M, Niemz MH and Bille JF, 2007 *Lasers in surgery and medicine* 39 654-8
- [41] Vogel A, Linz N, Freidank S and Paltauf G, 2008 *Phys Rev Lett* 100 038102
- [42] Olivié G, Giguère D, Vidal F, Ozaki T, Kieffer JC, Nada O and Brunette I, 2008 *Opt Express* 16 4121-9
- [43] J. P. Gordon, *Optics Letters* **8**, 596 (1983).
- [44] G. I. Stegeman and M. Segev, *Science* **286**, 1518 (1999).
- [45] R. L. Fork, C. V. Shank, C. Hirlimann, et al., *Optics Letters* **8**, 1 (1983).
- [46] H. Schroeder and S. L. Chin, *Optics Communications* **234**, 399 (2004).
- [47] M. Fujimoto, S. Aoshima, M. Hosoda, et al., *Optics Letters* **24**, 850 (1999).
- [48] D.G. Papazoglou et al, *Appl. Phys. Lett.*, 93, 041120 (2008)
- [49] D. Abdollahpour, et al. *Phys. Rev. A* 84, 053809 (2011)
- [50] D.G. Papazoglou et al , In-line holography for the 3D reconstruction of laser pulse filamentation in transparent media 2008 OSA / CLEO/QELS 2008
- [51] A. Vogel and V. Venugopalan, *Chem. Rev.* 2003, 103, 577–644
- [52] Vogel A, Linz N, Freidank S, Paltauf. *Phys. Rev. Lett.* 100: 038102
- [53] Vogel A, Noack J, Hüttmann G, Linz N, Freidank S, Paltauf G *Nanobiophotonics Science and Technology, Proc. 3rd Internat. Nanophotonics Symposium Handai, Osaka University, 06. – 08. July 2006, Osaka, Japan, Elsevier, 273-286*
- [54] Vogel A, Noack J, Hüttmann G, Paltauf G. In: Phipps C (ed.) *Laser Ablation*, Springer, Heidelberg, 217-262
- [55] Alexander A. Oraevsky, Luiz B. Da Silva, *Member, IEEE*, Alexander M. Rubenchik, Michael D. Feit, M. E. Glinsky, Michael D. Perry, Beth M. Mammini, Ward Small, IV, and Brent C. Stuart. *IEEE Journal of selected topics in quantum electronics*, VOL. 2, NO. 4, Dec. 1996
- [56] A. A. Oraevsky, S. L. Jacques, R. O. Esenaliev, and F. K. Tittel, *Lasers Surg. Med.*, vol. 18, pp. 231–240, 1996.
- [57] Florent Deloison, Thèse, Ecole Polytechnique, 2010.
- [58] Caroline Crotti, Thèse, Ecole Polytechnique, 2011.
- [59] J M. Bueno, E J. Gualda, and P Artal, *Cornea* Volume 30, Number 6, June 2011

Conclusion

La cornée humaine est un fascinant tissu de par sa structure et ses propriétés optiques. À l'état physiologique, les fibrilles de collagène la composent, et dont le diamètre mesure une trentaine de nanomètres, s'organisent naturellement de manière à présenter un certain ordre local. Cet ordre est responsable d'un effet collectif d'interférences constructives lors de la traversée d'un faisceau lumineux. On explique ainsi la transparence du tissu cornéen. Lorsque cette transparence est altérée, la qualité de la vision est altérée en conséquence. Cela arrive lorsqu'un œdème se crée dans le tissu. La plupart du temps cela est dû à un dysfonctionnement de l'endothélium, couche monocellulaire responsable du maintien d'un niveau d'hydratation normal de la cornée, et donc du maintien de sa transparence. L'objectif essentiel de cette thèse était d'approfondir les connaissances de l'optique de la cornée. À cette fin, les réalisations suivantes ont été faites :

- Une étude de l'évolution de l'ultrastructure du tissu cornéen en fonction de son état d'hydratation a été réalisée par Tomographie à Cohérence Optique (OCT)²⁹, ainsi que par microscope électronique à transmission (TEM) et image de coupes histologiques³⁰. On a constaté la perturbation progressive de l'ordre des fibrilles de collagène avec l'épaisseur du tissu cornéen, et l'apparition de structures micrométriques dénuées de collagène et appelées « lacs » pour les tissus œdémateux.
- La figure de diffusion de la cornée à différents états d'œdème a été mesurée pour différentes longueurs d'onde¹. Ces mesures ont montré l'existence d'une forte corrélation entre le niveau de diffusion d'une cornée et son épaisseur. Pour les épaisseurs proches de l'épaisseur physiologique, une forte dépendance à la longueur d'onde est observée.
- Un nouveau dispositif de mesure de l'intensité mutuelle par holographie numérique a été conçu et monté pendant cette thèse. Le dispositif a été utilisé afin de mesurer la perturbation du front d'onde lors de la traversée du

²⁹ Collaboration avec l'Institut Fresnel de Marseille.

³⁰ Collaboration avec l'hôpital Hôtel-Dieu de Paris

tissu sain et œdémateux et calculer la perte de cohérence associée à cette perturbation. La perte de cohérence est corrélée à l'épaisseur de la cornée. On observe, lorsqu'on approche de l'épaisseur physiologique de la cornée, une augmentation plus prononcée de la cohérence spatiale du faisceau traversant le tissu.

Les résultats obtenus par ces différentes techniques sont complémentaires et cohérents. Ils montrent clairement l'existence de deux modes de diffusions au sein de la cornée. L'un des modes de diffusion est dû aux fibrilles de collagènes, dont l'ordre détermine le facteur de structure modulant la section efficace de diffusion. Ce mode de diffusion existe principalement dans les cornées proches de l'épaisseur physiologique. La diffusion augmente avec la perturbation de l'ordre des fibrilles. L'apparition de nouvelles structures micrométriques mises en évidence par les différentes techniques d'imageries est à l'origine d'un autre mode de diffusion peu dépendant à la longueur d'onde et qui est dominant dans le cas des cornées œdémateuses (à partir de 700 à 800 μm). La cohérence spatiale du champ diffusé vers l'avant est moins fortement perturbée par la présence de lacs. L'intensité mutuelle du champ diffusé par une cornée mince est elle-même réduite de manière importante par rapport à celle d'un champ non diffusé. Cela corrobore également l'existence d'un ordre local et non cristallin des fibrilles de collagène dans la cornée. En effet, le vecteur de diffusion interagit avec la distribution spatiale des fibrilles de collagène dans le plan de Fourier. L'ensemble de ces résultats permet de mieux comprendre les différents processus de diffusion ayant lieu dans le tissu clair et œdémateux et présente une avancée importante dans l'état de l'art de l'optique du tissu cornéen. Avec le développement de la nouvelle technique de mesure de l'intensité mutuelle par holographie numérique, j'ai proposé l'idée de la réalisation d'un système holographique adapté sur le microscope du laboratoire³¹ pour l'étude de l'endothélium, responsable essentiel de la transparence et de la perte de transparence du tissu cornéen. Le dispositif pourrait fonctionner sur la base d'une onde à cohérence réduite, ce qui permettrait de réaliser des coupes tomographiques du tissu et l'observation de l'apparition des microstructures évoquées. L'optique du tissu en champ proche pourrait ainsi compléter les résultats et les avancées obtenus par ce travail de thèse. Cette idée a été retenue pour la réalisation d'un projet postdoctoral qui impliquera le laboratoire

³¹ Voir Annexe A pour la description du microscope.

d'Optique et Biosciences (LOB) de l'École Polytechnique et devra débiter au début de l'année 2013.

En plus de cette étude sur l'optique du tissu, une autre a été menée sur l'interaction laser-tissu en collaboration avec l'Institut de FORTH à Héraklion en Grèce. Un dispositif d'holographie numérique pompe-sonde a été utilisé afin d'imager la propagation d'une impulsion unique dans la cornée de porc. Les résultats obtenus sont très proches de ceux également réalisés sur une solution de collagène de type 1. La variation d'indice de réfraction due aux effets d'interaction non-linéaire a pu être mesurée sur une solution de collagène. Cette variation indique la présence de plasma créé par l'interaction avec le laser. On peut conclure à un résultat similaire dans la cornée. C'est à notre connaissance la première fois que la propagation d'une impulsion unique est imagée dans le volume du tissu. La communauté scientifique s'intéressant aux interactions laser-tissu fait effectivement souvent référence aux expériences réalisées dans l'eau dont les propriétés d'ionisations restent très différentes de celles de la cornée. Ces résultats très prometteurs et originaux ouvrent de nouvelles perspectives pour l'étude de l'interaction laser-tissu.

