



HAL
open science

Tomographie par cohérence optique plein champ linéaire et non linéaire

Delphine Sacchet

► **To cite this version:**

Delphine Sacchet. Tomographie par cohérence optique plein champ linéaire et non linéaire. Physique [physics]. Université Paris Sud - Paris XI, 2010. Français. NNT: . tel-00519355

HAL Id: tel-00519355

<https://pastel.hal.science/tel-00519355>

Submitted on 12 Oct 2010

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

SPECIALITE : PHYSIQUE

*Ecole Doctorale « Sciences et Technologies de l'Information des
Télécommunications et des Systèmes »*

Présentée par : Delphine SACCHET

Sujet :

Tomographie par cohérence optique plein champ linéaire et non linéaire

Soutenue le 08 Juillet 2010 devant les membres du jury :

M. Emmanuel BEAUREPAIRE	Président
M Claude BOCCARA	Rapporteur
M. Christian DEPEURSINGE	Rapporteur
M. Arnaud DUBOIS	Directeur de thèse
M. Luc FROEHLY	Examineur
Mme Anne SENTENAC	Examinatrice

A mon grand-père

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Pierre Chavel et Christian Chardonnet, directeurs successifs du laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique, pour m'avoir accueillie au laboratoire pendant ces trois années, ainsi qu'Arnaud Dubois, mon directeur de thèse, pour m'avoir proposé ce sujet et pour avoir relu ce manuscrit avec autant d'attention.

Je remercie également l'école doctorale STITS pour son soutien, avec une pensée particulière pour Dominique Martin qui m'a aidé un lundi de fin juin dans les démarches administratives pour pouvoir soutenir dans les temps.

Je remercie Claude Boccara de l'Institut Langevin à Paris et Christian Depeursinge de l'EPFL à Lausanne pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également les autres membres du jury Anne Sentenac de l'Institut Fresnel à Marseille, Emmanuel Beaurepaire de l'Ecole Polytechnique à Palaiseau et Luc Froehly de l'Institut Femto-ST à Besançon.

J'ai eu l'immense chance de réaliser ma thèse dans l'Equipe Laser Solides et Applications, mieux connue sous son petit nom ELSA. Faire partie de cette équipe, c'est faire partie d'une grande famille que l'on quitte avec regret. J'y suis entrée un peu malgré moi, décidée dans un premier temps à n'y faire qu'un stage avant de courir enseigner la physique à des élèves boutonneux. J'y suis finalement restée plus de trois ans, entourée de gens formidables, dont certains sont devenus de véritables amis. Je ne regrette à aucun moment ce choix, puisque je ressors de cette expérience grandie (enfin au sens figuré bien entendu), la tête pleine de souvenirs inoubliables et le cœur rempli d'êtres qui me sont devenus chers. Les quelques lignes qui suivent leurs sont dédiées et comme une image vaut parfois mieux qu'un long discours, j'ai souhaité illustrer mes propos par quelques photos qui représentent selon moi assez bien les différents personnages.



Mes premiers remerciements vont bien évidemment au chef de cette glorieuse équipe, THE chef, Patrick.

Patrick, il m'est difficile d'exprimer en quelques lignes tout ce que tu as fait et représenté pour moi durant ces trois ans. Merci tout d'abord pour la confiance que tu as placée en moi en acceptant de me prendre au sein de ton équipe, moi la "non-Supop" !! J'espère que je ne t'ai pas trop déçue et que tu garderas autant de bons souvenirs que je peux en avoir de ces trois ans partagés avec toi.

Merci également pour toujours t'inquiéter de notre bien-être, tel le père que tu es pour nous tous, et pour avoir stressé au moins autant que moi dans l'attente de la décision pour mon poste en prépa.

Merci de tes conseils avisés, de ta connaissance quasi-encyclopédique des lasers, de ne pas t'être (trop) vexé lorsque je me suis endormie pendant ton cours de techno des lasers et de toujours penser à moi lorsque tu vois des vidéos pédagogiques.

Je tiens enfin à te remercier de m'avoir fait assez confiance pour me laisser réaliser le microscope de fluorescence sous excitation à deux photons malgré tes doutes. J'y suis finalement (presque) arrivée !

Mes remerciements vont ensuite aux permanents de l'équipe, qui, même s'ils ne m'ont pas encadré au quotidien, sont toujours à l'écoute de nos petits et grands problèmes. Ce sont eux qui font l'âme de la famille ELSA, chacun à sa façon, avec ses qualités et ses défauts.

François :

Monsieur le (futur ex) directeur des études de l'Institut d'Optique Graduate School, merci de m'avoir acceptée dans ton bureau pendant un peu plus de deux ans et d'avoir donc supporté les thés de 17 heures avec le petit Marc et ses blagues potaches. Merci de ta simplicité, de ton sens de l'écoute, de ta pédagogie, de ton entrain dans tout ce que tu entreprends. Tu possèdes ce don rare de savoir tout expliquer, à n'importe quel niveau avec des mots simples qui font que ton interlocuteur a toujours cette impression heureuse d'enfin avoir compris. Et merci pour les quelques après-midis ou nous avons refait, si ce n'est le monde, au moins ton bureau !!

Merci également d'avoir été mon tuteur pédagogique de monitorat (enfin sur le papier du moins) !! En espérant que je saurais être un jour à la hauteur de mon tuteur...



Gaëlle :

Chère compagne de STEP et de courbatures du vendredi matin, je voulais te remercier pour ta prévenance et ta gentillesse de tous les instants, de tes précieux conseils sur les problèmes présents ou futurs, sur la petite robe la mieux adaptée à ces superbes sandales et pour te battre si farouchement pour la place des femmes dans la recherche et l'enseignement scientifique.

Merci pour nos discussions littérature, cinéma, mode, voyage ou pédagogie, pour le voyage que nous avons partagé en Belgique (et dont je garde de formidables souvenirs) et pour avoir partagé si souvent un carré de chocolat avec moi.

Merci d'être devenue une véritable amie.

PS : heureusement que tu as eu la motivation pour deux la plupart des jeudis soirs !

Fred :

Petit lutin farceur et survolté, je voulais te remercier pour ta gentillesse, ton enthousiasme et tous les livres et BDs que nous avons pu partager. Grâce à toi l'ambiance dans l'équipe n'est jamais ennuyeuse. Seul être à pouvoir lâcher une bombe sexiste dans le bureau de Gaëlle et à s'évaporer dans une pirouette, tu es le maître incontesté de la mauvaise foi et de la blague (plus ou moins drôle d'ailleurs). Tu n'en reste pas moins le chercheur le plus impressionnant que je connaisse, capable de dormir pendant la totalité d'une conférence et de quand même tout comprendre.

Et même si ton "anti-pédagogie" légendaire rend parfois des explications difficiles à comprendre du premier coup, merci de m'avoir accepté dans la Dream Team des TP d'électronique (pendant lesquels je tiens à le signaler Gaëlle, on travaille au moins autant qu'en TP d'optique).

Merci enfin à toi et Nadine pour m'avoir accueillie et nourrie toutes les fois où Mathieu vadrouillait de part le monde, de me sentir chez vous comme dans une seconde famille.





Marc :

Grand maestro de la guitare jazz, je voudrais te remercier de ta gentillesse et de ton calme légendaire, d'avoir épargné mes chastes oreilles de tes blagues et remarques "fleuries" et d'avoir été toujours partant pour partagé un Knopper, ce magnifique biscuit provenant des lointaines terres teutonnes.

Merci également d'être à peu près aussi geek de physique fondamentale que moi. Nous sommes les deux seules personnes de l'équipe à posséder les Cohen et Feynman, ce qui est à n'en pas douter un signe de ta très grande sagesse !

Julien

Julien, je voudrais te remercier pour les innombrables heures que tu as passées en salle de manip, à aligner les deux caméras (avec une précision sub-pixel!!), à m'apprendre le Labview pour piloter les nombreux périphériques de l'expérience. Grâce à toi, le Labview n'a plus beaucoup de secret pour moi et surtout surtout nous avons finalement réussi à dompter le port série !!

Merci également pour avoir toujours été partant pour une pause thé et un carré de chocolat dans les moments de déprime, pour m'avoir fait découvrir Dennis Lehane et pour avoir une si grande culture littéraire et cinématographique.



Gérard :

Tu as désormais pris une retraite bien méritée, au Soleil de ta chère Provence.

Merci de ta bonne humeur communicative en salle de manip, pendant ma première année de thèse. Merci également de m'avoir aidée à dompter le laser Ti-Saphir et à comprendre les méandres de son alignement.

Sache seulement qu'il est devenu bien capricieux depuis que tu es parti !

Dimitris :

Grec joyeux et barbu, tu as su nous faire profiter des friandises délicieuses de ta mama et de l'accent chantant de ton pays.

Expérimentateur le plus doué que je connaisse, merci d'avoir eu la patience d'expliquer à une débutante naïve comme moi comment aligner un autoco.



Merci également aux deux "petits" nouveaux qui sont arrivés cette année, Alain et Sylvie, pour leur gentillesse et leurs encouragements. Profitez à fond de cette merveilleuse équipe qui est devenue la vôtre.

Vient maintenant le tour des nombreux thésards de l'équipe, qui sont arrivés et partis au cours de mes trois années de thèse. Si nos permanents constituent l'âme et le socle de la grande famille ELSA, les thésards en sont les enfants prodiges, dispersés aux quatre coins de l'Europe, mais jamais totalement partis, ni oubliés.



Damien :

Merci Damien pour ta bonne humeur permanente malgré les coups durs et les difficultés de la rédaction, d'avoir accepté de partager des derniers mois de thèse en "exil" dans un coin de notre bureau et de faire si bien le punch réunionnais !

Merci également d'avoir apporté la mode des photos Lego au sein de l'équipe, qui je pense vont devenir une marque de fabrique des photos laser ELSA.

Pour ta vie future, professionnelle et personnelle, je te souhaite énormément de bonheur et de réussite et profitez bien de ce jour unique qui vous attend le 5 Août !

David :

Roi de la condescendance et de la blague élitiste, je tiens à te remercier pour toutes les pauses thé que nous avons partagé ensemble, pour être toujours partant pour sauver le monde et développer le réseau ferré européen et pour rester si stoïque devant les affres de Little Marc.

Merci pour m'avoir prodigué de nombreux conseils avisés au cours de mes deux premières années de thèse, pour avoir toujours laissé ta porte ouverte le soir vers 19h quand la fatigue et la déprime se faisaient sentir. Et merci d'avoir instauré le "mot du jour" pour remonter le niveau linguistique de l'équipe.

Merci enfin d'avoir été un modèle de thésard pour nous tous !



Marc :

Tu es un peu (avec Fred) la personne responsable des 166 pages qui suivent. Ta gentillesse et ta bonne humeur m'ont fait me sentir si bien dans l'équipe que je me suis dit finalement, 3 ans pourquoi pas ?!!

Merci pour la semaine au ski, les week-ends en Teutonie, les nombreuses soirées Wii chez toi, pour les nombreuses discussions que nous avons eues sur des sujets plus ou moins sérieux, et de ton extrême gentillesse. Et il reste encore beaucoup à dire...

Merci d'être devenu un ami cher, tout simplement.

Franck :

Mr Apple, merci d'avoir partagé ces trois merveilleuses années avec moi, avec les doutes et les questions, mais également les succès, de t'être toujours intéressé à ce que je faisais, même si ce n'était pas des lasers, et de ton grand sens physique, qui m'a toujours impressionné.

Merci également de ta gentillesse, d'avoir supporté avec énormément de patience les vannes répétées sur ton régime alimentaire et finalement, comme pratiquement tous les thésards de l'équipe, de m'avoir convertie à Mac !!

Je te souhaite beaucoup de courage pour la dernière ligne droite et je l'espère beaucoup de bonheur et de succès dans ta nouvelle vie bordelaise.





Mathieu :

Pour toi qui représentes tout ce que j'ai de plus cher au monde, mon meilleur ami et mon mari, je voudrais dire le plus grand de tous les mercis. Il y a trop de choses pour lesquelles je voudrais te remercier, aussi ne vais-je citer que celles qui ont leur place ici.

Merci pour ton soutien sans faille au cours de ces trois années, pour avoir su trouver les mots pour me faire rire et m'apaiser lorsque je doutais, pour avoir partagé le même labo et la même équipe malgré les doutes du début, pour nos discussions pendant et après le boulot. Merci pour toujours croire en moi et être le soleil qui illumine ma vie. Je t'aime.

Et enfin, merci pour ce 24 Avril 2010 inoubliable.

Igor :

Merci Igor pour ta disponibilité à toute épreuve au moment des pauses thé, pour avoir toujours une anecdote à raconter, le fameux "Igor Fact" qui nous surprend à chaque fois.

Merci pour ta gentillesse, pour avoir partagé ta passion de la photo avec moi et pour avoir supporté avec plus ou moins de patience nos vanes répétées sur ton régime alimentaire (d'où la fameuse photo) et tes fameux 45% (j'espère qu'il y en aura au moins un dans ton manuscrit).

Je te souhaite beaucoup de courage et de succès pour la suite de la rédaction, et profite encore bien de ta dernière année, qui n'est pas la pire contrairement à ce que certaines mauvaises langues pourraient dire.



Viviane :

Ma petite exilée du LLPM, je te remercie pour ta gentillesse et ta bonne humeur, pour avoir partagé la lourde charge de représenter la biophotonique au sein de l'équipe et pour avoir enseigné avec brio la PPL aux poissons rouges !!

Je te souhaite beaucoup de courage pour la suite, et beaucoup de succès évidemment mais pour cela je ne me fais pas trop de soucis... !

Merci également aux "petits" nouveaux qui sont arrivés cette année, Patricia, Sandrine, Mas et Louis. Merci pour votre gentillesse, pour avoir partagé le bureau ou un thé. Je vous souhaite du courage pour la suite et surtout au moins autant de bonheur et de plaisir que j'ai pu en avoir. Profitez, car croyez moi ou non, ces trois années passent bien trop vite !!

Plusieurs stagiaires ont contribué à ces travaux. Merci à Christina, Jean, Gustavo et Michal. Merci également aux étudiants de la filière FIE, Emilie, Emmabuel, Talal et Timothée, pour s'être occupés si efficacement de la source à LED.

Pendant ces trois ans, j'ai également été monitrice à l'Institut d'Optique. Je remercie les différentes personnes avec qui j'ai eu l'occasion d'enseigner ou de partager des idées sur la pédagogie et l'enseignement :

- Franck, Fred, Yvan, Viviane, Christelle et Henry pour les TP d'électronique
- Lionel, Valentina, Jérôme, Marie et François pour les TP de polarisation

Un grand merci également à Thierry et Cédric des TP pour leur extrême gentillesse et bonne humeur, pour avoir toujours eu un bonbon ou un gâteau lors des petits creux de 11h en TP et pour les nombreux prêts de matériel.

Merci Thierry de faire des TP d'optique un endroit où l'on a envie d'enseigner le plus longtemps possible.

Je remercie également mes amis pour avoir été présents pendant ces trois années, pour les nombreux week-ends jeux, les escapades stéphanoises, les pique-niques plus ou moins arrosés (par la pluie évidemment), les sorties rollers... Merci.

Pour finir, je souhaite remercier mes parents, mes beaux-parents, mes frères, sœur et beau-frère, ainsi que toute ma famille qui m'ont toujours soutenu. Merci d'avoir été présents tout ce temps et le 8 Juillet. Tout ceci n'aurait pas été possible sans vous...