ANNEXE A: Développement d'un dispositif industriel pour la caractérisation optique des greffons de cornée³²

Ce projet a été réalisé dans le cadre d'un financement ASTRE³³ du conseil général de l'Essonne et de la DRIP³⁴ de l'École Polytechnique. Le projet³⁵ a été mené durant la première année de cette thèse. Il visait à la conception et au montage d'un prototype industriel mesurant et classant la transparence de greffons de cornée. Le principe de mesure de transparence est basé sur l'analyse numérique de l'image d'une mire centro-symétrique projetée à travers un greffon de cornée et utilise un algorithme breveté par l'équipe pilote³⁶. Ce travail se situe dans la continuation de travaux préliminaires précédents au sein du groupe³⁷. Les principales étapes et résultats du projet sont les suivants :

- *Un dispositif optique de laboratoire a d'abord été monté, permettant de tester la pertinence de l'approche choisie.*
- *Un porte échantillon avec mire intégrée a été développé pour les greffons de cornée. Ce porte-échantillon s'adapte directement à un « macroscope » - un instrument optique couramment utilisé dans les laboratoires des banques des yeux.*
- *Nous avons développé et testé un logiciel basé sur l'algorithme breveté qui permet la détermination de la fonction de transfert de modulation (MTF, Modulation Transfer Function). L'intégrale sur la MTF représente une métrique qui est monotone avec la transparence des greffons et qui permet donc de quantifier leur transparence et de les classer en fonction de leur qualité.*
- *Une série de mesures sur des cornées préparées dans différents états de transparence a confirmé la validité de notre méthode : les mesures optiques et leur analyse numérique fournissent des valeurs reproductibles qui sont en accord avec les*

³² Cette annexe est inspirée du rapport que j'ai rédigé à la fin du projet ASTRE-DISCO : « Développement d'un dispositif Industriel pour la Caractérisation Optique de greffons de cornée (DISCO) », avril 2011.

³³ ASTRE : Action de Soutien à la Technologie et à la Recherche en Essonne

³⁴ Directions des Relations Industrielles et des Partenariats

³⁵ Coodonné par Karsten Plamann, en partenariat avec la banque française des yeux et la société Imagine Eyes

³⁶ « Dispositif et procédé de mesure optique de transmission et de diffusion de milieux oculaires » ; K. Plamann, F. Aptel, C. Crotti, F. Deloison, D. Peyrot, 2008 n° de priorité FR080056011, la procédure d'extension à l'étranger est en cours

³⁷ Master de Caroline Crotti, Caractérisation des tissus et Mise en place d'un nouveau dispositif expérimental pour la chirurgie oculaire

résultats de nos analyses de laboratoire et qui permettent le classement des greffons de cornée en fonction de leur transparence.

1. Contexte

La greffe de cornée (kératoplastie) consiste à remplacer la totalité ou une partie de la cornée malade d'un patient vivant par un greffon de cornée saine prélevé d'une personne décédée. La kératoplastie permet à un patient dont la vision a été réduite suite à une opacification ou une déformation de la cornée de retrouver une bonne vision. Le taux de succès de cette intervention est supérieur à 85%.

Il existe un certain nombre de pathologies de la cornée pouvant amener à une indication de greffe de Kératoplastie. Les plus fréquentes d'entre elles sont la dystrophie après chirurgie de la cataracte (32% des cas), le kératocône (23%), la dystrophie de Fuchs (14%), la regreffe (9%), la kératite herpétique (9%) et la cicatrice post-traumatique (5%).

Un nombre important de greffes de cornée (environ 80 000) est effectué chaque année en Europe et aux États-Unis. Des contrôles rigoureux et répondant à certains critères précis permettent de s'assurer de la bonne qualité du greffon ainsi que de son innocuité vis à vis du futur receveur. Ainsi, un grand nombre de cornées prélevées sur des personnes décédées seront écartées à la suite de ces contrôles et seul un petit nombre d'entre elles pourront finalement être greffées (entre 30 et 50 %).

Le greffon suit différentes étapes depuis l'instant où il est prélevé jusqu'à son implantation sur le receveur. D'abord, un disque cornéen est prélevé sur un diamètre de 11 mm. Celui-ci est ensuite conservé par la banque des yeux dans un flacon de liquide de conservation stérile qui est placé dans une étuve à 31 degrés³⁸. Une série de contrôles bactériologiques et sérologiques s'ensuit. Enfin, un contrôle de la qualité du greffon s'ensuit. Celui-ci consiste au contrôle du nombre de cellules endothéliales (cellules de la face interne de la corné) qui contrôlent l'hydratation du stroma. Pour que cette hydratation soit suffisante et que l'endothélium soit en mesure de jouer son rôle

³⁸ Selon le standard européen de conservation.

physiologique après la greffe, il est nécessaire que la cornée possède une densité minimale de ces cellules. La règle fixée par la banque des yeux est que ce nombre de cellules endothéliales, afin qu'une cornée puisse être considérée apte pour la greffe, doit être supérieur à 2000 cellules par millimètre carré. Le processus de comptage cellulaire se fait à la banque des yeux. Le deuxième contrôle de la qualité du greffon est celui qui nous a amené à travailler sur ce projet. Il consiste à évaluer la transparence macroscopique de la cornée. Ce contrôle à ce jour est effectué de manière subjective par un technicien de banque. C'est à ce niveau qu'intervient notre projet qui consiste à offrir aux banques des yeux un moyen objectif et quantitatif pour évaluer rapidement et simplement la qualité de transparence d'un greffon cornéen.

2. Principe de la mesure

Le principe de la mesure est simple et c'est cette simplicité qui nous a permis de combiner une recherche scientifique importante avec un dispositif qui soit utilisable en routine par les banques des yeux et par les chirurgiens.

L'idée consiste à placer la cornée sur une mire de Siemens centro-symétrique et de prendre une image à l'aide d'une caméra. L'image est ensuite traitée informatiquement par un algorithme breveté et la fonction de transfert de modulation (MTF) de celle-ci est calculée. Le projet a été initié en 2008 dans le cadre du projet de Master de Caroline Crotti³⁹. Le dispositif initial consistait en une diode électroluminescente éclairant la cornée à travers une mire centrosymétrique. Le projet ASTRE-DISCO a consisté à faire évoluer ce dispositif de façon à l'adapter au matériel couramment utilisé dans les banques des yeux. Le dispositif comporte trois composants : un microscope (nous expliciterons cela plus loin), un logiciel de traitement d'image, et un porte-échantillon.

2.1 Le microscope

Pour l'implémentation de la méthode de mesure de transparence des greffons de cornées, nous avons choisi de nous baser sur l'instrumentation optique typiquement disponible dans les banques des yeux. La tendance actuelle est le remplacement des

³⁹ Master de Caroline Crotti, École Polytechnique.

loupes et microscopes précédemment utilisés par des « macrosopes, » c'est-à-dire d'un microscope permettant d'observer un objet en agrandissement microscopique en en agrandissement de loupe. Cela permet aux banques des yeux à la fois d'observer la cornée dans son état général, et d'opérer un agrandissement leur permettant d'observer les cellules endothéliales et d'effectuer un comptage cellulaire. Le financement ASTRE nous a permis de faire l'acquisition d'un macroscope AZ100 de la société NIKON du même type que ceux qu'on peut trouver chez nos partenaires et dans d'autres banques des yeux. Le macroscope est muni d'une caméra couleur à haute résolution, d'un logiciel d'analyse d'image et de différents objectifs permettant d'obtenir l'agrandissement adéquat. Cet instrument est montré sur la figure 1.



Figure 1. Macroscope servant aux prises d'images durant les expériences du projet ASTRE (AZ100 NIKON).

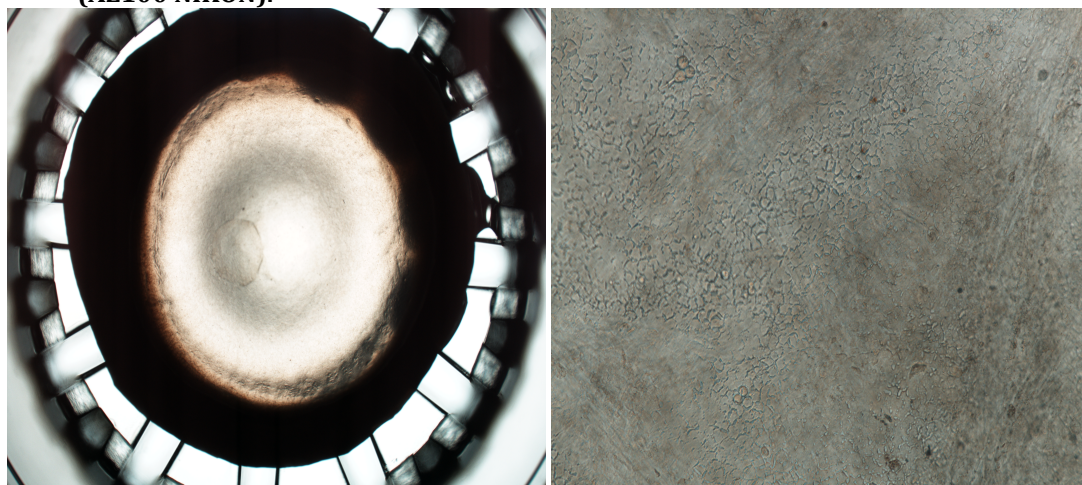


Figure 2. Cornée placée sur support stérile et observée sous un microscope (a). L'image (b), obtenue pour un plus fort grossissement permet d'observer les cellules de l'endothélium. Un traitement d'image permet le comptage cellulaire.

La figure 2 illustre le large champ de grossissement que permet un microscope. On peut observer avec le même instrument une image macroscopique de la cornée posée sur un porte-échantillon de banque (figure 2a), et les cellules endothéliales présentent sur la face interne du tissu (figure 2b).

2.3 Le porte-échantillon

Un porte-échantillon a été développé au cours de ce projet (figure 3). Celui-ci est adapté à recevoir un greffon de cornée ainsi que du sérum physiologique. Il permet en outre de garder un milieu stérile. Il vient se clipper sur une mire centro-symétrique de Siemens de telle sorte que celle-ci soit centrée sur la cornée. Le porte-échantillon, ainsi que la cornée peut alors se placer sous l'objectif du microscope pour une prise d'image. Le porte-échantillon a été conçu de manière à limiter au maximum les aberrations optiques lors de la prise de mesure.

Le porte-échantillon pourra alors recueillir la cornée pour conservation en se détachant de la mire, et ainsi remplacer les porte-échantillons actuellement commercialisés. Nous sommes actuellement en train d'étudier les possibilités d'une production industrielle. Le dispositif pourrait être intégré au flacon de conservation du tissu.



Figure 3. Porte-échantillon contenant la mire centrosymétrique dans lequel on vient placer la cornée face endothéliale vers le haut. Le tout est placé en dessous du microscope.

Le porte-échantillon est rempli de sérum physiologique lors de la mesure. L'image est ensuite comparée avec celle de la mire seule qui constitue l'image de calibration de la

mesure. Ce porte échantillon peut servir de modèle à un porte-échantillon à usage unique qui pourrait être commercialisé et facilement utilisé par les banques des yeux.

2.3 Le logiciel et le principe de mesure de la MTF

Le groupe OPS⁴⁰ a développé un logiciel informatique dont l'algorithme a fait l'objet d'un brevet (« dispositif et procédé de mesure optique de transmission et de diffusion de milieux oculaires », Numéro de priorité : FR080056001, extension à l'étranger en cours) qui a été à l'origine de ce projet ASTRE-DISCO. Le logiciel traite les images effectuées au cours des expériences et offre la courbe de fonction de transfert de modulation (MTF, *Modulation Transfer Function*) de celles-ci. En normalisant ces courbes de MTF par rapport à celle obtenue à partir d'une image de référence enregistrée sans cornée il est possible d'évaluer de façon fine le niveau de transparence d'une cornée et d'en faire une analyse quantitative. Le logiciel a été développé sur la base des langages de programmation *Matlab* et *Labview*. Il sera possible pour les banques des yeux de discriminer les cornées en fonction de leur niveau de transparence à partir d'un seuil qui reste à fixer. On peut voir sur la figure 5 l'interface du logiciel avec les courbes de MTF. Celui-ci restitue également l'aire sous la courbe de chaque MTF, qui représente une métrique quantitative pour la transparence de la cornée. Plus cette aire sera importante, plus le niveau de transparence de la cornée le sera également. Le logiciel a été conçu de façon à le rendre ergonomique et avec une prise en main simple et intuitive pour l'utilisateur non spécialiste. Le logiciel traite l'image enregistrée d'une mire centrosymétrique de Siemens imagé à travers le tissu cornéen (figure 4).

⁴⁰ Plus particulièrement l'ingénieur informatique du groupe : Fatima Alahyane ayabt développé le logiciel basé sur l'algorithme référencé à la note 4.



Figure 4. Mire de Siemmens circulaire à 36 traits observée sous le microscope.

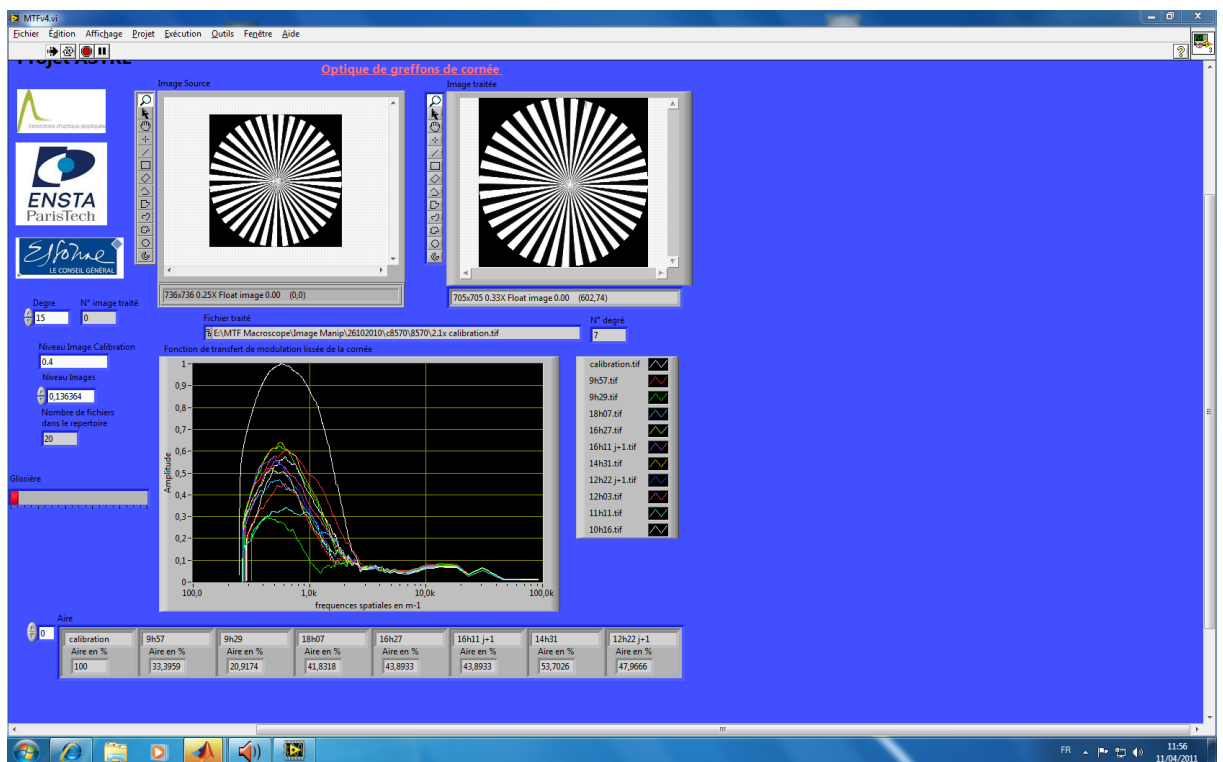


Figure 5. Interface utilisateur du logiciel de mesure de transparence développé par l'ingénieur de l'équipe pilote.