Table des matières

Introduction générale	5
-----------------------------	---

I. Etat de l'art de la tomographie par cohérence optique pour l'imagerie des milieux biologiques

I.1	La technique de tomographie par cohérence optique.....	8
I.1.1	Principe	8
I.1.2	Les différentes méthodes de balayage.....	9
I.1.3	Performances.....	9
I.1.4	OCT fonctionnelle	17
I.1.5	Les différentes configurations d'OCT	18
I.2	Tomographie par cohérence optique fréquentielle.....	19
I.2.1	OCT dans le domaine spectral	19
I.2.2	OCT fréquentielle avec une source à balayage spectral	20
I.2.3	Avantages du FD-OCT par rapport au TD-OCT	21
I.3	Tomographie par cohérence optique plein champ.....	21
I.3.1	Principe	21
I.3.2	Performances.....	23
I.3.3	Bilan : avantages et inconvénients de l'OCT plein champ.....	25
I.4	Applications de la tomographie par cohérence optique.....	26
I.4.1	Applications dans le domaine médical.....	27
I.4.2	Applications dans le domaine non médical.....	28
I.5	Conclusion.....	29

II. Amélioration de la profondeur de pénétration - Tomographie par cohérence optique plein champ sur deux gammes de longueurs d'onde

II.1	Dispositif expérimental : présentation et caractérisation.....	33
II.1.1	Principe général : détecteurs Si et InGaAs	33

II.1.2	Montage expérimental.....	33
II.1.3	Calcul des images tomographiques et traitements numériques.....	39
II.1.4	Performances du dispositif	44
II.2	Exemples d'images	53
II.2.1	Premiers tests : images d'un cheveu.....	54
II.2.2	Images d'un milieu diffusant : le papier.....	55
II.2.3	Images de milieux biologiques	58
II.2.4	Images de cornée – Application au traitement du glaucome.....	60
II.3	Conclusion	63

III. Développement de nouvelles sources lumineuses pour la tomographie par cohérence optique plein champ

III.1	Combinaison de diodes électroluminescentes	65
III.1.1	Techniques de combinaison.....	66
III.1.2	Optimisation numérique du spectre global	67
III.1.3	Mise en place et performances de la source lumineuse	69
III.1.4	Performances comme source pour l'OCT plein champ	70
III.1.5	Application spectroscopique.....	75
III.1.6	Perspectives : le projet BUNDEL.....	78
III.2	Fluorescence d'un cristal de Ti-Saphir	79
III.2.1	Présentation du cristal de $Ti:Al_2O_3$	79
III.2.2	Principe général de la source	80
III.2.3	Caractérisations optiques du cristal de Ti-Saphir.....	81
III.2.4	Performances de la source lumineuse	84
III.2.5	Performances comme source pour l'OCT plein champ	87
III.2.6	Application à l'imagerie <i>in vivo</i> : vers le régime impulsionnel.....	90
III.2.7	Perspectives : fluorescence d'un cristal de Cr:LiSAF	91
III.3	Bilan	93

IV. Amélioration de la vitesse d'acquisition – Etude et suppression des artefacts de mouvement en tomographie par cohérence optique plein champ

IV.1	Artefacts de mouvement en OCT plein champ.....	96
IV.1.1	Signal parasite en présence d'un mouvement transverse.....	97
IV.1.2	Perte de contraste en présence d'un mouvement axial.....	100

IV.1.3	Solution envisagée.....	101
IV.2	Dispositif expérimental	102
IV.2.1	Principe général du décalage de phase instantané.....	102
IV.2.2	Montage expérimental	103
IV.2.3	Alignement et calibration des caméras.....	106
IV.2.4	Performances du dispositif d'imagerie.....	109
IV.3	Suppression des artefacts de mouvement.....	112
IV.3.1	Suppression du signal parasite lié au mouvement transverse.....	112
IV.3.2	Réduction de la perte de contraste liée au mouvement axial	113
IV.4	Exemple d'images <i>in vivo</i>	114
IV.5	Conclusion.....	116
V.	Couplage de l'OCT plein champ et de la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons	
V.1	Microscopie de fluorescence sous excitation à 2 photons	118
V.1.1	Le processus d'émission de fluorescence.....	118
V.1.2	Emission de fluorescence sous excitation à deux photons	121
V.1.3	La microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons	122
V.1.4	Intérêt pour l'étude des milieux biologiques	123
V.2	Dispositif expérimental de microscopie de fluorescence sous excitation à 2 photons.....	125
V.2.1	Etude de la source lumineuse	125
V.2.2	Mise en place du microscope de fluorescence à deux photons	132
V.2.3	Performances.....	135
V.2.4	Imagerie de fluorescence sous excitation à deux photons	140
V.3	Couplage de l'OCT plein champ et de la microscopie de fluorescence sous excitation à 2 photons.....	142
V.3.1	Montage expérimental	142
V.3.2	Images couplées	147
V.4	Conclusion.....	149
	Conclusion générale	151

Annexe : Calcul de la résolution axiale en OCT plein champ	153
Liste des publications et conférences	157
Références bibliographiques	159

Introduction générale

Depuis une vingtaine d'années, l'utilisation de la lumière pour l'observation des milieux biologiques est en pleine effervescence. La relative innocuité de la lumière ainsi que ses interactions spécifiques avec la matière (réflexion, diffusion, absorption, émission, polarisation...) en font en effet un outil de choix pour visualiser, avec une bonne résolution et un faible impact, les structures des milieux biologiques. Une multitude de techniques a ainsi vu le jour, parmi lesquelles de nombreuses techniques de microscopie :

- microscopie de fluorescence : microscopie confocale, FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging*), TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*), FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*), FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), FCS-FCCS (*Fluorescence Correlation and Cross Correlation*)...

- microscopie non linéaire : fluorescence sous excitation à deux photons, génération de second (SHG) ou troisième harmonique (THG), diffusion Raman stimulée anti-Stokes (CARS)...

- microscopie de très haute résolution : 4 Pi, illumination structurée, STED (*STimulated Emission Depletion*), PALM (*Photo-Activated Localization Microscopy*), STORM (*STochastic Optical Reconstruction Microscopy*)...

Dans l'univers de l'imagerie optique, la tomographie par cohérence optique est un monde à part entière. Cette technique d'imagerie basée sur l'interférométrie en lumière faiblement cohérente, développée au début des années 90, ne cesse en effet de se développer, de se diversifier et de se spécialiser, trouvant sans cesse de nouvelles applications. C'est dans le cadre de cette technique d'imagerie toujours en plein essor que s'insère notre projet, qui consiste en l'amélioration d'une technique alternative de la tomographie par cohérence optique, la tomographie par cohérence optique plein champ. Cette technique a été proposée il y a une douzaine d'années à l'École Supérieure de Physique et Chimie de Paris et connaît depuis des évolutions notables. Au sein du Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique, une activité de recherche sur la tomographie par cohérence optique plein champ est menée depuis le début de ces travaux de thèse.

Présentation du manuscrit

Ce manuscrit décrit les travaux réalisés pendant ma thèse, qui s'est déroulée au Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique de Palaiseau de Mars 2007 à Juin 2010. L'objectif de ces travaux était d'améliorer par différents aspects les performances et les champs d'application d'un dispositif de tomographie par cohérence optique plein champ. Pour cela, nous avons balayé les différentes composantes du dispositif en essayant de proposer de nouvelles solutions pour dépasser leurs limites actuelles. Le manuscrit s'articule en cinq chapitres.

Dans le premier chapitre, nous présentons un état de l'art des différentes techniques de tomographie par cohérence optique (temporelle, fréquentielle, plein champ) et leurs extensions (Doppler, en polarisation, spectroscopique). Le principe, les performances et les applications de ces différentes techniques sont exposés. Un jeu de quatre paramètres

caractéristiques (résolution spatiale, vitesse d'acquisition, profondeur d'imagerie et sensibilité de détection) est introduit afin d'évaluer les performances des différentes techniques et de les comparer. Ces paramètres seront ceux que nous chercherons à améliorer tout au long de ce manuscrit. Nous discutons enfin de voies possibles d'amélioration de la technique de tomographie par cohérence optique plein champ, en ce qui concerne en particulier la profondeur d'imagerie et la vitesse d'acquisition.

Dans le deuxième chapitre, nous présentons un dispositif de tomographie par cohérence optique plein champ permettant d'étudier l'influence de la longueur d'onde d'illumination sur la profondeur d'imagerie dans les milieux biologiques. Ce dispositif se base sur l'imagerie simultanée dans deux gammes de longueurs d'onde, centrées au voisinage de 800 nm et 1200 nm. La mise en place expérimentale et les performances du dispositif, le gain en profondeur d'imagerie ainsi que de nombreux tests sur divers échantillons sont décrits.

Le troisième chapitre est consacré au développement de nouvelles sources lumineuses pour la tomographie par cohérence optique plein champ. Nous détaillons deux concepts de sources lumineuses : une combinaison de diodes électroluminescentes par fibres optiques et une source basée sur la fluorescence d'un cristal de Saphir dopé au titane. Des simulations numériques ont été conduites afin d'optimiser la puissance et les caractéristiques spectrales de la source à base de diodes électroluminescentes. Différentes configurations de pompage du cristal de Ti-Saphir et de collection de la fluorescence ont été étudiées pour optimiser les performances de la source de fluorescence. Nous présentons une comparaison de ces nouvelles sources, ainsi que de la lampe halogène, pour la tomographie par cohérence optique plein champ, en mettant en évidence leurs avantages, inconvénients et potentialités spécifiques. Des images tomographiques comparatives d'échantillons biologiques ont également été réalisées avec ces différentes sources.

Dans le quatrième chapitre, nous exposons une étude théorique et expérimentale de deux artefacts de mouvement engendrés en tomographie par cohérence optique plein champ conventionnelle, en distinguant l'effet d'un mouvement axial ou transverse de l'échantillon. A partir de cette étude, un nouveau dispositif, basé sur l'acquisition simultanée de deux images interférométriques en opposition de phase avec un éclairage impulsionnel, est proposé. Les performances de ce dispositif en termes de réduction des artefacts, ainsi qu'une application *in vivo*, sont démontrées.

Dans le dernier chapitre, enfin, nous nous intéressons au couplage de la tomographie par cohérence optique plein champ avec des techniques d'imagerie non linéaire, en particulier la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons. Un état de l'art de cette technique de microscopie est présenté, ainsi que ses atouts pour l'imagerie des milieux biologiques. Nous décrivons ensuite le dispositif expérimental de microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons que nous avons réalisé, donnons ses performances et présentons des images d'objets tests. Les problèmes spécifiques auxquels nous avons été confrontés lors du couplage des deux techniques sont mis en évidence ; une solution pratique est proposée. Enfin, grâce à des images préliminaires, nous montrons que les informations apportées par les deux techniques sont complémentaires, justifiant ainsi l'intérêt du couplage pour de futures applications biomédicales.

I. Etat de l'art de la tomographie par cohérence optique pour l'imagerie des milieux biologiques

La tomographie par cohérence optique (ou OCT, acronyme d'*Optical Coherence Tomography*) est une technique d'imagerie inventée par des chercheurs du Massachusetts Institute of Technology (USA) au début des années 1990 [1]. L'OCT permet de produire de manière non invasive des images tomographiques d'échantillons biologiques. Par analogie avec l'échographie qui mesure l'intensité et le temps de propagation d'une onde acoustique ultrasonore réfléchiée par les structures de l'échantillon, le signal obtenu en OCT, que nous appellerons dans la suite *signal tomographique*, dépend de l'amplitude et du chemin optique parcouru par une onde électromagnétique lumineuse réfléchiée et/ou rétrodiffusée par le milieu biologique. Le contraste des images obtenues en OCT résulte donc des inhomogénéités d'indice de réfraction du milieu. Cependant, les fréquences optiques étant considérablement plus élevées que les fréquences acoustiques (de l'ordre de 10^{14} Hz contre quelques 10^6 Hz pour les applications courantes de l'échographie), la mesure en OCT ne peut se faire que par corrélation de l'onde revenant du milieu étudié avec une onde de référence. En pratique, cette corrélation est réalisée par interférométrie.

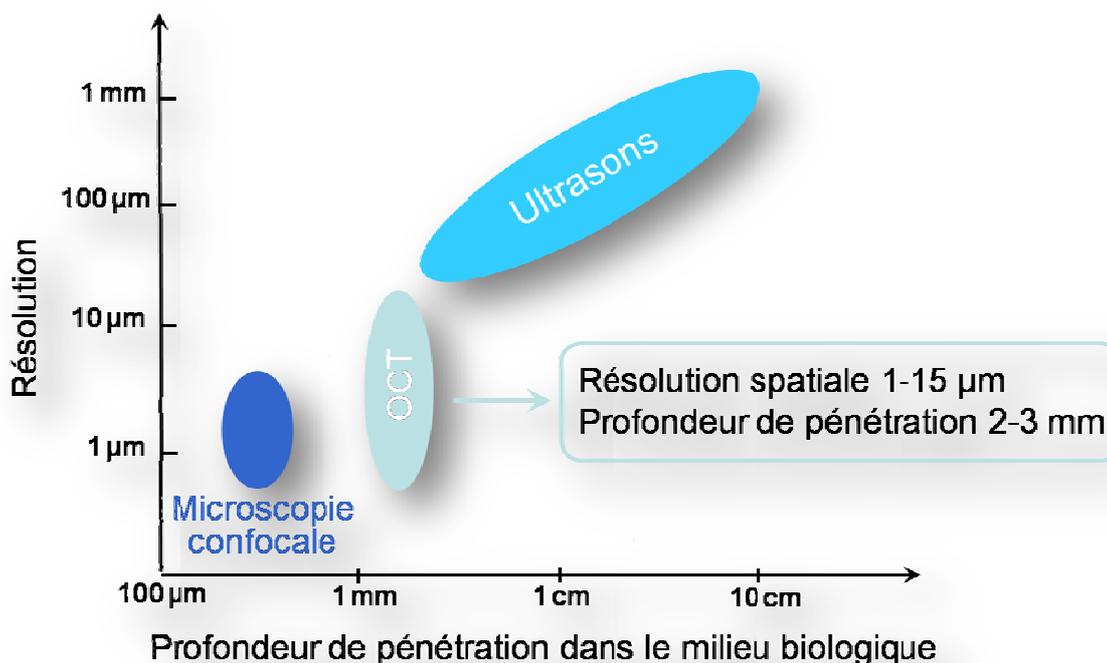


Figure I.1 : Résolution et profondeur de pénétration comparatives des ultrasons, de la microscopie confocale et de la tomographie par cohérence optique.

Outre son caractère non invasif, l'OCT présente de nombreux avantages par rapport aux techniques d'imagerie déjà existantes, telles que l'échographie, les rayons X, la résonance

magnétique nucléaire (RMN) ou les microscopies confocale et non linéaire. Elle se place idéalement en termes de profondeur de pénétration et de résolution spatiales, entre les techniques non optiques (échographie, rayons X et RMN) possédant de faibles résolutions spatiales (de l'ordre du millimètre), et la microscopie confocale, possédant une résolution élevée mais une profondeur de pénétration très limitée (de l'ordre de la centaine de micromètres). Pour cela, l'OCT a rapidement connu un franc succès dans le domaine de l'ophtalmologie [2, 3] ainsi que pour le diagnostic des pathologies de l'œil [4, 5].

Nous développerons dans ce chapitre le principe des différentes configurations d'OCT, leurs performances, leurs variantes ainsi que leurs domaines d'applications.

I.1 La technique de tomographie par cohérence optique

I.1.1 Principe

L'élément de base de tout dispositif d'OCT est un interféromètre de Michelson, permettant la corrélation de l'onde réfléchie et /ou rétrodiffusée par l'objet avec une onde de référence. Les ondes issues des deux bras de l'interféromètre, séparées puis recombinaées par la lame séparatrice, interfèrent si la différence de marche est inférieure à la longueur de cohérence temporelle de la source lumineuse. Un détecteur, généralement une photodiode, acquiert ce signal interférométrique. Pour accéder à l'information structurale de l'échantillon en profondeur (scan de type A), le miroir de référence est translaté pendant l'acquisition par le détecteur (cf. Figure I.2) : on parle alors de tomographie par cohérence optique temporelle ou **TD-OCT** (pour *Time Domain Optical Coherence Tomography*).

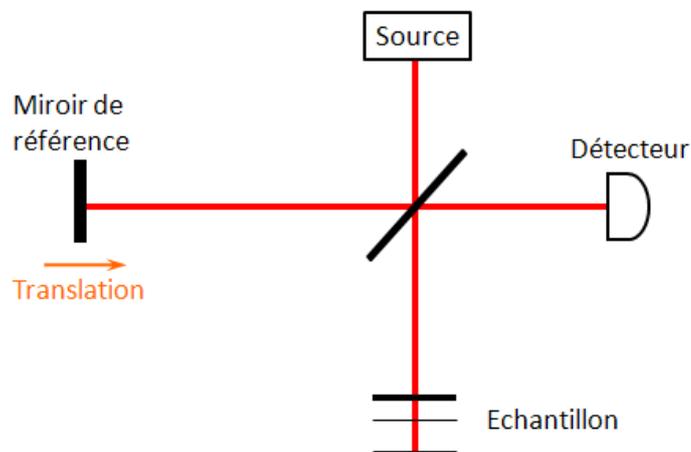


Figure I.2 : Schématisation du principe de la tomographie par cohérence optique dans le domaine temporel.

La partie interférométrique du signal, modulée à la fréquence Doppler définie par la vitesse de déplacement du miroir de référence, est ensuite extraite du bruit de fond par détection hétérodyne. On obtient typiquement un signal d'interférences comme celui représenté sur la Figure I.3, dont on peut extraire l'enveloppe. Les positions des maxima de l'enveloppe indiquent alors les positions axiales des différentes structures du milieu alors que leurs intensités correspondent à leurs coefficients de réflexion. En déplaçant le faisceau incident

transversalement sur l'échantillon, il est possible de reconstruire la structure en deux ou trois dimensions de l'objet.

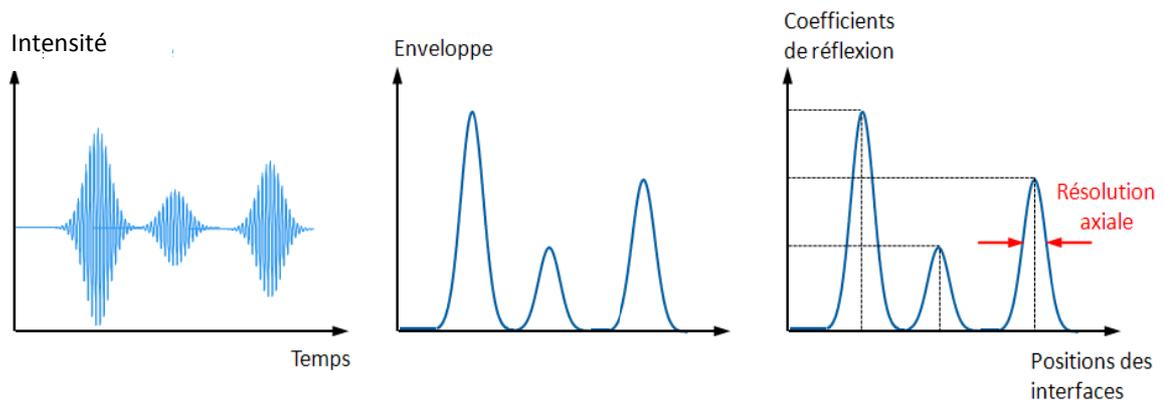


Figure I.3 : Méthode de reconstruction des structures pour un dispositif de TD-OCT.

I.1.2 Les différentes méthodes de balayage

Dans un dispositif d'OCT temporelle, l'extraction de l'information 2D ou 3D du milieu biologique se déroule en deux étapes de balayage : la distribution à une dimension des structures de l'objet selon la direction axiale (i.e. la profondeur) est obtenue par balayage du miroir de référence (A-scan) tandis que la distribution des structures selon la direction transverse est obtenue par déplacement latéral de l'échantillon ou balayage du faisceau d'illumination le long de sa surface (reconstruction 2D par A-scan puis T-scan ou 3D par A-scan puis B-Scan).

Les dispositifs de TD-OCT privilégient le balayage axial du miroir de référence (différents A-scan conduisant à un B-scan). D'autres dispositifs réalisent au contraire le balayage transverse avant le balayage axial (différents T-scan conduisant à un C-scan) : on parle alors d'**OCT en-face** [6, 7]. Ces dispositifs sont utiles pour des échantillons où la détermination de la distribution transverse des structures domine dans le diagnostic.

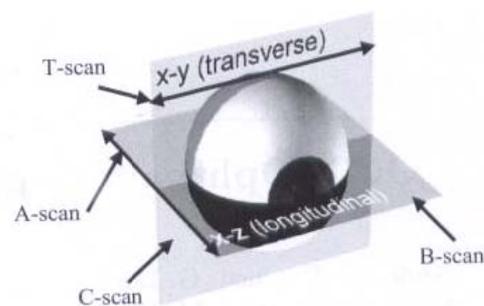


Figure I.4 : Différents techniques de balayage possibles en OCT.

I.1.3 Performances

Différents paramètres permettent de comparer les performances des dispositifs d'imagerie. Pour des applications biomédicales, les quatre paramètres les plus importants sont :

- la *sensibilité de détection*,
- la *résolution spatiale*,
- la *profondeur de pénétration* au sein de l'échantillon,
- la *vitesse d'acquisition* des images.

• Sensibilité de détection

La *sensibilité de détection* d'un dispositif d'OCT est le plus petit signal de rétrodiffusion que le dispositif peut détecter à la limite du bruit. Ce paramètre permet de déterminer le plus petit écart en indice de réfraction que l'on peut détecter au sein de l'échantillon.

En OCT, la sensibilité de détection est très élevée en raison de la nature interférométrique de cette technique. De plus, la méthode de détection hétérodyne de l'OCT temporelle permet de s'affranchir des bruits instrumentaux et d'atteindre la limite du bruit de grenaille (ou *shot noise*), qui correspond typiquement à des coefficients de réflexion minimaux détectables compris typiquement entre 10^{-9} - 10^{-11} selon le type de source lumineuse utilisée. La sensibilité de détection peut s'exprimer selon la formule suivante :

$$SNR = \frac{\rho I_0 R_{éch}}{4eB} \quad (I.1)$$

où ρ est la sensibilité spectrale du détecteur, I_0 la puissance de la source, $R_{éch}$ le coefficient de réflexion de l'échantillon et B la bande passante du système de détection, qui est un paramètre crucial ici.

Notons que la sensibilité de détection est indépendante du coefficient de réflexion du miroir de référence.

• Résolution transverse

Pour un dispositif d'OCT classique, la *résolution transverse* est déterminée, comme pour un dispositif de microscopie traditionnel, par l'ouverture numérique ON de l'optique utilisée pour recueillir le signal rétrodiffusé par l'échantillon biologique.

Elle dérive du critère de Rayleigh, selon l'équation [8] :

$$\Delta x = \Delta y = 0,61 \frac{\lambda_0}{ON} \quad (I.2)$$

En configuration d'OCT temporelle, dans laquelle un profil d'intensité axial est enregistré par translation du miroir de référence, l'ouverture numérique doit être de faible valeur afin que la profondeur de champ soit suffisamment grande pour couvrir toute la profondeur étudiée, puisqu'on ne refait pas la mise au point lors d'un A-scan. C'est pourquoi la résolution transverse en OCT temporelle est assez faible, de l'ordre de $10 \mu\text{m}$.

Notons de plus que la résolution transverse dépend linéairement de la longueur d'onde centrale d'illumination.

• Résolution axiale

La *résolution axiale* d'un dispositif d'OCT est généralement définie par la largeur totale à mi-hauteur (ou FWHM pour *Full Width at Half Maximum*) de l'enveloppe de l'interférogramme (cf. Figure I.3). Cette résolution est donc proportionnelle à la longueur de cohérence temporelle de la source lumineuse puisqu'il ne peut y avoir d'interférences que si la différence de marche accumulée entre les deux bras de l'interféromètre est inférieure à cette longueur de cohérence.

L'interférogramme en sortie d'un dispositif d'OCT est donné par la transformée de Fourier de la densité spectrale de puissance de la source lumineuse détectée. Sa largeur totale à mi-hauteur est donc régie par la relation d'incertitude de Fourier $\Delta z \Delta \lambda \geq K$. Dans le cas particulier d'un spectre de forme gaussienne, la résolution axiale est donnée par (cf. calcul en Annexe A) :

$$\Delta z = \frac{2 \ln 2 \lambda_0^2}{n\pi \Delta\lambda} \quad (I.3)$$

où λ_0 est la longueur d'onde centrale de la source, $\Delta\lambda$ sa largeur spectrale totale à mi-hauteur et n est l'indice du milieu biologique imagé.

Le spectre de la source doit tendre vers une forme gaussienne¹, pour éviter tout rebond dans l'interférogramme, qui engendrerait des échos dans le signal tomographique. La Figure I.5 issue de la référence [8] présente pour différentes sources lumineuses les spectres et transformées de Fourier correspondantes. Le large piédestal de la lampe au xénon permet d'obtenir une transformée de Fourier très étroite (1,1 μm) mais possédant des rebonds du fait des pics présents dans le spectre, qui auront pour effet de créer des artefacts dans les images tomographiques. Au contraire, la forme quasi-gaussienne du spectre d'émission d'une diode superluminescente permet d'obtenir une fonction de cohérence de forme idéale, mais de largeur importante du fait des largeurs spectrales limitées des diodes superluminescentes commerciales, conduisant à des résolutions axiales peu compétitives. Une grande attention doit donc être portée sur le choix de la source lumineuse utilisée pour un dispositif d'OCT, pour avoir une résolution axiale la meilleure possible tout en garantissant un interférogramme sans rebond.

Notons que contrairement à la microscopie confocale, dont la résolution axiale dépend de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope, la résolution axiale d'un dispositif d'OCT ne dépend généralement² que de la longueur d'onde centrale et de la largeur spectrale effective d'illumination.

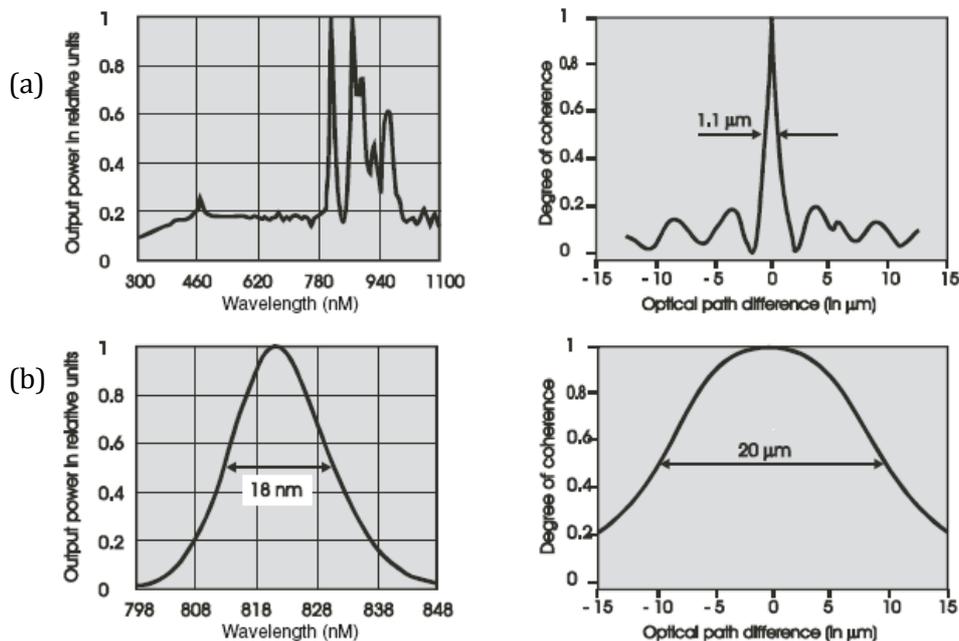


Figure I.5 : Densité spectrale de puissance (à gauche) et transformée de Fourier correspondante (à droite) d'une lampe à arc (a) et d'une diode superluminescente (b) [8].

La longueur de cohérence d'une source étant inversement proportionnelle à sa largeur spectrale, il est judicieux d'utiliser des sources faiblement cohérentes pour optimiser la

¹ Plus précisément, le spectre doit être gaussien dans l'espace des nombres d'onde σ .

² Comme nous le verrons dans la suite, cela n'est vrai que si la profondeur de champ imposée par l'ouverture numérique est grande devant la longueur de cohérence.

résolution axiale du dispositif (d'où le terme d'interférométrie en lumière faiblement cohérente). De nombreux travaux ont été réalisés dans ce sens pour développer des sources lumineuses adaptées à l'OCT afin d'atteindre des résolutions axiales toujours meilleures. Les premiers systèmes d'OCT utilisaient des diodes superluminescentes (SLD), sources infrarouges de largeur spectrale de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres, offrant des résolutions axiales de 10 à 20 microns [1]. L'utilisation de la superfluorescence générée dans des fibres dopées Yb [9] ou Er [10] a permis d'atteindre des résolutions axiales de l'ordre de 15 μm et la combinaison de diodes superluminescentes, décalées spectralement pour obtenir un spectre total de 155 μm , des résolutions axiales de 3 μm [11]. Les développements des lasers femtosecondes ont permis de porter cette résolution au micromètre [10, 12, 13]. Plus récemment, l'utilisation de fibres à cristal photonique permettant la génération de supercontinuum a permis d'atteindre des résolutions axiales submicrométriques [14, 15].

Ces résultats sont résumés dans le Tableau I.1.

Source lumineuse	Longueur d'onde centrale (nm)	Largeur spectrale (nm)	Résolution axiale (μm)
Diode électroluminescente (LED) [16]	800	50	5,7
	1240	40	17
Diode superluminescente (SLD)	675	10	20
	820	50	6
	930	70	6
	1300	35	21
	1550	70	15
Combinaison de SLD [11]	890	155	2,2
Laser femtoseconde			
	Laser Ti : Saphir [13]	810	260
Laser Cr : Fosterite [10]	1280	120	6
Superfluorescence			
	Fibre dopée Yb [9]	1064	30
Fibre dopée Er [10]	1550	100	16
Fibre à cristal photonique [14]	1300	370	2.7
	725	370	0,75
Lampe halogène [17]	800	320	0,9

Tableau I.1 : Historique des sources lumineuses utilisées pour l'OCT temporelle et leurs résolutions axiales respectives dans l'air.