Le principe de calcul de la MTF par le logiciel est relativement simple. Les images du porte échantillon contenant la cornée sont générées après la prise de l'image de calibration de la mire seule. Il existe plusieurs phases de traitement des images créées. La première consiste à dérouler la mire circulaire. Une matrice initialement (X, Y) est transformée en

une matrice (r,θ) où r est le rayon pris au centre de la mire. Le rayon r est ensuite traduit en fréquences spatiales et on obtient une matrice (ν,θ) . Cette transformation se fait par la relation : $\nu = \frac{N}{G2\pi r}$. G est un facteur multiplicatif lié aux optiques du microscope. L'échantillonnage utilisé par le microscope pour l'ensemble des mesures réalisées correspond à $10,83 \mu\text{m}/\text{pixel}$. Le procédé est schématisé à la figure 6.

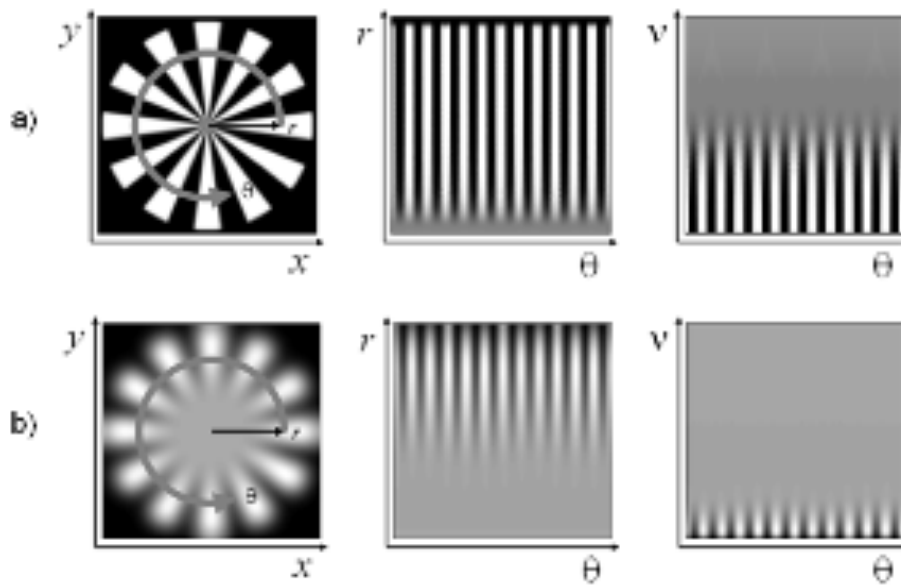


Figure 6. Déroulement de la mire et transformation de celle-ci en une matrice (r,θ) , puis (ν,θ) pour une image nette (a) et floue (b) [1].

L'étape suivante du traitement informatique consiste à réaliser une transformée de Fourier de la matrice (ν,θ) , ce qui fait apparaître la fréquence fondamentale ω_0 correspondant au nombre de traits de la mire. Les harmoniques correspondant à $(N+1) \omega_0$ peuvent également être observées (figure 7).

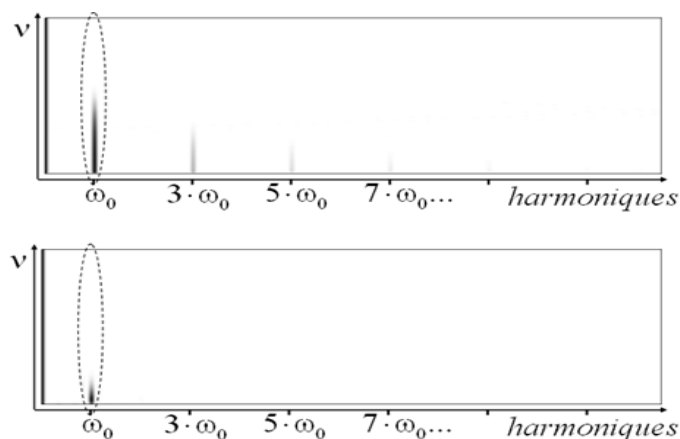


Figure 7. Composantes de Fourier pour des images de mires nettes (haut) et floues (bas).

Enfin, le profil du signal est tracé pour la fréquence ω_0 . On obtient l'équivalent de la MTF en fonction de la fréquence spatiale. Les courbes sont ensuite normalisées.

3. Résultats sur des échantillons de cornées.

La figure 8 représente des images de cornées de différentes épaisseurs insérées dans le porte échantillons. Les images sont réalisées avec un grossissement X5.

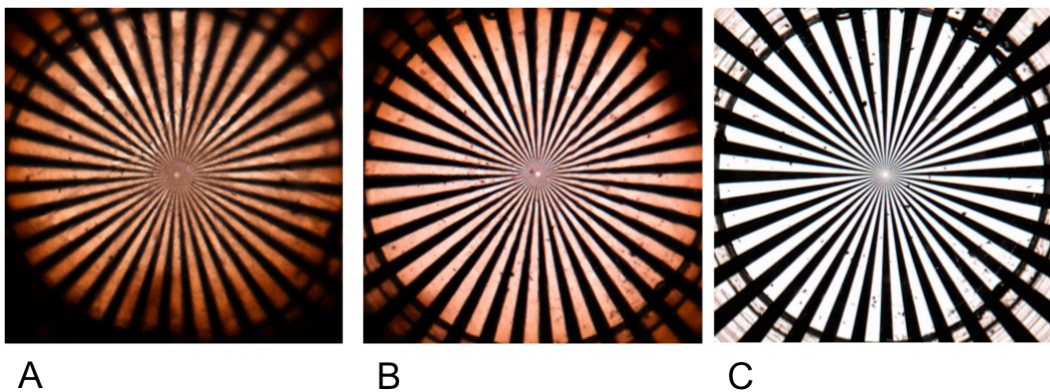


Figure 8. Cornées placées dans le porte-échantillon et imagées par le microscope. On a une cornée oédémateuse (A), claire (B), et une image de référence sont cornée (C).

Les courbes de MTF d'une cornée à différents stades du processus de déturgescence sont tracées à la figure 9 et comparées à la fonction de transfert de modulation d'une mire seule.

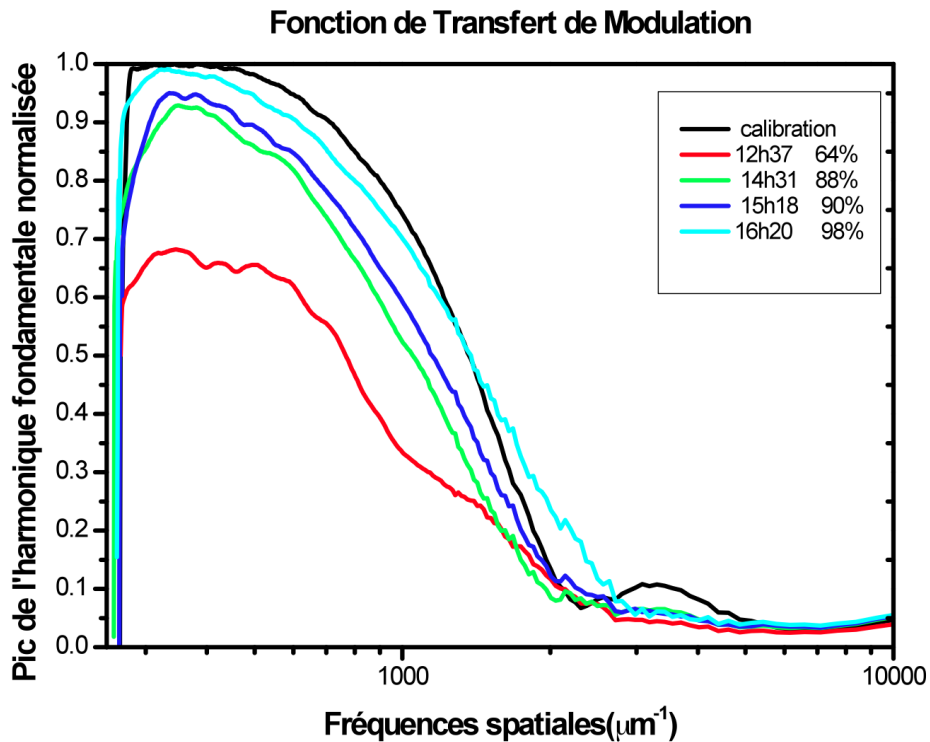


Figure 6. Fonction de transfert de modulation calculée pour une cornée à différents stades de déturgescence. En légende est indiquée l'aire de la courbe de MTF en pourcentage après normalisation par rapport à une image sans cornée.