La Figure I.6 est un exemple de l'amélioration de la résolution spatiale des images. Elle présente une coupe tomographique XZ (c'est-à-dire en B-scan) d'une rétine humaine obtenue avec deux dispositifs : la coupe du haut utilise un dispositif commercial de résolution axiale $\sim 10\text{-}15 \mu\text{m}$ et la coupe du bas un dispositif de laboratoire de résolution $\sim 2\text{-}3 \mu\text{m}$. L'amélioration de la résolution axiale dans le second cas est très notable.

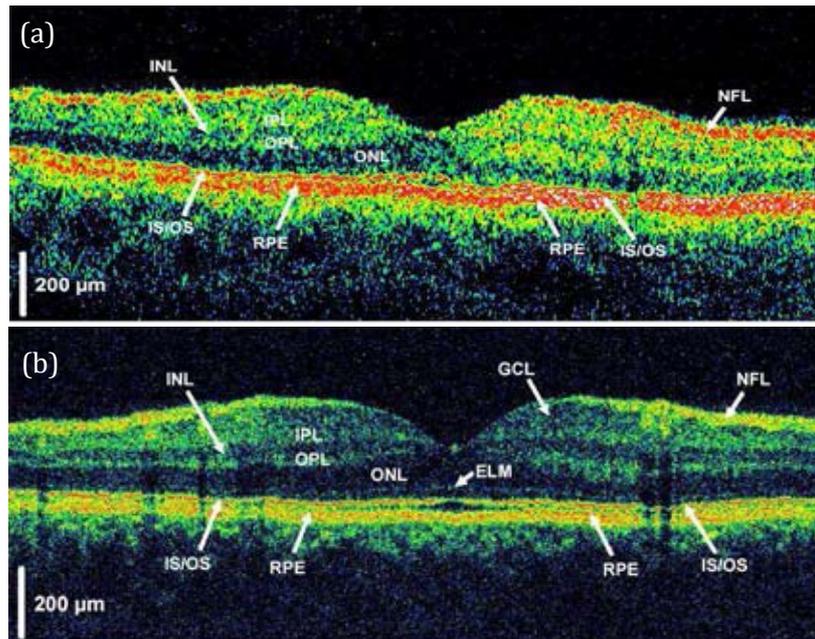


Figure 1.6 : Images de rétine obtenues avec un dispositif Stratus OCT (a) et un dispositif d'OCT à haute résolution (b) [18].

• Profondeur de pénétration / Profondeur d'imagerie

Les milieux biologiques sont généralement constitués d'une assemblée hétérogène de structures de tailles, formes et compositions très diverses. Ces structures affectent la lumière au cours de sa propagation via les phénomènes d'absorption et de diffusion. Il devient alors difficile voire impossible de sonder le milieu au-delà d'une certaine épaisseur. Cette épaisseur définit la *profondeur de pénétration* au sein de l'échantillon. Cependant, en pratique, la profondeur d'imagerie en OCT est bien plus faible que la profondeur de pénétration de la lumière car à partir d'une certaine profondeur les photons ont subis des diffusions multiples et ne contribuent plus au signal utile en OCT. Dans toute la suite de ce manuscrit, la profondeur de pénétration désignera la profondeur d'imagerie accessible.

La profondeur d'imagerie dépend de la dynamique du détecteur et de la puissance de la source d'illumination. En effet, plus cette puissance est importante, plus l'intensité rétrodiffusée par milieu biologique est importante. Cependant, la profondeur de pénétration ne peut être augmentée indéfiniment en augmentant l'intensité lumineuse incidente, par risque d'endommager les tissus superficiels de l'échantillon. Il est donc important d'étudier sa dépendance en fonction de la nature du milieu biologique et des propriétés de la lumière incidente. Cela revient à étudier la propagation d'une onde électromagnétique dans un milieu, c'est-à-dire les interactions entre le champ électromagnétique et les structures du milieu.

Dans une approche d'électromagnétisme classique, où les interactions entre le champ électromagnétique et le milieu sont linéaires et élastiques¹, cette étude s'appuie sur les équations de Maxwell et les phénomènes peuvent être entièrement décrits connaissant l'indice de réfraction complexe du milieu étudié :

$$n(\omega) = n'(\omega) + in''(\omega) \quad (I.4)$$

¹ Cela suppose que les ondes électromagnétiques, avant et après interaction, ont mêmes fréquences.

L'absorption de la lumière dans le milieu est due à la partie imaginaire de l'indice de réfraction du milieu, c'est-à-dire au retard de la réponse que donne le milieu matériel à l'onde qui se propage. Un moyen simple de s'en convaincre et de décrire la composante complexe du champ électrique :

$$\underline{E} = \underline{E}_m \exp i \left(\omega t - n \frac{\omega}{c} z \right) = \underline{E}_m \exp i \left(\omega t - n' \frac{\omega}{c} z \right) \exp \left(-n'' \frac{\omega}{c} z \right) \quad (I.5)$$

Il y a décroissance exponentielle de l'intensité de l'onde électromagnétique au cours de sa propagation. En considérant une intensité initiale I_0 , l'intégration de l'équation précédente sur une épaisseur L donne la loi de Beer-Lambert pour l'intensité transmise par le milieu :

$$I_{tr} = I_0 \exp \left(-2n'' \frac{\omega}{c} L \right) = I_0 \exp(-\mu_a L) \quad (I.6)$$

où μ_a représente le coefficient d'absorption du milieu biologique, qui dépend de la longueur d'onde incidente.

Le coefficient d'absorption de la lumière dans la plupart des milieux biologiques est de l'ordre de $\mu_a \sim 0,1 - 1 \text{ mm}^{-1}$ [19]. Il est dominé par l'absorption de l'eau, constituant principal de ces milieux dont le coefficient d'absorption est minimal autour de 500 nm et a une évolution croissante avec la longueur d'onde (cf. Figure I.7 (a)). On peut déduire de ce coefficient d'absorption l'intensité transmise à travers une épaisseur typique de quelques millimètres d'eau (cf. Figure I.7 (b)). Cette intensité transmise est maximale pour des longueurs d'onde inférieures à 900 nm puis chute sur la gamme de longueur d'onde 900 - 1400 nm, longueur d'onde au-delà de laquelle l'intensité transmise est pratiquement nulle.

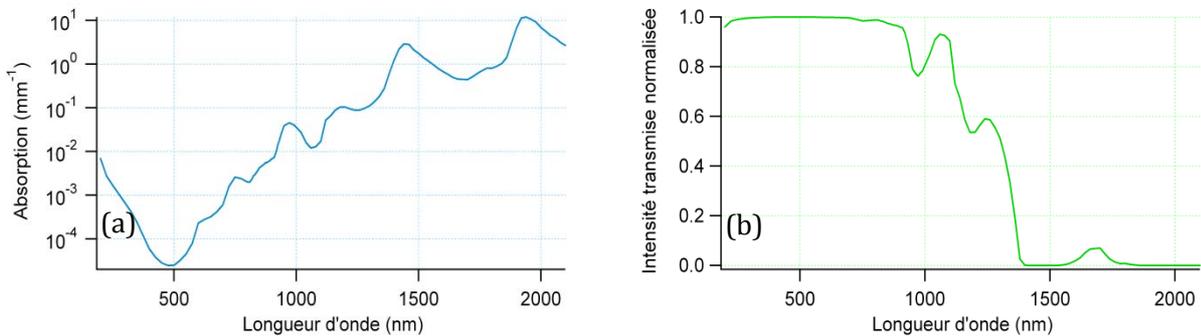


Figure I.7: (a) Coefficient d'absorption de l'eau en fonction de la longueur d'onde incidente. (b) Intensité transmise à travers 6 mm d'eau.

Lorsqu'une onde lumineuse se propage dans un milieu matériel, son champ électrique provoque l'oscillation des nuages électroniques des atomes qui se comportent alors comme des dipôles rayonnants. Chaque dipôle rayonne des ondes sphériques secondaires. L'onde résultante, superposition cohérente de l'ensemble de ces ondes secondaires, possède alors une distribution angulaire d'intensité différente de l'onde incidente et qui dépend fortement de la distribution spatiale des dipôles, de leur taille et de leur gradient d'indice par rapport au milieu environnant. Ce phénomène de redistribution des directions de propagation du champ électrique à la traversée d'un milieu hétérogène est le phénomène de *diffusion* de la lumière.

Le phénomène de diffusion dépend plus ou moins fortement de la longueur d'onde en fonction des dimensions des particules diffusantes. Il est ainsi possible de distinguer trois

grands régimes de diffusion de la lumière selon la taille des particules relativement à la longueur d'onde d'illumination :

- **Diffusion de Rayleigh** : dans ce régime de diffusion, les dimensions spatiales des particules diffusantes sont très inférieures à la longueur d'onde incidente (typiquement inférieures à $\lambda/10$). On peut donc supposer que chaque particule diffusante est soumise à un champ uniforme. Elles rayonnent alors un champ de puissance inversement proportionnelle à la puissance quatrième de la longueur d'onde et dont le flux est équi-réparti entre l'avant et l'arrière de la particule. C'est ce régime de diffusion qui permet entre autre de décrire la couleur bleue du ciel.

- **Diffusion de Mie** : dans ce régime de diffusion, les dimensions spatiales des particules diffusantes sont comparables ou supérieures à la longueur d'onde incidente. La théorie de Mie prend en compte les déphasages entre dipôles, qui ne voient plus le même champ incident au même instant. Le rayonnement diffusé n'est alors plus équi-réparti mais préférentiellement dirigé dans le même sens que l'onde incidente (cf. Figure I.8).

- **Diffusion géométrique** : dans ce régime de diffusion, les dimensions spatiales des particules diffusantes sont très supérieures à la longueur d'onde. Les lois de l'optique géométrique suffisent donc à décrire le rayonnement diffusé : chaque particule se comporte comme une lentille boule. Ce régime est le plus simple à modéliser, mais est rarement mis en jeu dans la plupart des échantillons biologiques imagés en OCT.

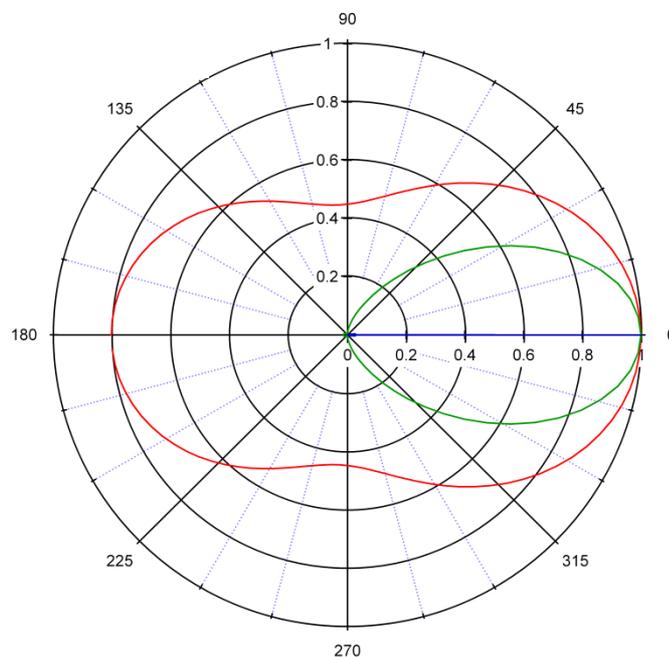


Figure I.8 : Diagrammes de diffusion normalisés dans les trois régimes, simulés à une longueur d'onde d'illumination de 800 nm pour des particules d'indice $n = 1,5$ de diamètre $0,1 \mu\text{m}$ (rouge), $0,5 \mu\text{m}$ (vert) et $10 \mu\text{m}$ (bleu) immergées dans l'eau.

La diffusion de la lumière dans un milieu hétérogène dépend donc du rapport entre la longueur d'onde de l'onde lumineuse incidente et les dimensions des particules constitutives du milieu. Les ordres de grandeur des tailles des principaux constituants biologiques ainsi que le régime de diffusion correspondant sont donnés dans la Figure I.9. Dans ces milieux, les dimensions spatiales, la nature, la répartition spatiale des diffuseurs sont très difficiles à

décrire, rendant le calcul du champ diffusé extrêmement complexe [20, 21]. Généralement, les régimes de diffusion de Mie et de Rayleigh sont en compétition et l'intensité de la lumière diffusée varie en $1/\lambda^k$ où k est un paramètre positif qui dépend des paramètres cités précédemment et doit être déterminé au cas par cas. Dans tous les cas, le phénomène de diffusion est d'autant plus important que la longueur d'onde d'illumination est faible.

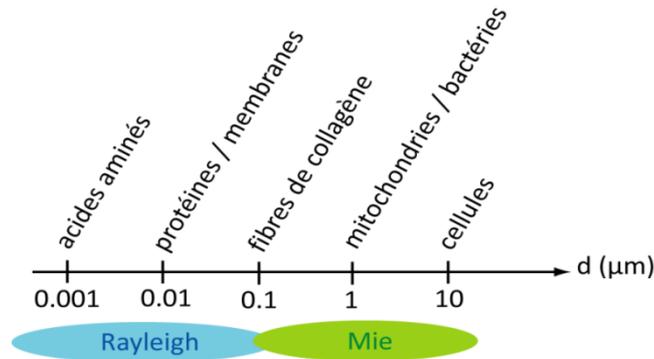


Figure 1.9 : Dimensions typiques des constituants principaux des milieux biologiques et régime de diffusion correspondant.

A propos des théories sur la diffusion ...

La théorie de la diffusion de Rayleigh doit son nom au physicien anglais Lord Rayleigh (1842 - 1919). Ses premiers travaux consistent en l'approche mathématique de l'optique et des systèmes vibratoires, puis s'étendent à pratiquement toute la physique de l'époque : le son, les vibrations, la vision des couleurs, l'électrodynamique, l'électromagnétisme, la diffraction de la lumière, la mécanique des fluides, la viscosité, la capillarité, l'élasticité et la photographie. En 1892, Rayleigh réussit à déterminer les dimensions de certaines molécules par l'étude des couches minces, ce qui lui vaut le Prix Nobel de physique en 1904.



La théorie de la diffusion de Mie doit son nom au physicien allemand Gustav Mie (1869 - 1957). Il est surtout connu grâce à la théorie qui porte son nom (théorie de Mie, également connue sous le nom de théorie de Lorenz-Mie), et qui permet de décrire l'interaction de la lumière avec une particule sphérique. Fondée sur la théorie électromagnétique, la théorie de Mie donne une solution rigoureuse au problème de la diffusion d'une onde plane monochromatique par une sphère.

La description de la diffusion effectuée ici suppose que l'éclairement d'une particule est dû à la lumière incidente et que son éclairement par la diffusion des autres particules est négligeable. Cette hypothèse de calcul correspondant à un régime de *diffusion simple*. Cependant, une partie de la lumière diffusée une première fois par certaines particules peut être rediffusée par d'autres : c'est ce que l'on appelle le régime de *diffusion multiple*. Les photons multi-diffusés parcourent des chemins optiques bien plus importants que les

photons mono-diffusés (ou *photons balistiques*), et peuvent être détectés par un dispositif d'OCT comme provenant d'une profondeur de pénétration erronée (trop grande), ce qui est un facteur très limitant pour la profondeur de pénétration et dont il est difficile de s'affranchir dans les dispositifs d'OCT.

Les deux processus qui limitent la profondeur de pénétration ont donc des comportements inverses vis-à-vis de la longueur d'onde : l'absorption privilégie une meilleure pénétration dans le proche infrarouge (cas des tissus biologiques transparents, faiblement diffusants) alors que la diffusion favorise la pénétration des grandes longueurs d'onde (cas des milieux biologiques hautement diffusants). Idéalement, il faudrait donc choisir, pour chaque milieu biologique, la longueur d'onde qui réalise le meilleur compromis entre ces deux phénomènes afin de maximiser la profondeur de pénétration.

I.1.4 OCT fonctionnelle

La plupart des entités biologiques, quelles que soient leur nature et leur taille, possèdent une géométrie intimement liée à leur fonction biologique. A l'échelle moléculaire par exemple, la fonction enzymatique des protéines détermine leur forme. La détermination de ces fonctions est un paramètre crucial d'un point de vue médical. En effet, des désordres fonctionnels (changements de la circulation sanguine, de la pression en oxygène ou de la concentration en eau des tissus) précèdent généralement des changements morphologiques et leur détermination est d'une grande aide dans le diagnostic de certaines maladies. C'est pourquoi de nouvelles techniques d'OCT ont été élaborées au cours de ces dernières années, couplant le dispositif classique d'imagerie par OCT temporelle à des caractérisations fonctionnelles : la vélocimétrie Doppler dans le cas de l'OCT Doppler ou les propriétés de biréfringence dans le cas de l'OCT en lumière polarisée.

• OCT Doppler

L'effet Doppler est le décalage de fréquence ν_D d'une onde entre la mesure à l'émission et la mesure à la réception dû au mouvement relatif entre l'émetteur et le récepteur. Si l'émetteur et le récepteur s'approchent l'un de l'autre, la fréquence apparente sera plus grande ($\nu_D > 0$). Inversement, si l'émetteur et le récepteur s'éloignent l'un de l'autre, la fréquence apparente sera plus faible ($\nu_D < 0$).

L'OCT Doppler est un dispositif couplant l'OCT temporelle et la vélocimétrie laser [22]. La vélocimétrie laser est une technique optique, basée sur l'effet Doppler, qui mesure le décalage en fréquence entre une onde de référence et une onde rétrodiffusée par une particule en mouvement dans un fluide [23]. Ce décalage en fréquence permet ensuite de remonter à la vitesse de la particule et donc à celle du fluide. Le dispositif Doppler permet l'imagerie de fluides en mouvement dans les milieux hautement diffusants [24, 25] et a ouvert la voie à l'étude des écoulements sanguins aux très petites échelles [26].

A propos de l'effet Doppler ...

L'effet Doppler fut présenté par Christian Johann Doppler (1803 - 1853) en 1842, dans un article (*Über das farbige Licht der Doppelsterne und einige andere Gestirne des Himmels*) décrivant et démontrant le décalage en longueur d'onde de la lumière provenant des étoiles, décalage dû au mouvement relatif de la Terre par rapport à ces étoiles.

De nos jours, l'effet Doppler est utilisé pour détecter et mesurer la vitesse d'un grand nombre d'objets, de la taille atomique jusqu'à la taille galactique.



Certaines propriétés optiques des tissus modifient la polarisation de la lumière au cours de sa propagation et peuvent donc être exploitées pour faire apparaître de nouveaux contrastes d'imagerie :

- la *diffusion*, qui a pour principal effet de dépolariiser la lumière incidente. La mesure de ce taux de dépolariisation a été utilisée comme base d'imagerie des tissus [27].

- la *biréfringence*, qui introduit une différence d'indice de réfraction Δn entre deux ondes polarisées perpendiculairement. La biréfringence dans les milieux biologiques peut être intrinsèque au milieu, causée par des propriétés d'anisotropie (comme par exemple le cristal biréfringent d'hydroxyapatite présent dans l'émail des dents) ou de forme, causée par une anisotropie de géométrie résultant d'une disposition ordonnée de structures linéaires telles que les fibres de collagène ou les fibres musculaires [28]. La plupart des milieux biologiques, tels que les tendons, les muscles, les nerfs, les os ou le cartilage, présentent des propriétés de biréfringence. L'OCT en lumière polarisée (ou **PS-OCT** pour *polarization-sensitive optical coherence tomography*) utilise l'état de polarisation de la lumière rétrodiffusée par l'échantillon pour extraire des informations sur la biréfringence de l'échantillon étudié [29-31]. En effet, la biréfringence modifie l'état de polarisation de façon prédictible, grâce au formalisme des matrices de Mueller : le vecteur polarisation \mathbf{P}' de la lumière rétrodiffusée par un milieu possédant une matrice de Mueller est relié au vecteur polarisation \mathbf{P} de la lumière incidente via la relation :

$$\mathbf{P}' = \mathbf{M}\mathbf{P} \quad (1.7)$$

Les premiers dispositifs de PS-OCT permettaient de mesurer une carte de la biréfringence induite par le myocarde de porc [32, 33]. Désormais, les dispositifs de PS-OCT permettent de déduire la matrice de Mueller 4×4 d'échantillons biologiques [34] et de réaliser des images *in vivo* via un dispositif tout fibré [35].

1.1.5 Les différentes configurations d'OCT

Il existe différentes configurations d'OCT selon la méthode d'acquisition et de traitement du signal interférométrique. Elles diffèrent de la technique d'OCT historique présentée précédemment. Ces différentes méthodes sont résumées dans le Tableau 1.2.

	Description technique	Acronyme
OCT conventionnelle	L'image tomographique (XZ) est acquise dans l'espace temporel par balayage du miroir de référence (Z) et balayage transverse du faisceau (X).	TD - OCT
OCT fréquentielle	L'image tomographique (XZ) est acquise dans l'espace fréquentiel par balayage de la longueur d'onde ou acquisition par un spectromètre (Z) et balayage transverse du faisceau (X).	FD-OCT
OCT plein champ	L'image tomographique (XY) est acquise sans balayage de faisceau.	FF-OCT

Tableau 1.2 : Différentes configurations d'OCT.

Dans la suite de ce chapitre, nous décrirons le principe des configurations d'OCT fréquentielle et plein champ, ainsi que leurs avantages comparatifs.

I.2 Tomographie par cohérence optique fréquentielle

En TD-OCT, on réalise l'acquisition du signal interférométrique dans l'espace temporel par balayage du miroir de référence. Il est également possible d'accomplir la détection sans déplacer le miroir de référence en se plaçant dans l'espace de Fourier conjugué : on parle alors de tomographie par cohérence optique fréquentielle ou **FD-OCT** (pour *Fourier Domain Optical Coherence Tomography*). Ce concept, proposé par Fercher *et al.* en 1995, est basé sur le principe que l'information en profondeur est également codée dans les fréquences de modulation du spectre du signal d'interférences [36, 37]. Le profil axial n'est donc plus enregistré en fonction du temps mais en fonction de la fréquence ou de la longueur d'onde et ne nécessite donc plus de balayage du miroir de référence, ce qui permet un gain en temps d'acquisition considérable par rapport au TD-OCT.

Deux solutions sont possibles pour enregistrer expérimentalement ce profil axial en fonction de la longueur d'onde : l'OCT dans le domaine spectral et l'OCT à balayage spectral. Nous allons les décrire successivement dans ce paragraphe.

I.2.1 OCT dans le domaine spectral

L'OCT dans le domaine spectral ou **SD-OCT** (pour *Spectral Domain Optical Coherence Tomography*) utilise une source lumineuse de grande largeur spectrale et acquiert le spectre du signal d'interférence à l'aide d'un spectromètre, constitué d'un réseau de diffraction et d'une caméra CCD linéaire comme illustré sur la Figure I.10 [37-39].

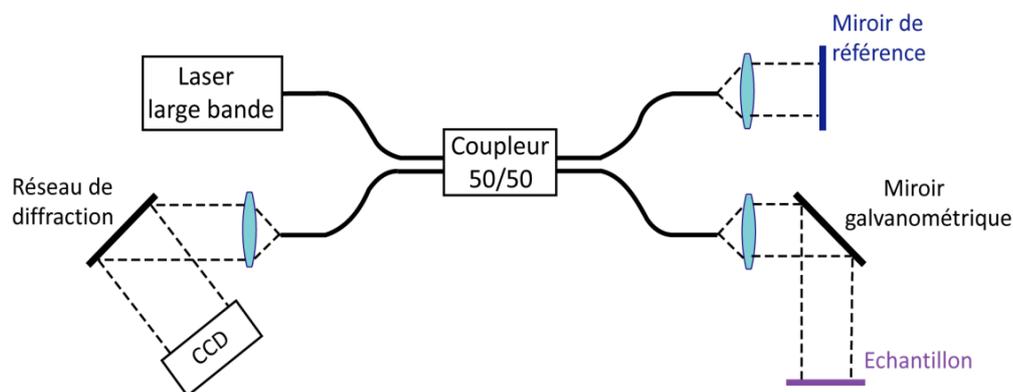


Figure I.10 : Schéma de principe de l'OCT fréquentielle avec spectromètre (SD-OCT).

• Principe de fonctionnement

Un interféromètre de Michelson agit comme un filtre périodique de fréquence, pour lequel la périodicité est une fonction de la différence de chemin optique entre les bras référence et objet. Une source de faible cohérence temporelle est envoyée dans l'interféromètre. Dans le bras objet, les structures de l'échantillon, situées à différentes profondeurs, réfléchissent et/ou rétrodiffusent la lumière alors que dans le bras de référence, la lumière est réfléchi par un miroir de position fixe. Ces faisceaux issus des deux bras de l'interféromètre possèdent un déphasage déterminé par la différence de chemin optique parcourue et donc la

profondeur des structures au sein de l'échantillon. Le signal interférométrique entre ces deux faisceaux sera donc modulé spectralement, avec une période de modulation inversement proportionnelle au déphasage entre les ondes. Les structures situées à des profondeurs différentes vont posséder des déphasages différents et donc produire des périodes de modulation distinctes. En enregistrant le signal interférométrique à l'aide d'un spectromètre, on peut grâce à une transformée de Fourier du signal connaître les déphasages et donc la distribution axiale des structures au sein de l'échantillon, et ceci sans déplacer le miroir de référence.

1.2.2 OCT fréquentielle avec une source à balayage spectral

L'OCT fréquentielle avec une source à balayage spectral ou **SS-OCT** (pour *Swept Source Optical Coherence Tomography*) utilise une source de faible largeur spectrale, accordable en longueur d'onde. L'acquisition consiste dans cette configuration en un balayage de la longueur d'onde d'illumination et l'acquisition du signal interférométrique par un monodétecteur comme illustré sur la Figure I.11 [40-42] : on remplace donc l'acquisition simultanée de toutes les longueurs d'onde à l'aide d'un spectromètre par une acquisition des différentes longueurs d'onde au cours du temps.

• Principe de fonctionnement

Une source de faible largeur spectrale est envoyée dans l'interféromètre de Michelson. Dans le bras objet, les structures de l'échantillon, situées à différentes profondeurs, réfléchissent et/ou rétrodiffusent la lumière alors que dans le bras de référence, la lumière est réfléchi par un miroir de position fixe. Ces faisceaux issus des deux bras de l'interféromètre possèdent un décalage temporel déterminé par la différence de chemin optique parcourue et donc la profondeur des structures au sein de l'échantillon. Comme la fréquence de l'onde d'illumination est balayée au cours du temps, le signal échantillon va posséder un décalage fréquentiel par rapport au signal de référence. En interférant, les deux signaux vont produire un signal modulé à une fréquence déterminée par ce décalage. Les structures situées à des profondeurs différentes vont posséder des décalages différents et donc produire des périodes de modulation distinctes. En enregistrant le signal interférométrique au cours du temps grâce à une photodiode, on peut, grâce à une transformée de Fourier du signal, connaître les différents décalages temporels et donc la la distribution axiale des structures au sein de l'échantillon.

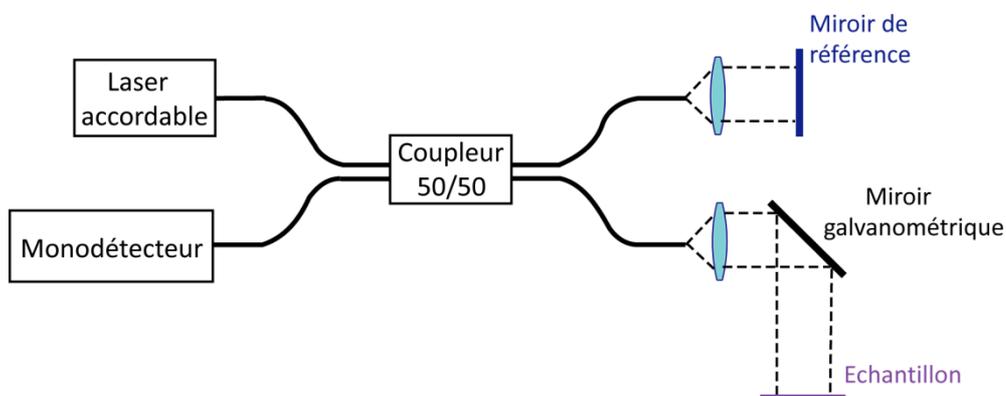


Figure I.11: Schéma de principe de l'OCT fréquentielle avec source accordable.

I.2.3 Avantages du FD-OCT par rapport au TD-OCT

L'intérêt d'une telle détection dans l'espace des fréquences optiques est de ne plus recourir au déplacement mécanique du miroir de référence pour balayer la profondeur de l'échantillon. Un gain en temps d'acquisition considérable est ainsi réalisé par rapport aux techniques d'OCT temporelle conventionnelle, d'un facteur de 50 à 100 [36, 38]. Pour la même raison, à temps d'acquisition égaux, l'OCT fréquentielle permet d'atteindre des sensibilités de détection bien supérieures ou de réaliser l'acquisition sur un volume comprenant plus de pixels puisque l'acquisition est plus rapide [42-44].

Un autre avantage de la technique de FD-OCT est que sa sensibilité de détection ne dépend pas de la largeur spectrale de la source, contrairement au TD-OCT qui doit réaliser un compromis entre la résolution axiale et la sensibilité donc la vitesse d'acquisition.

De ce fait, la technique de FD-OCT est devenue la technique de choix pour toutes les applications cliniques, et est à ce jour la configuration la plus utilisée et la plus commercialisée. Citons par exemple le dispositif Cirrus OCT de Zeiss® (SD-OCT) et le dispositif SS-OCT de Thorlabs®.

La Figure I.12 est un exemple de comparaison à temps d'acquisition égaux entre les dispositifs d'OCT temporelle et fréquentielle, pour lequel le gain en sensibilité de détection du dispositif de FD-OCT apparaît nettement [36].

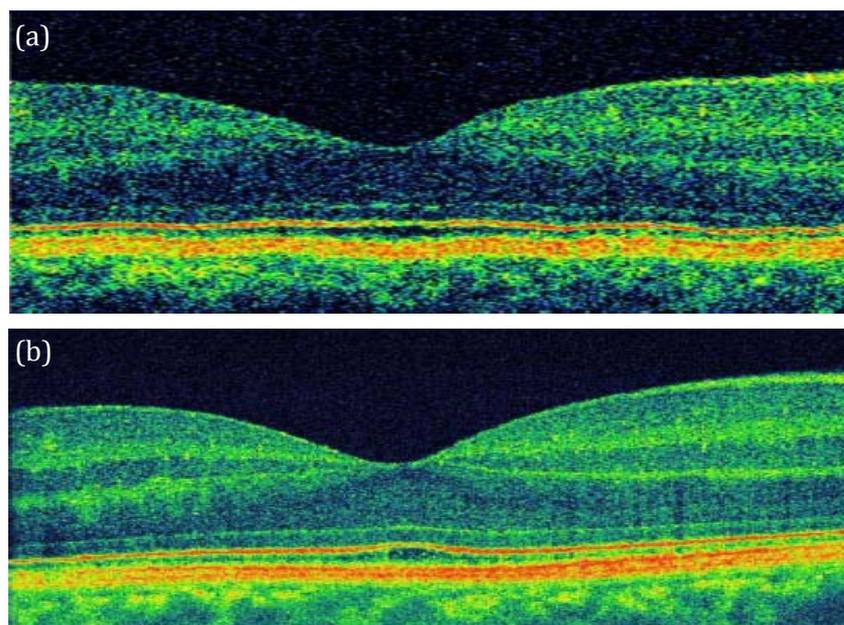


Figure I.12 : Images de rétine obtenues avec un dispositif OCT temporelle (a) et un dispositif d'OCT fréquentielle (b) issues de la référence [36].