L'aire sous la courbe de la MTF augmente lorsque la cornée devient plus transparente. L'évolution correspondante est présentée à la figure 7. A la figure 8, l'air sous la courbe de la MTF a été calculé pour une cornée subissant un processus de déturgescence dans le porte-échantillon. Une solution de déturgescence à 5% de Dextran a été placée dans le porte-échantillon à la place du sérum physiologique. Une image de calibration sans cornée a été réalisée avec la même quantité de solution de déturgescence dans le porte-échantillon. Des images ont été enregistrées à l'aide du microscope à intervalles réguliers. Les MTF ont été calculées pour les trois canaux rouge, bleu et vert.

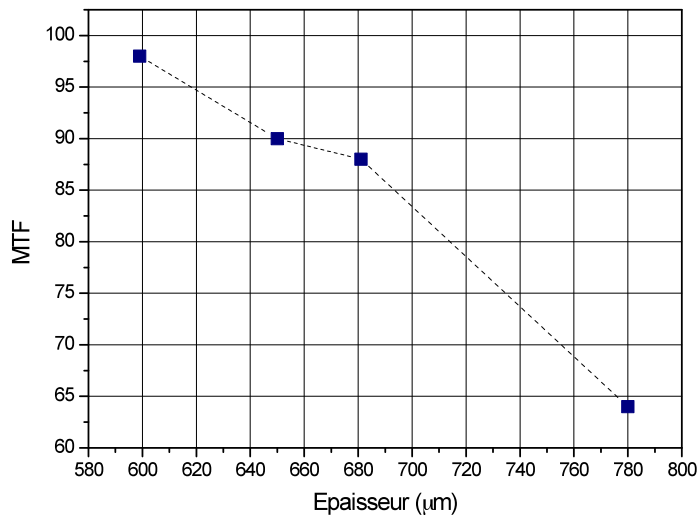


Figure 7. Aire sous la courbe de MTF en fonction de l'épaisseur d'une cornée.

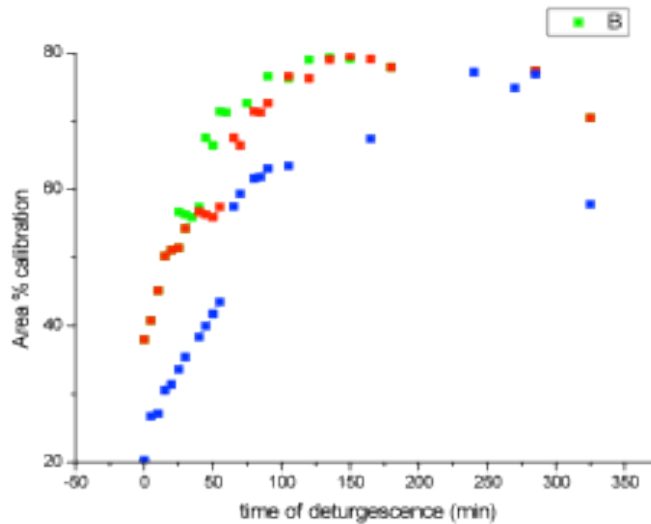


Figure 8. Évolution de la MTF pour les trois canaux lors du processus de déturgescence.

On voit que le dispositif proposé permet une mesure semi-quantitative du niveau de transparence de la cornée. La figure 7 indique quatre niveaux de MTF qui pourraient constituer un « abaque » utilisable par la banque des yeux. Il permettrait de discriminer les cornées dont la transparence est jugée suffisante en vue d'une greffe. On aurait ainsi un outil commun à l'ensemble de la communauté ophtalmologiste. On peut constater une diffusion plus importante pour le canal bleu par rapport aux autres canaux. Cela correspond à une diffusion de Rayleigh due aux fibrilles de collagène comme nous avons pu en discuter dans les chapitres précédents.

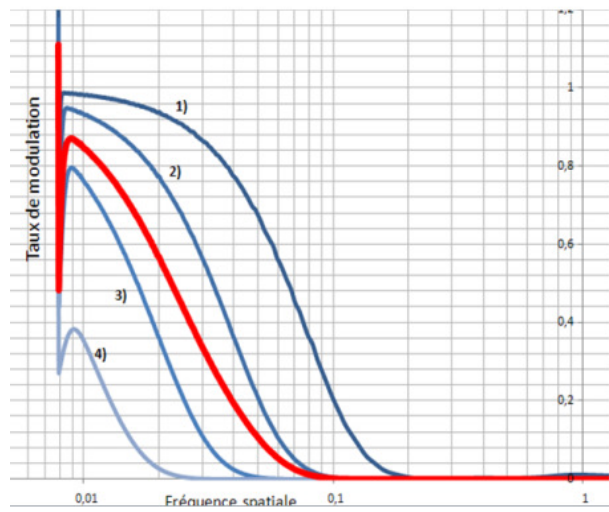


Figure 9. Fonction de transfert de modulation théorique calculées pour différents états de transparence, du niveau 1 pour une cornée saine, au niveau 4 pour une cornée fortement œdémateuse.

4. Conclusion

Le présent projet a permis de mettre au point un dispositif pour la caractérisation de greffons de cornées. Ce dispositif comporte deux éléments essentiels : le logiciel dont l'algorithme a été breveté par l'équipe en charge du projet, ainsi qu'un porte échantillon stérile ayant le double rôle de conserver un greffon de cornée, et de pouvoir se clipper à une mire centro-symétrique pour les mesures de transparence. Nous avons démontré que le dispositif est capable, par des mesures de MTF de calculer avec précision le niveau de transparence d'un greffon de cornée, et donc sa qualité optique. Nous répondons ainsi à une demande des banques des yeux et des chirurgiens ophtalmologiques qui à ce jour ne disposent pas de moyen efficace permettant de mesurer la transparence d'un greffon de cornée avant qu'il soit implanté sur un patient.

On peut imaginer que ce système soit également applicable à d'autres domaines que l'ophtalmologie. On peut imaginer que le logiciel soit accompagné d'une licence. Le porte échantillon quant à lui peut être commercialisable sous forme de consommable peu onéreux.

[1] « Dispositif et procédé de mesure optique de transmission et de diffusion de milieux oculaires » ; K. Plamann, F. Aptel, C. Crotti, F. Deloison, D. Peyrot, 2008 n° de priorité FR080056011

ANNEXE B: Caractérisation du dispositif goniométrique à l'aide d'échantillons fantômes

L'objet de l'étude réalisée à l'aide du dispositif goniométrique était la mise en avant de deux régimes de diffusion au sein de la cornée. Nous avons donc réalisé des échantillons de billes calibrées de différentes tailles correspondant à différents régimes de diffusion ; Rayleigh pour les billes plus petites que la longueur d'onde, et Mie pour les billes dont la taille est équivalente à celle de la longueur d'onde.

1. Préparation des échantillons

Des échantillons diffusants à base de billes de polystyrène⁴¹ ont été réalisés. La solution de billes est incorporée dans un gel de polyacrilamide. Le gel contenant les billes est alors piégé dans une cavité de l'ordre du millimètre déposée sur une lamelle de microscope (figure 1).

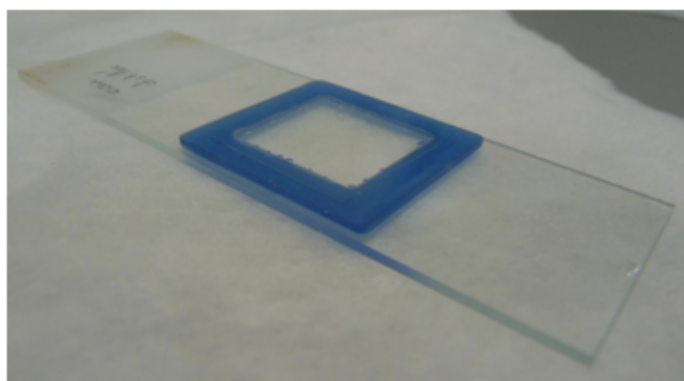


Figure 1. Gel de polyacrilamide inséré dans une cavité déposée sur une lame de microscope. Une lamelle est déposée sur le dessus de la cavité afin d'isoler le gel.

Le volume de la cavité est de 260 μL . Afin de préparer 435,5 μL de solution gélifiante, on prélève 200 μL de solution aqueuse contenant les billes, 100 μL d'acrylamide/bis-acrylamide à 30%. On ajoute 33 μL de persulfate de potassium qui joue le rôle d'initiateur permettant la polymérisation. Enfin, 13,5 μL de tétraméthyléthylènediamine (TEMED) est ajouté pour jouer le rôle de catalyseur de la solution. Le persulfate de potassium et le TEMED permettent la polymérisation de l'acrylamide en gel de polyacrylamide. Ce gel est souvent utilisé afin d'effectuer des électrophorèses pour la séparation des acides nucléiques ou des protéines en biologie et en biochimie.

Différents diamètres de billes ont été utilisés afin de réaliser les fantômes : des billes de 3 μm (à 2,5% en solution aqueuse), 269 nm (à 1% en solution aqueuse), et 30 nm (à 1% en solution aqueuse). La densité des billes est de 1,05 g/cm^3 et leur indice de réfraction de 1,59 pour une longueur d'onde de 589 nm.

⁴¹ Polyscience Europe GmbH, Allemagne

Un gel de polyacrylamide contenant des billes de 3 μm est imagé à la figure 2 pour des concentrations de 0,025% et 0,25% dans une solution aqueuse de 200 μL .

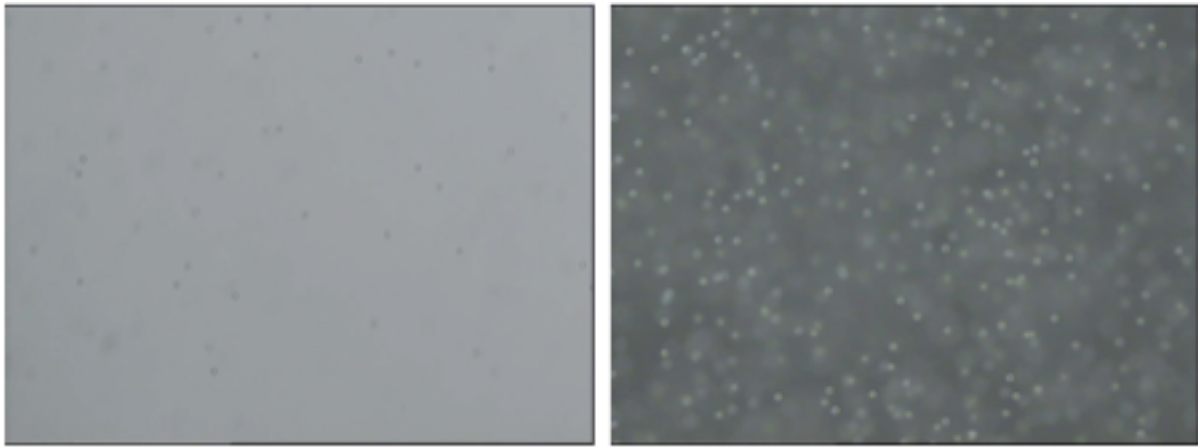


Figure 2. Image de microscopie de billes de polystyrène de 3 μm à 0,025% (gauche) et 0,25% (droite) dans du polyacrylamide. Le grossissement utilisé est X20 pour un champ de 315x235 μm .

2. Résultats obtenus

Les figures 3, 4, et 5 montrent les résultats de diffusion obtenus pour des billes de 3 μm et 269 nm à différentes concentrations (0,125% et 0,025%) et pour plusieurs longueurs d'onde (450 nm, 633 nm, et 1064 nm). Dans la partie diffusée vers l'espace transmis (120° - 180°) on observe l'apparition des lobes caractéristiques de la diffusion de Mie correspondant aux billes de polyacrylamide de 3 μm . La figure de diffusion des billes de 269 nm présente un caractère plus isotrope comme cela est prédit par la diffusion de Rayleigh. On constate que le niveau de diffusion des billes de diamètre 269 nm est supérieur à celui des billes de diamètre 3 μm . En effet, pour une même concentration de 0,125%, la quantité de billes de 3 μm dans le gel est de $8,4 \cdot 10^7$ billes/ml, et pour les billes de 269 nm, elle est de $1,165 \cdot 10^{11}$ billes/ml. À la figure 6, une mire circulaire est imagée à travers ces échantillons. L'aspect rougeâtre de l'échantillon correspondant aux billes nanosphériques montre une diffusion fortement dépendante à la longueur d'onde de type Rayleigh. Les longueurs d'ondes courtes sont plus fortement diffusées, les longueurs d'onde plus longues (rouge) passent en ligne droite.

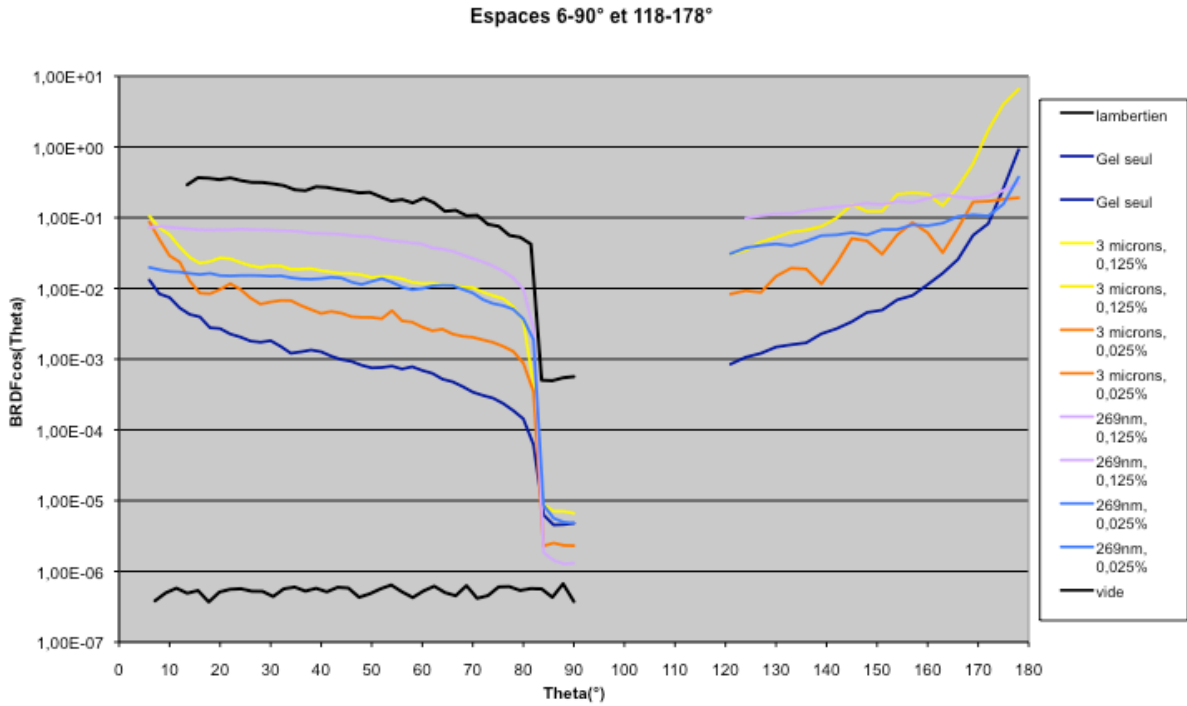


Figure 3. Figure de diffusion mesurée par goniométrie à 450nm pour des billes de diamètre différent.