I.3 Tomographie par cohérence optique plein champ

I.3.1 Principe

Contrairement aux techniques temporelle usuelle ou fréquentielle, la tomographie par cohérence optique plein champ produit des images en orientation *en-face* (c'est-à-dire perpendiculairement à l'axe optique) et ceci sans balayage transverse du faisceau lumineux

ou de l'échantillon [45]. La détection du signal interférométrique se fait dans tout un plan de l'échantillon à une profondeur donnée et une coupe 2D est directement obtenue. Pour réaliser ces images, l'intégralité du champ est illuminée par une source de faible cohérence spatiale (et temporelle) et acquise sur un détecteur matriciel de type caméra CCD [46].

• Configurations possibles d'OCT plein champ

Plusieurs configurations d'OCT plein champ sont envisageables (cf. Figure I.13).

La première configuration utilisée est le dispositif de type *Michelson* [45]. Dans cette configuration, la lumière issue d'un objectif de microscope est séparée à l'aide d'un cube séparateur¹ entre un bras échantillon, contenant le milieu biologique à étudier, et un bras référence, contenant une surface dite de référence de réflectivité adaptée. Les positions de l'objectif de microscope et de la surface de référence sont réglées de telle façon que la surface de mise au point coïncide avec la surface de référence. Les distances de travail des objectifs de microscope étant relativement courtes (de l'ordre de quelques millimètres), ce dispositif possède l'avantage d'être très compact, donc très stable mécaniquement. L'utilisation d'un objectif de faible ouverture numérique est cependant nécessaire pour avoir une distance frontale suffisamment grande pour focaliser le faisceau en dehors du cube séparateur et avoir peu d'aberrations, ce qui limite considérablement la résolution transverse de ce type de dispositif.

Une deuxième configuration possible est un dispositif de type *Mirau*. Dans cette configuration, l'objectif de microscope contient une lame séparatrice placée dans le faisceau convergent. Du fait de sa finesse, la lame séparatrice n'introduit pas d'aberrations notables, contrairement à un cube séparateur, et permet de travailler avec des objectifs de plus grande ouverture numérique, donc de meilleures résolutions transverses. Cependant, ce montage compact présente deux inconvénients majeurs :

- la partie centrale de l'objectif est occultée par le miroir de référence, ce qui réduit l'ouverture numérique effective de l'objectif ainsi que le flux parvenant à l'échantillon et le flux collecté par l'objectif
- l'impossibilité d'utiliser des objectifs à immersion, qui rend la dispersion due à la traversée du milieu biologique difficile à compenser.

Une troisième configuration possible est un dispositif de type *Linnik*. Dans cette configuration, deux objectifs de microscope identiques sont placés dans les bras de l'interféromètre, après séparation de la lumière par un cube séparateur². Les objectifs pouvant être amenés au plus près de l'échantillon ou de la surface de référence, des objectifs de grande ouverture numérique peuvent être utilisés, permettant d'obtenir des résolutions transverses élevées. La réflectivité du miroir de référence peut être adaptée selon l'échantillon étudié, permettant d'optimiser le contraste du signal interférométrique et donc la sensibilité de détection du dispositif. La différence de marche et la focalisation dans chaque bras de l'interféromètre peuvent également être réglées de façon totalement indépendante. Des objectifs à immersion dans l'eau peuvent être utilisés afin de minimiser la dispersion entre les deux bras, éventuelle disparité de dispersion qui peut être compensée

¹ Par rapport à une lame séparatrice, l'utilisation d'un cube séparateur évite l'utilisation d'une compensatrice.

² Les objectifs de microscope travaillant à l'infini, il n'y a pas d'aberrations engendrées par la séparation dans ce type de configuration.

par l'ajout d'une lame de verre d'épaisseur adaptée. Ce type de configuration est donc très modulaire, idéale pour une expérience de recherche.

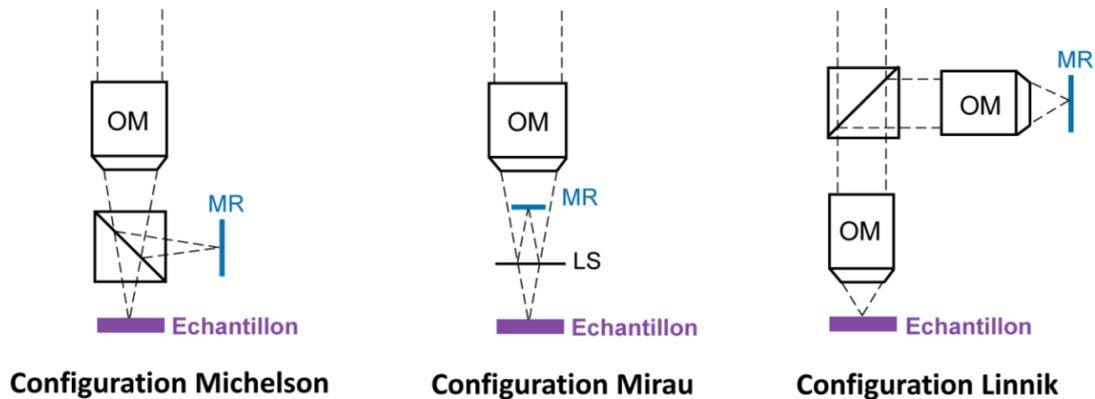


Figure I.13 : Trois configurations possibles pour le dispositif d'OCT plein champ.
MR : miroir de référence ; LS : lame séparatrice.

• Acquisition des images tomographiques : méthode à décalage de phase

Les images tomographiques sont obtenues par extraction de l'enveloppe du signal interférométrique. En OCT plein champ, cette extraction est réalisée par une *méthode à décalage de phase* : plusieurs images interférométriques déphasées les unes par rapport aux autres (par exemple par déplacement de la surface de référence ou par un modulateur photo-élastique) sont acquises puis combinées pour obtenir l'image tomographique. Plusieurs méthodes de décalage de phase ont été développées pour l'OCT plein champ, utilisant un nombre variable d'images interférométriques (typiquement de 2 à 7 images) et un déphasage discret ou continu [46-49]. Dans le cas où le déphasage introduit entre chaque image interférométrique est discret, la phase est modifiée entre chaque acquisition. Dans le cas où cette modification est induite par un déplacement mécanique, cette technique est limitée en vitesse d'acquisition et ne sera adaptée qu'à l'imagerie d'échantillons statiques. Le déphasage peut également être introduit de façon continue, l'image interférométrique étant acquise alors que la phase change. Cette technique permet d'atteindre des vitesses d'acquisition plus élevées, seulement limitées par la fréquence de travail de la caméra, mais nécessite des temps d'acquisition pour l'exposition suffisamment court pour que l'intégration de l'image pendant cette durée ne brouille pas les interférences. Cette technique nécessite donc l'utilisation d'une source lumineuse plus puissante ou d'un détecteur plus sensible.

Dans la suite de ces travaux, nous serons amenés à utiliser une méthode à décalage de phase continu à 2 images, dont le principe est décrit dans le chapitre suivant.

I.3.2 Performances

• Résolution transverse

Un dispositif d'OCT plein champ acquiert les images comme un microscope conventionnel. De ce fait, une résolution transverse élevée peut être atteinte grâce à l'utilisation d'objectifs de microscope de grande ouverture numérique (Equation I.2). En pratique, des objectifs à immersion dans l'eau d'ouverture numérique comprise entre 0,3 et 0,5 permettent d'obtenir des résolutions transverses de l'ordre du micromètre [17].

Dans les dispositifs d'OCT fréquentielle et la plupart des dispositifs d'OCT temporelle, la profondeur de champ doit être du même ordre de grandeur que la profondeur de pénétration souhaitée au sein de l'échantillon, ce qui nécessite des optiques de focalisation de faible ouverture numérique. C'est pourquoi les techniques classiques d'OCT temporelle et fréquentielle présentent une résolution transverse 10 à 20 fois inférieure à celle d'un dispositif d'OCT plein champ.

• Résolution axiale

Comme pour les dispositifs d'OCT temporelle et fréquentielle, la résolution axiale d'un dispositif d'OCT plein champ est essentiellement imposée par la longueur de cohérence temporelle de la source lumineuse¹, via l'équation I.3.

Cependant, pour un dispositif d'OCT plein champ, la résolution axiale n'est pas exclusivement dépendante de la longueur de cohérence de la source d'illumination [50, 51]. L'ouverture numérique des objectifs de microscope influe également sur la résolution axiale. Ainsi, dans le cas général, la résolution axiale d'un dispositif d'OCT plein champ est déterminée à la fois par la longueur de cohérence de la source et l'ouverture numérique $ON = n \sin \alpha$ des objectifs de microscope par la relation [47, 52] :

$$\frac{1}{\Delta z} = \left[\frac{n\pi}{2 \ln 2} \frac{\Delta \lambda}{\lambda^2} + \frac{2n(1 - \cos \alpha)}{\lambda} \right]^{-1} = \frac{1}{\Delta z_1} + \frac{1}{\Delta z_2} \quad (I.8)$$

On peut alors évaluer la contribution des deux termes impliqués dans la résolution axiale pour une longueur d'onde centrale d'illumination de 0,8 μm et une large spectrale de 300 nm (caractéristiques de la caméra CCD au silicium utilisée au cours de ces travaux), des objectifs à immersion dans l'eau possédant des ouvertures numériques comprises entre 0,1 et 0,9. Les résultats sont regroupés dans le Tableau I.3. Dans la pratique, les objectifs de microscope utilisés ont des ouvertures numériques comprises entre 0,3 et 0,5. Pour ces valeurs, la résolution axiale est essentiellement déterminée par la cohérence temporelle : la résolution axiale pourra être déterminée avec une très bonne approximation par l'équation I.2.

Ouverture numérique	Δz_1 (μm)	Δz_2 (μm)	Δz (μm)
0,1	0,71	106,2	0,70
0,5	0,71	4,1	0,60
0,9	0,71	1,1	0,44

Tableau I.3 : Résolution axiale théorique d'un dispositif d'OCT plein champ, en tenant compte de la cohérence temporelle et de la cohérence spatiale.

• Sensibilité de détection

Les performances d'un dispositif d'OCT dépendent fortement de la sensibilité de détection, notamment pour la détection de structures faiblement rétro-diffusantes.

Dans le cas d'un dispositif d'OCT plein champ, la capacité de charge des pixels de la caméra CCD utilisée pour réaliser l'acquisition est un paramètre crucial. En effet, lorsque les pixels

¹ En OCT plein champ, la source lumineuse doit également présenter une faible cohérence spatiale pour limiter tout phénomène de tavelures (ou *speckle*) qui pourrait apparaître dans le champ.

sont proches de la saturation, le bruit de photons devient le bruit prépondérant et le bruit des images tomographiques est alors directement proportionnel à la capacité de charges des pixels (un calcul détaillé est réalisé dans le chapitre suivant). De plus pour un dispositif d'OCT plein champ, et contrairement à un dispositif d'OCT temporelle, la sensibilité de détection ne dépend pas de la largeur spectrale de la source lumineuse. Ainsi, un choix judicieux des paramètres du détecteur permet d'atteindre des sensibilités de détection de l'ordre de 90 dB et ce quelle que soit les propriétés spectrales de la source utilisée.

I.3.3 Bilan : avantages et inconvénients de l'OCT plein champ

Les détecteurs utilisés en OCT plein champ permettant l'acquisition d'images en parallèle (c'est-à-dire simultanée) sur de nombreux pixels. Ceci peut sembler être un avantage par rapport aux techniques d'OCT nécessitant un balayage transverse du faisceau. Cependant, le nombre de photons que peut acquérir chaque pixel d'un détecteur matriciel est très faible par rapport à celui que peut acquérir un monodétecteur. De ce fait, et grâce aux luminances élevées des sources cohérentes spatialement (par exemple une diode superluminescente ou un laser femtoseconde), l'OCT fréquentielle permet d'atteindre des sensibilités de détection plus élevées que l'OCT plein champ à temps d'acquisition similaires. Par contre, en OCT temporelle, en raison du compromis à réaliser entre la résolution axiale et la vitesse d'acquisition, des sensibilités de détection comparables à l'OCT plein champ sont obtenues pour des temps d'acquisition similaires.

De plus, le temps d'acquisition de chaque image tomographique en OCT plein champ, dépendant de la fréquence de travail de la caméra CCD et du nombre d'accumulations nécessaire à une sensibilité de détection élevée, est relativement long : de l'ordre de la seconde, ce qui est supérieur aux techniques d'OCT fréquentielle. Les mouvements de l'échantillon vont alors brouiller partiellement ou totalement le signal interférométrique. Cet effet est par contre négligeable en OCT conventionnelle, pour laquelle les vitesses d'acquisition sont suffisamment rapides par rapport aux vitesses de déplacement de l'échantillon pour conserver le signal interférométrique intact.

Les avantages principaux du dispositif d'OCT plein champ sont sa simplicité et son coût : une lampe halogène à filament de tungstène suffit, là où les dispositifs d'OCT temporelle ou fréquentielle nécessitent l'utilisation de sources femtosecondes ou supercontinuum. Des résolutions spatiales sub-micrométriques sont de plus facilement accessibles, et ceci dans les trois directions, contrairement aux dispositifs d'OCT temporelle et fréquentielle dont la résolution transverse est souvent 10 à 20 fois inférieure, du fait de l'utilisation d'optiques de faible ouverture numérique.

Il existe quatre paramètres importants permettant de comparer les performances des dispositifs d'imagerie par OCT :

- la sensibilité de détection
- la résolution spatiale
- la profondeur de pénétration
- la vitesse d'acquisition des images

Il est alors possible de représenter ces quatre grandeurs sur un diagramme type diagramme radar. En prenant pour variables la sensibilité de détection, la vitesse d'acquisition, la profondeur de pénétration et la résolution spatiale, un dispositif d'OCT sera d'autant plus performant que son aire dans le diagramme sera importante. La Figure I.14 présente les caractéristiques comparées des trois dispositifs d'OCT : TD-OCT (système de

Michelson Diagnostics), FD-OCT (système Cirrus HD-OCT de Zeiss) et de FF-OCT (système de LLTEch).