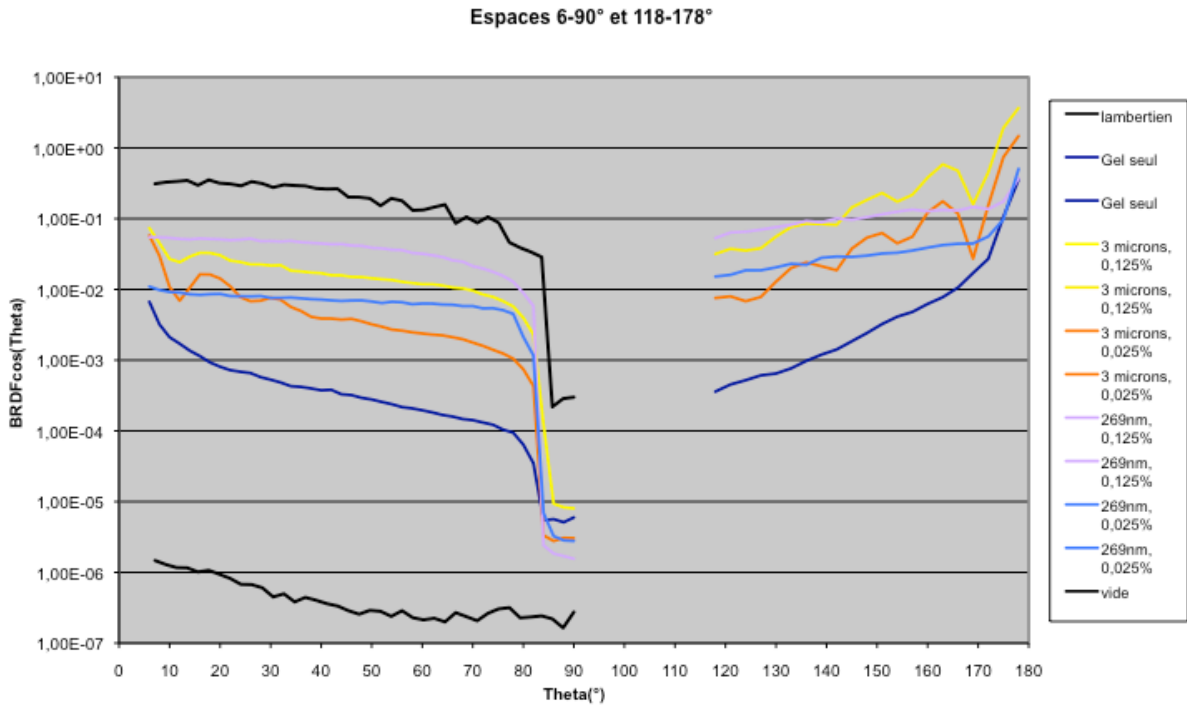


Figure 4. Figure de diffusion mesurée par goniométrie à 633 nm pour des billes de diamètre différent.

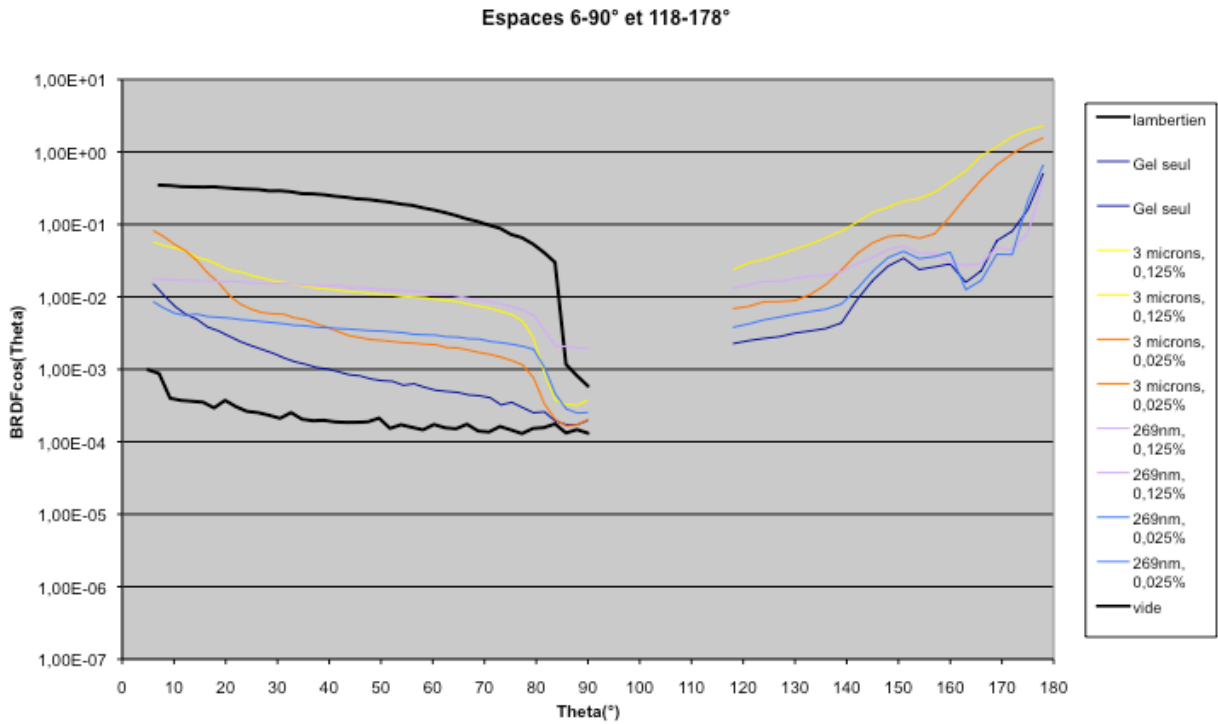


Figure 5. Figure de diffusion mesurée par goniométrie à 1064 nm pour des billes de diamètre différent.

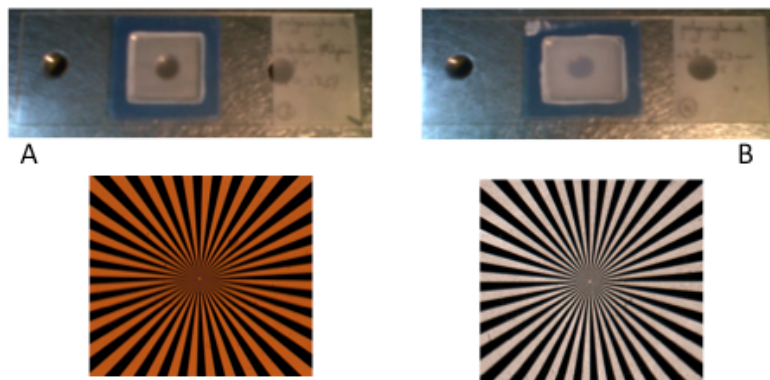


Figure 6. Échantillons de billes de 269 nm (A) et de 3 μm (B). Dans les images du bas, on voit l'image d'une mire projetée sous un microscope à travers l'échantillon. L'aspect rougeâtre de l'image correspondant aux billes nanosphériques correspond à une diffusion de Rayleigh fortement dépendante à la longueur d'onde.

Tal MARCIANO, Phd



talmarciano@gmail.com

Tel: +33 6.42.83.48.10

Nationality: French

Married

Physicist/Optical Engineer

I am a physicist with strong knowledge in Optics and very good experience in multidisciplinary and multicultural environments.

EDUCATION

ECOLE POLYTECHNIQUE, Palaiseau, France

Ph.D in Physics, 2012.

HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM, Jerusalem, Israel

MSc in Applied Physics, Optoelectronics, School of Computer Science and Engineering, (2007-2009).

TECHNION INSTITUTE OF TECHNOLOGY, Haifa, Israel

Biomedical Engineering department. Courses of molecular and cellular biology, anatomy, physiology, biological fluid mechanics, material science, mechanical engineering, (2006-2007)

UNIVERSITE PARIS VII, Paris, France / **UNIVERSITY OF YORK**, York, UK

Bsc Physics, Highest honors, *mention "Très Bien"*, 16/20, (2002-2005)

EXPERIENCE

Researcher at *Laboratoire d'Optique Appliquée (Applied Optics Laboratory)*, ENSTA-ParisTech, Ecole Polytechnique, CNRS

From 2009 to 2012:

- Study of transparency and loss of transparency of human cornea
- Characterization of the optical scattering due to the nano-and micro structures inside the cornea
- Modelisation of the human corneal scattering
- Development of a digital holographic tool measuring loss of coherence of beam propagating through low scattering media
- Study of the tissue interaction with a femtosecond laser source
- Participated to the development of new wavelength adapted femtosecond laser sources for ophthalmological surgery
- Surgical experimentation on corneal tissue
- Imaging the plasma propagation inside the tissue

Partnerships and collaborations: Ophthalmological department *Hôtel Dieu* hospital -Paris, Ophthalmological department *Edouard Herriot* Hospital- Lyon, French Eye Bank, *Laboratoire d'Optique et Biosciences* - Ecole Polytechnique, Université Paris V, FORTH Institute, Heraklion, Greece, Institut Fresnel, Marseille.