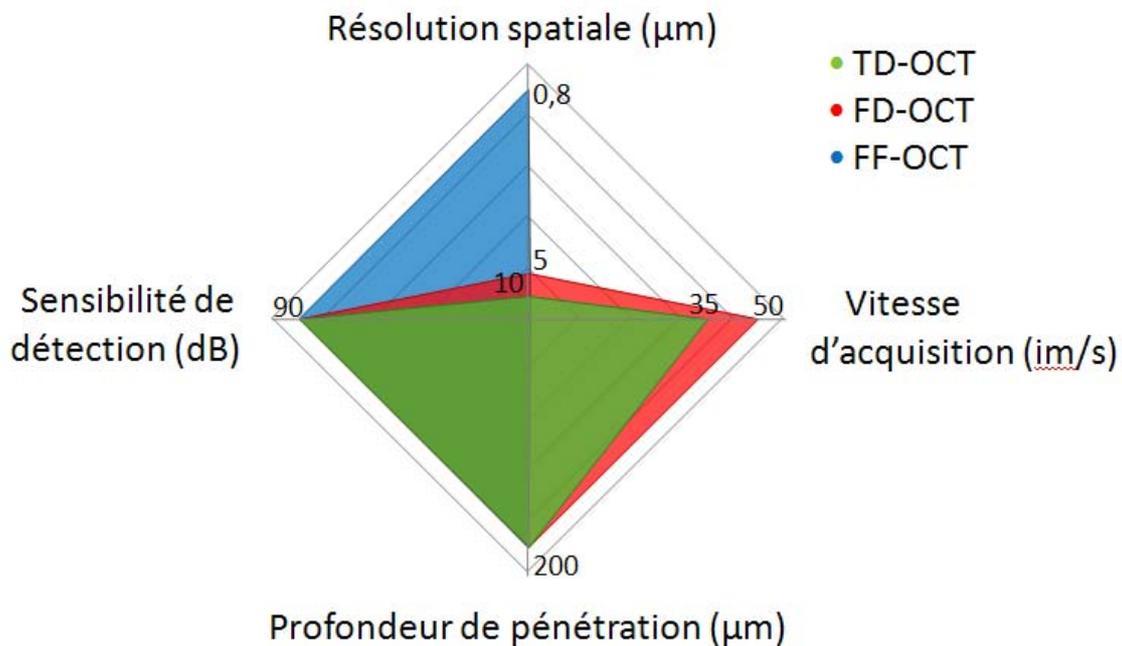


Figure I.14 : Diagrammes radar comparatifs des trois configurations d'OCT.

Notons que les quatre paramètres représentés dans le diagramme n'ont pas été placés de manière aléatoire, mais en fonction de leur interdépendance. Par exemple, la sensibilité de détection d'un dispositif d'OCT plein champ est d'autant plus grande que le nombre d'images interférométriques accumulées pour réaliser l'image tomographique est grand (cf. équation II.14). En contrepartie, la vitesse d'acquisition des images tomographiques est inversement proportionnelle au nombre d'images accumulées. Il faut trouver un compromis pour le nombre d'images accumulées permettant de satisfaire au mieux, pour ces deux paramètres, les exigences de l'imagerie biologique. De la même façon, une longueur d'onde élevée favorise une plus grande profondeur de pénétration dans les milieux fortement diffusants. Cependant, la résolution axiale est quant à elle proportionnelle au carré de cette longueur d'onde moyenne (Equation II.11); il faudrait donc augmenter fortement la largeur spectrale pour maintenir la résolution axiale.

I.4 Applications de la tomographie par cohérence optique

La tomographie par cohérence optique a initialement été développée pour l'ophtalmologie [2, 53]. Cependant, les avancées de cette technologie ont permis son utilisation dans de nombreux autres domaines. Le secteur biomédical demeure toujours dominant [54, 55], mais de nouvelles applications ont également été proposées dans des domaines non médicaux [6, 56].

I.4.1 Applications dans le domaine médical

• Tomographie par cohérence optique en ophtalmologie

L'ophtalmologie demeure le domaine d'applications privilégié de la tomographie par cohérence optique. Les principales raisons de cet engouement sont :

- la transmission élevée du milieu oculaire, qui permet d'atteindre des profondeurs de pénétration de l'ordre du millimètre,
- la sensibilité interférométrique et la résolution spatiale micrométrique de la technique d'OCT, qui permettent de résoudre la plupart des structures d'intérêt de l'œil,
- l'indépendance de la résolution axiale avec l'ouverture numérique du faisceau sonde, qui permet d'imager les structures de l'œil, notamment la rétine, avec une résolution axiale élevée bien que l'ouverture numérique soit très limitée par la taille de la pupille de l'œil.

Pour ces raisons, l'utilisation d'instruments commerciaux d'OCT est devenue monnaie courante, au même titre que les techniques traditionnelles lors d'un examen ophtalmologique (citons entre autres les dispositifs Cirrus OCT et Stratus OCT de Zeiss® et le dispositif SS-OCT de Thorlabs®). L'instrument commercialisé par Carl Zeiss Meditec, le Cirrus HD-OCT® (dispositif de FD-OCT), permet ainsi de réaliser des coupes tomographiques *in vivo* avec une résolution d'environ 5 μm (cf. Figure I.15) et une vitesse d'acquisition de 25000 A-scan/s. Cette vitesse d'acquisition très élevée permet de réaliser facilement des examens cliniques *in vivo*, cependant la résolution doit être sensiblement améliorée afin de détecter certaines maladies pathologiques touchant les structures intra-rétiniennes, non résolues avec 5 μm .



Figure I.15 : Instrument commercial Cirrus HD-OCT® de Carl Zeiss Meditec.

En laboratoire, un certain nombre d'applications ont été réalisées dans le domaine de l'ophtalmologie, notamment pour le diagnostic de pathologies [13, 57].

Les Figure I.16 et Figure I.17 présentent respectivement des coupes tomographiques obtenues par OCT plein champ à haute résolution d'une cornée et d'une rétine de rat *ex vivo*.

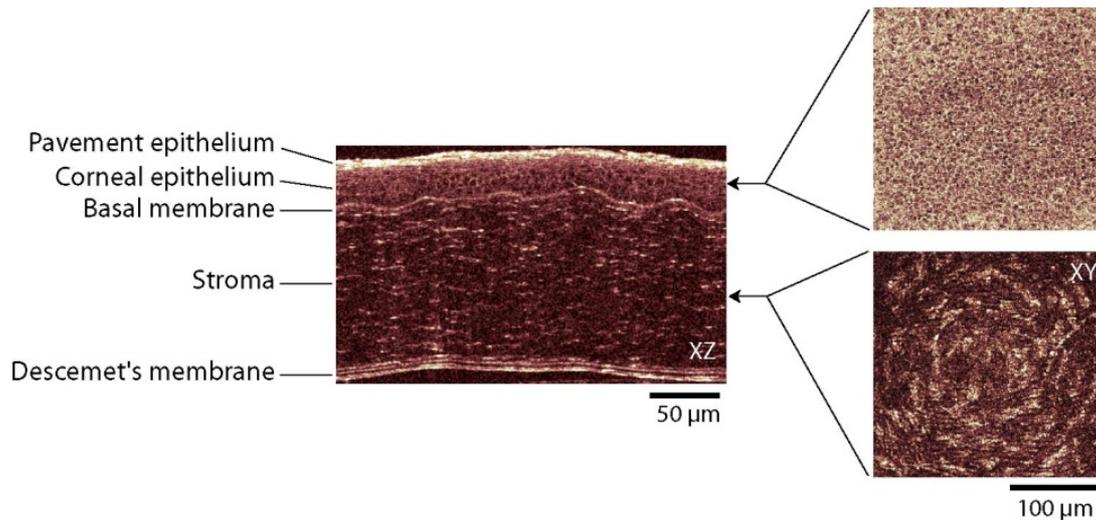


Figure I.16 : Images tomographiques obtenues par OCT plein champ en reconstruction axiale (à gauche) et transverse (à droite) d'une cornée de rat *ex vivo*.

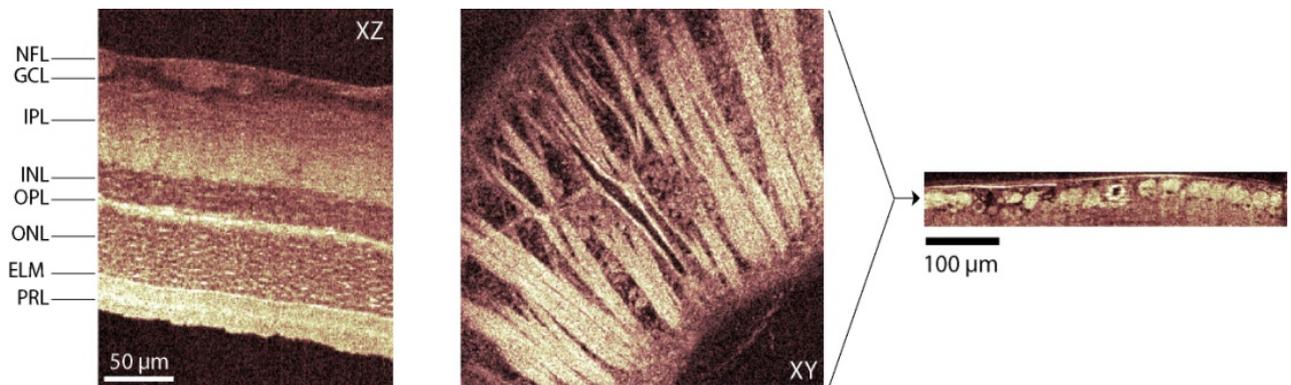


Figure I.17 : Images tomographiques obtenues par OCT plein champ d'une rétine de rat *ex vivo* (à droite) et coupe transverse des différentes couches du nerf optique (à droite) [58].

• Tomographie par cohérence optique dans les autres domaines médicaux

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, de nombreuses variantes du dispositif d'OCT originel ont été développées, offrant le choix de l'orientation des images et la possibilité d'une reconstruction en trois dimensions. De nombreux progrès ont également été réalisés en termes de résolution spatiale, de sensibilité de détection et de vitesse d'acquisition des images tomographiques, ainsi que du point de vue du traitement numérique des images. Grâce à ces avancées, la tomographie par cohérence optique est désormais présente dans un large domaine d'applications. Citons comme exemple la dermatologie [59], le dentaire [60], la gastro-entérologie [61], l'imagerie interne des tissus par endoscopie [62] ainsi qu'en biologie du développement [48].

1.4.2 Applications dans le domaine non médical

L'interférométrie en lumière faiblement cohérente a trouvé depuis de nombreuses années des applications dans le domaine industriel, et plus particulièrement dans la caractérisation des états de surface et des épaisseurs de matériaux divers et la mesure de déplacements.

L'OCT permet de la même façon une évaluation non destructive de la porosité et de l'état de surface général de matériaux polymères composites [63], ainsi que des peintures et vernis utilisés dans les œuvres d'art, nécessaire à une restauration et conservation du patrimoine efficace [6].

Récemment enfin, un dispositif d'OCT plein champ a également permis un relevé d'empreintes digitales [56].

I.5 Conclusion

La tomographie par cohérence optique est une technique éprouvée d'imagerie biomédicale, qui peut être utilisée dans des domaines d'applications très variés. Elle présente l'avantage de pouvoir visualiser *in situ* la structure des tissus sans excision, comme dans les techniques classiques d'histologie et de biopsie, ni marquage par des fluorophores. Dans certaines configurations, l'OCT permet également de visualiser la structure des tissus *in vivo* et peut donc être utilisée comme une aide à l'opération chirurgicale. L'OCT peut de plus être couplée à une large variété d'instruments tels qu'endoscopes ou cathéters, qui permettent une imagerie des organes internes.

Alors que les OCT temporelle et fréquentielle produisent des images en coupe axiale, l'OCT plein champ réalise des images en coupe transverse. Cette technique utilise une simple lampe blanche, au lieu de sources laser sophistiquées ce qui en fait un outil d'imagerie de choix. Cependant, de nombreux points restent à améliorer dans cette technique, telle que la profondeur de pénétration ou la vitesse d'acquisition pour les applications *in vivo*, améliorations que nous avons réalisées au cours de ces travaux de thèse.

II. Amélioration de la profondeur de pénétration - Tomographie par cohérence optique plein champ sur deux gammes de longueurs d'onde

La tomographie par cohérence optique est une technique d'imagerie biomédicale maintenant bien établie, dont les performances continuent néanmoins de s'améliorer :

- des résolutions spatiales submicrométriques comparables à la microscopie confocale sont désormais accessibles grâce à l'utilisation des développements de la physique des lasers pour l'OCT conventionnelle, tels que les lasers femtosecondes [13] ou la génération de supercontinuum dans les fibres à cristal photonique [14, 64, 65], ou de diodes électroluminescentes [47] ou de lampes blanches [48] pour l'OCT plein champ

- des vitesses d'acquisition suffisamment rapides pour permettre des applications *in vivo* en OCT conventionnelle [66, 67] et en OCT plein champ [57] sont possibles. A temps d'acquisition égaux, des sensibilités de détection et des volumes d'imageries supérieures avec une meilleure définition sont accessibles.

Cependant, cette technique demeure limitée par sa profondeur de pénétration, qui n'excède pas le millimètre dans la plupart des milieux biologiques et dépend fortement de la nature de ce milieu. Au cours de ces travaux de thèse, nous avons cherché à améliorer la profondeur de pénétration d'un dispositif d'OCT plein champ, que l'échantillon biologique étudié soit faiblement ou hautement diffusant.

Pour cela, il faut tout d'abord comprendre les phénomènes physiques mis en jeu dans la limitation de la profondeur de pénétration. La profondeur de pénétration dépend de l'absorption et de la diffusion de la lumière au sein du milieu biologique. L'absorption de la lumière par les tissus est principalement due à l'absorption par l'eau, le sang ou la mélanine. Cette absorption présente un minimum, ou *fenêtre thérapeutique*, vers $0,6 \mu\text{m}$ et a, au-delà, une tendance croissante avec la longueur d'onde (cf. Figure II.1).

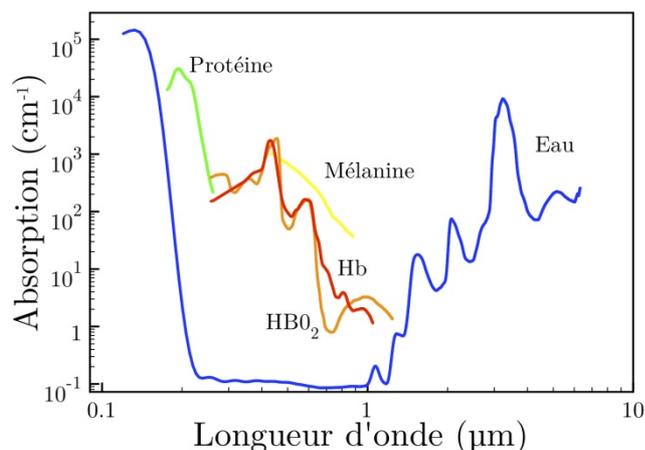


Figure II.1 : Spectres d'extinction des principaux constituants des milieux biologiques. La zone la plus transparente, ou *fenêtre thérapeutique*, se situe autour de 600 nm .

La diffusion de la lumière dans un milieu biologique est quant à elle due à la diffusion par les particules dont il est constitué. De façon assez générale, l'intensité de la lumière diffusée varie en $1/\lambda^k$ où k est un paramètre positif qui dépend de la taille des particules diffusantes (de quelques nanomètres pour les acides aminés à quelques dizaines de micromètres pour les cellules), de leur géométrie et de leur indice de réfraction (entre 1,35 et 1,45). Ainsi, la diffusion dans les milieux biologiques décroît avec la longueur d'onde, comme illustrée par la Figure II.2, qui présente un circuit imprimé vu à $0,8 \mu\text{m}$ (gauche) et $1,3 \mu\text{m}$ (droite) au travers de $3,1 \text{ mm}$ d'intralipid, solution utilisée pour simuler la diffusion par les tissus biologiques [68, 69].