Grant: Axa International Research Fund (30 funds delivered per year in the world) on the field of aging and long-term care.

Grant: Fund from the French Ministry for Higher education delivered by Ecole Polytechnique (18 admitted), (I declined)

Teacher in the Physics department of *Université de Paris Sud, Orsay*

Lecturer of the course Laser and photonics, class exercises of the course Laser and Photonics, laboratory of the class Laser and photonics, 2^{sd} and 3rd year.

Class exercises in the course mechanics, laboratory in the course mechanics, and teaching assistant for the first year of medical school students.

Researcher at the Condensed Matter Laboratory, Racah Institute of Physics, Hebrew University of Jerusalem

From 2007 to 2009:

Research subject: "Real-time sensing of cell morphology by infrared waveguide spectroscopy".

- Participated to the creation of a biosensor based on Surface Plasmon Resonance by Fourier Transform Infrared Spectroscopy.
- Demonstrated theoretically and experimentally the possibility for this biosensor to excite guided mode in polymer surface
- Demonstrated the possibility to excited guided modes in live cell monolayer
- Studied the response of a epithelial monolayer to calcium depletion
- Studied cell-cell adhesion and cell-substrate adhesion

Thesis grade: 95/100

Grant: Rachel and Selim Benin Scholarship Fund 2008 (80 grants delivered in Israel in 2008)

Collaboration: Silverman Institute of Life Science, Biorad-Laboratories.

SKILLS and TECHNIQUES

Photonics, Optical scattering, Laser-tissue interaction, digital holography, Optical setups, Fourier Optics, Plasmonics, medical laser source for ophthalmology, eye tissue dissection, cell culture, cell and molecular Biology, Imaging.

Computational skills: Data analysis with Matlab, Origin, knowledge in Zemax, ImageJ, Mathcad, LabView, MSC Nastran (Finite Element Analysis), C++, Python.

LANGUAGE SKILLS

French: Bilingual

Hebrew: Bilingual

English: Fluent

Spanish: Basic knowledge

INTERESTS

Music: Guitar, Harmonica, Violin, and Singing

Literature: Great interest for Russian and French literature

Drawing

PUBLICATIONS

Real-Time Sensing of Cell Morphology by Infrared Waveguide Spectroscopy, **Tal Marciano***, Victor Yashunsky*, Valdislav Lirtsman, Michael Golosovsky, Dan Davidov, Benjamin Aroeti, PLoS ONE 7(10): e48454. doi:10.1371/journal.pone.0048454 (*equal contribution)

Digital holographic Characterization of the Mutual Intensity of a Beam travelling through Turbid Media, **Tal Marciano**, Fatima Alahyane, Benoît C. Forget, Karsten Plamann (to be submitted)

The transparency and loss of transparency of the corneal tissue revisited, **Tal Marciano**, Olivier Casadessus, Gaëlle Georges, Karsten Plamann (to be submitted)

Image of the plasma creation in pig cornea with a in-line holographic setup, **Tal Marciano**, Asad Hussain, Karsten Plamann, Dimitris Papazoglou, Stelios Tzortzakis (in preparation)

FTIR-SPR to probe living cells by Tal Marciano, MSC thesis, Harman Science Library, The Hebrew University of Jerusalem, MSC 2009 M37 T35, 2009.

• **Effect of Incident Light Wavelength and Corneal Edema on Light Scattering and Penetration: Laboratory Study of Human Corneas**, Donald A. Peyrot, PhD; Florent Aptel, MD; Caroline Crotti, MSc; Florent Deloison, MSc; Simon Lemaire, BIng; **Tal Marciano, MSc**; Stéphane Bancelin, MSc; Fatima Alahyane, BIng; Laura Kowalczyk, PhD; Michèle Savoldelli, Eng; Jean-Marc Legeais, MD; Karsten Plamann, PhD, **Journal of Refractive Surgery, October 2010 - Volume 26 · Issue 10: 786-795**

Book Chapters:

Infrared surface plasmon spectroscopy of living cells

Golosovsky, M., Yashunsky, V., Zilberstein A., **Marciano, T.**, Lirtsman, V., Davidov, D., and Aroeti, B. (2010), Chapter 14 In Plasmons: Theory and Applications. Editor: Kristina N. Helsey. Nova Science Publishers

Studying Living Cells by Infrared Surface Plasmon Spectroscopy

Victor Yashunsky, Alexander Zilberstein, **Tal Marciano**, Valdislav Lirtsman, Michael Golosovsky, Benjamin Aroeti, Dan Davidov, The Racah Institute of Physics, the Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel, and others), Plasmons : structure, properties and applications. Editors : Turunen and Niemi.

Optique du Tissu Cornéen Revisité, **Tal Marciano**, Fatima Alahyane, Asad Hussain, Benoît Forget, Karsten Plamann Optidag, 2012.

Proceedings:

Infrared Surface Plasmon Spectroscopy of Living Cells AIP Conf. Proc. 1281, pp. 1617-1621;

Date: 19–25 September 2010

V. Yashunsky¹, A. Zilberstein¹, **T. Marciano**¹, V. Lirtsman¹, M. Golosovsky¹, D. Davidov¹, and B. Aroeti²

Study of light scattering and transparency in human edematous corneas and application to corneal grafts, **Tal Marciano**, Donald Peyrot, Caroline Crotti, Fatima Alahyane, Laura Kowalczyk, Karsten Plamann, European conference on Biomedical Optics, Lasers in Ophthalmology, 2001 ECBO Munich

Infrared surface plasmon spectroscopy and biosensing, [Victor Yashunsky](#), [Tal Marciano](#), [Vlad Lirtsman](#), Alexander Zilbershtein, Michael Golosovsky, [Benjamin Aroeti](#), [dan Davidov](#) SPIE Conference Proceedings, February 1, 2012

Corneal grafting assisted by wavelength-optimised ultrashort pulser lasers, **T. Marciano** F. Aptel, N.Chateau, C.Crotti, F.Deloison, F.Druon, P.Georges, M.Hanna, B.Lamory, J.M Legeais, X.Levcq, F.Morin, V.Nuzzo, D.Peyrot, M.Savoldelli, K.Plamann European Association for Vision and Eye Research(EVER), Heraklion, 2010

Corneal Transparency and Coherence Loss Evaluated by Digital Holography, **Tal Marciano**, Fatima Alahyane, Benoît Forget, Karsten Plamann, ECBO 2013 (Submitted)

Oral presentations:

Corneal grafting assisted by wavelength optimised femtosecond pulser laser, **T. Marciano** F. Aptel, N.Chateau, C.Crotti, F.Deloison, F.Druon, P.Georges, M.Hanna, B.Lamory, J.M Legeais, X.Levécq, F.Morin, V.Nuzzo, D.Peyrot, M.Savoldelli, K.Plamann, ARVO (Association for research in vision and ophthalmology), Fort Lauderdale, 2011. ARVO Fort Lauderdale

Study of light scattering and transparency in human edematous corneas and application to corneal grafts, **Tal Marciano**; [Donald Peyrot](#) ; [Caroline Crotti](#) ; [Fatima Alahyane](#) ; [Laura Kowalczyk](#) ; [Karsten Plamann](#)
Acta Ophthalmologica, Volume 88, Issue Supplement s246, September 2010.

Corneal grafting assisted by wavelength-optimised ultrashort pulser lasers, **Tal Marciano**, F. Aptel, N.Chateau, C.Crotti, F.Deloison, F.Druon, P.Georges, M.Hanna, B.Lamory, J.M Legeais, X.Levécq, F.Morin, V.Nuzzo, D.Peyrot, M.Savoldelli, K.Plamann European Association for Vision and Eye research(EVER), Heraklion, 2010

Optique du Tissu Cornéen Revisité, **Tal Marciano**, Fatima Alahyane, Asad Hussain, Benoît Forget, Karsten Plamann Optidag, 2012.

Optique du Tissu Cornéen Revisité, **Tal Marciano**, Fatima Alahyane, Asad Hussain, Benoît Forget, Karsten Plamann, Journée de la Cornée, Hôpital Hôtel-Dieu, 2012.