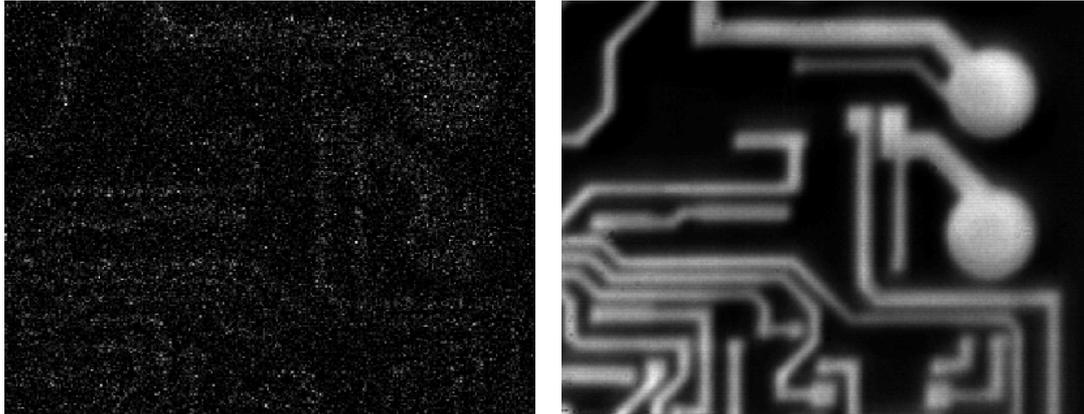


Figure II.2 : Images tomographiques (XY) obtenues simultanément en OCT plein champ à $0,8 \mu\text{m}$ (gauche) et $1,3 \mu\text{m}$ (droite) d'un circuit imprimé imagé au travers de $3,1 \text{ mm}$ de solution d'intralipides.

Les deux processus qui limitent la profondeur de pénétration ont donc des comportements assez différents vis-à-vis de la longueur d'onde : l'absorption privilégie une meilleure pénétration du proche infrarouge (cas des milieux biologiques transparents, faiblement diffusants) alors que la diffusion favorise la pénétration des grandes longueurs d'onde (cas des milieux biologiques hautement diffusants). L'illumination doit donc être adaptée à la nature de l'échantillon biologique étudié, avec deux cas extrêmes qui fixent la plage de longueurs d'onde intéressante : proche infrarouge pour les milieux faiblement diffusants et infrarouge plus lointain pour les milieux hautement diffusants [70].

C'est pourquoi, nous avons mis en place un dispositif expérimental d'OCT plein champ fonctionnant simultanément sur deux gammes de longueurs d'onde (centrées respectivement autour de $0,8 \mu\text{m}$ et $1,2 \mu\text{m}$), qui permet de garantir une profondeur de pénétration optimale quelle que soit la nature du milieu biologique, et en s'inspirant notamment des travaux déjà effectués en OCT conventionnelle [15, 71].

Ce système pourrait de plus permettre d'étudier la réponse spectroscopique à $0,8$ et $1,3 \mu\text{m}$ des milieux biologiques imagés, ce qui permettrait d'augmenter le contraste des images, de mieux discriminer les tissus via leurs propriétés spectroscopiques et/ou de fournir des informations supplémentaires sur la composition de l'échantillon [72-75].

Dans ce chapitre, nous présenterons le principe de fonctionnement, la mise en place expérimentale et les performances de ce dispositif d'OCT plein champ sur deux gammes de longueur d'onde, ainsi que les images comparatives obtenues sur différents échantillons.

II.1 Dispositif expérimental : présentation et caractérisation

II.1.1 Principe général : détecteurs Si et InGaAs

En OCT plein champ, l'acquisition des images est généralement réalisée à l'aide d'une caméra CCD (*Charge Coupled Device*). Le fonctionnement d'un tel détecteur peut être expliqué par le modèle simplifié suivant : chaque pixel du détecteur correspond à un élément semi-conducteur. Si un photon incident apporte à un électron de la bande de valence (BV) de ce semi-conducteur l'énergie suffisante pour le faire passer dans la bande de conduction (BC), l'électron franchi alors le gap du semi-conducteur, créant un courant détectable par des transistors à effet de champ. En recombinaison le courant lu sur chaque pixel, on peut alors reconstruire une image à deux dimensions.

L'énergie d'un photon étant directement proportionnelle à sa fréquence, la réponse spectrale d'un capteur CCD ne dépend que de la nature du semi-conducteur qui le constitue. Ainsi, deux semi-conducteurs d'énergie de gap (E_g correspondant à la différence entre l'énergie du bas de la bande de conduction et l'énergie du haut de la bande de valence) différentes permettront de réaliser des images tomographiques en OCT plein champ sur deux gammes spectrales différentes.

Les caméras CCD à base de Silicium (Si) sont couramment utilisées en OCT plein champ pour sonder la plage spectrale 0,7 – 0,8 μm [17, 48]. Ces caméras ont par contre une réponse spectrale sérieusement dégradée au-delà de 1 μm , comme présenté sur la Figure II.3. Pour des longueurs d'onde supérieures au micromètre, les caméras à base d'Arséniure d'Indium Gallium (InGaAs) remplacent les caméras à base de Silicium [76, 77] et permettent de sonder la plage spectrale 0,9 – 1,7 μm . En utilisant ces deux types de caméras, il est donc possible de réaliser un dispositif d'OCT plein champ sensible sur deux gammes de longueurs d'onde, appelé de manière simplifiée par la suite dispositif d'OCT plein champ à deux longueurs d'onde.

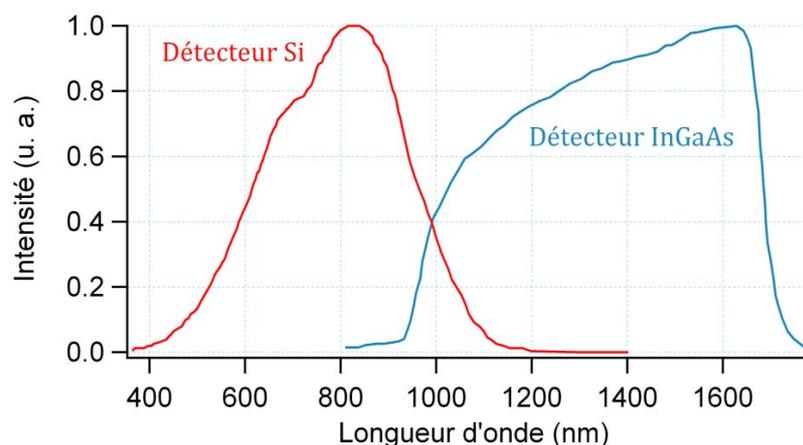


Figure II.3 : Réponses spectrales des détecteurs à base de semi-conducteurs Si et InGaAs.

II.1.2 Montage expérimental

Le dispositif expérimental utilisé pour le montage d'OCT plein champ à deux longueurs d'onde est présenté sur la Figure II.4. Il est réalisé sur une table optique montée sur supports pneumatiques, afin d'absorber toute vibration.

Les trois éléments du montage (la source lumineuse, l'interféromètre et le système d'acquisition) sont décrits plus en détail dans la suite.

• La source lumineuse

Une source lumineuse pour l'OCT plein champ doit posséder les caractéristiques suivantes :

- une longueur d'onde centrale d'émission optimisée par rapport au maximum de sensibilité du détecteur et une large bande spectrale d'émission, pour optimiser la résolution axiale du dispositif
- une puissance suffisante pour atteindre la saturation du détecteur
- un spectre lisse, idéalement gaussien dans l'espace des nombres d'onde pour éviter tout artefact dans l'interférogramme (transformée de Fourier du spectre effectif du dispositif) qui dégraderait la résolution axiale
- une très bonne stabilité temporelle, pour maximiser la sensibilité de détection.

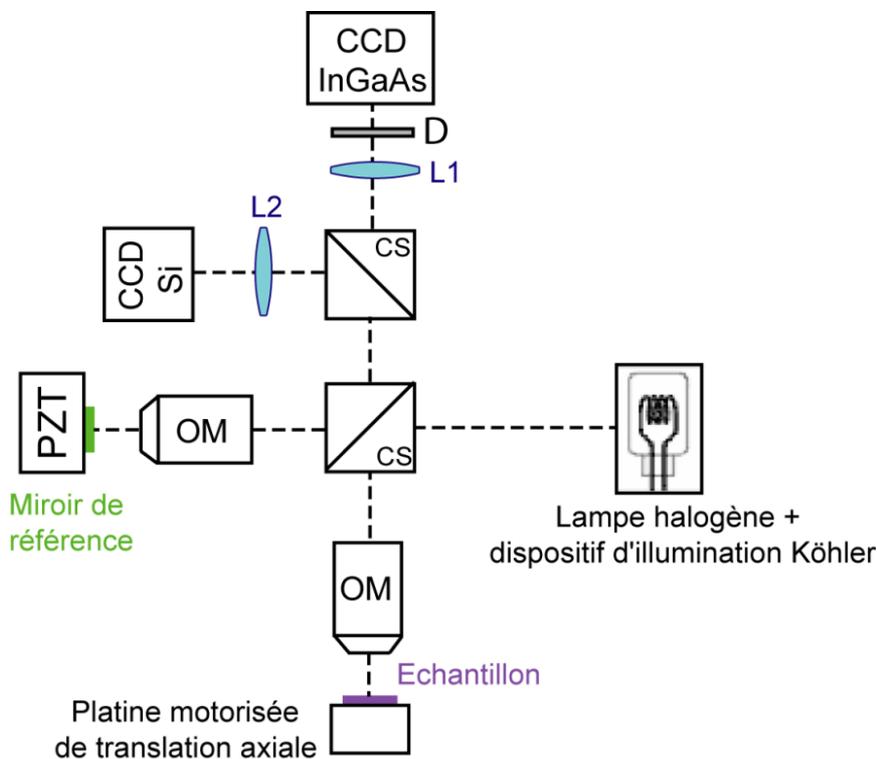


Figure II.4 : Dispositif expérimental pour la tomographie par cohérence optique plein champ à deux longueurs d'onde. CS : cube séparateur, OM : objectif de microscope, PZT : transducteur piézoélectrique, L1 et L2 doublets achromatiques, D : densité.

En prenant en compte ces critères, notre choix s'est porté sur une lampe halogène. En effet, le spectre d'émission d'une ampoule halogène à filament de tungstène peut être modélisé par le spectre d'émission d'un corps noir de température proche de 3200 K. Un tel spectre s'étend du visible jusqu'à l'infrarouge et possède un maximum d'émission dans le proche infrarouge, autour de 800 nm. Cette source lumineuse est donc bien adaptée au dispositif d'OCT plein champ à 0,8 et 1,3 μm puisque le spectre couvre la réponse spectrale des deux caméras (cf. Figure II.5). Une ampoule halogène présente également les avantages d'être compacte, robuste et de coût très faible.

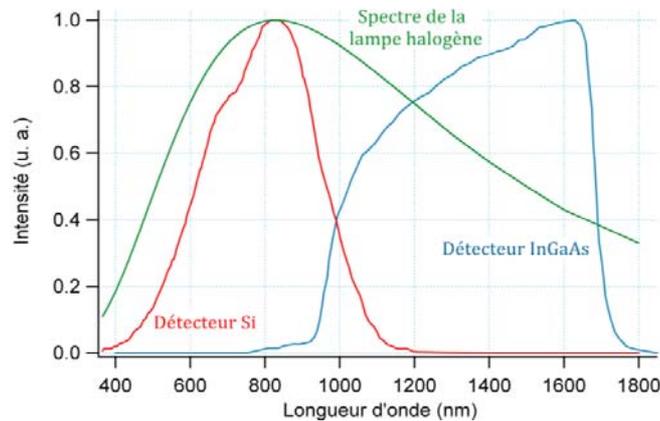
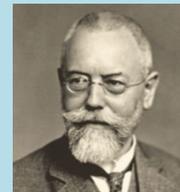


Figure II.5: Réponses spectrales des détecteurs à base de semi-conducteurs Si et InGaAs ainsi que de la lampe halogène utilisée pour l'illumination du dispositif d'OCT plein champ.

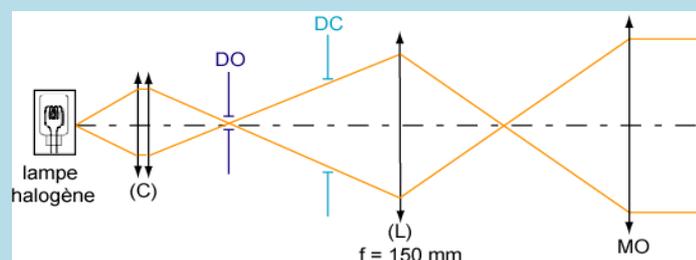
La source lumineuse choisie pour le dispositif est une lampe halogène à filament de tungstène de 100 W, alimentée par une alimentation de puissance stabilisée (successivement une batterie de voiture et une alimentation stabilisée Fontaine S3300 0-30V, 30A) pour obtenir un éclairage constant durant toute la durée de l'acquisition. Cette stabilité temporelle est cruciale en OCT plein champ à décalage de phase, où l'image tomographique est obtenue par combinaison d'images acquises à des instants différents. La source est de plus intégrée dans un dispositif d'illumination Köhler pour permettre un éclairage uniforme de l'échantillon. Dans ces conditions, la source délivre à la sortie du dispositif d'illumination Köhler une puissance lumineuse de l'ordre de 3 W sur le spectre utile, ce qui conduit à un éclairement dans le bras objet de l'interféromètre de Linnik typiquement de l'ordre de 10 mW/cm^2 .

A propos du dispositif d'illumination Köhler ...

Le dispositif d'illumination Köhler est un dispositif utilisé pour éclairer les microscopes classiques, qui doit son nom au physicien allemand August KÖHLER (1866 – 1948), un des pionniers de la microscopie.



Le principe de l'éclairage Köhler est de rejeter l'image du filament de la source à l'infini dans l'espace objet. Pour cela, on forme tout d'abord l'image de la source à travers un condenseur dans le plan d'un diaphragme, appelé *diaphragme d'ouverture* (DO), qui permet de contrôler la cohérence spatiale de l'éclairage. Cette image est ensuite elle-même conjuguée avec le plan focal arrière de l'objectif de microscope, qui en reforme donc l'image à l'infini, assurant ainsi l'uniformité de l'éclairage sur l'échantillon. Un second diaphragme, appelé *diaphragme de champ* (DC), permet d'ajuster la taille de la zone éclairée de l'objet au champ imagé.



• L'interféromètre de Linnik

L'élément séparateur du faisceau incident dans l'interféromètre de Linnik est un cube achromatique non polarisant (Thorlabs, référence BS017) caractérisé, pour une incidence normale, par une transmission moyenne de $50\% \pm 10\%$ sur la gamme de longueurs d'onde 700 – 1100 nm (cf. Figure II.6). Il est monté sur un support possédant un mouvement de rotation et un mouvement de pivot sur deux axes (Newport, référence Ultima UGP-1), permettant ainsi de positionner parfaitement la face d'entrée du cube perpendiculaire au faisceau incident. Une fois ce réglage effectué, on tourne légèrement le cube séparateur pour que les réflexions parasites sur les faces du cube ne coïncident pas avec l'image interférométrique.

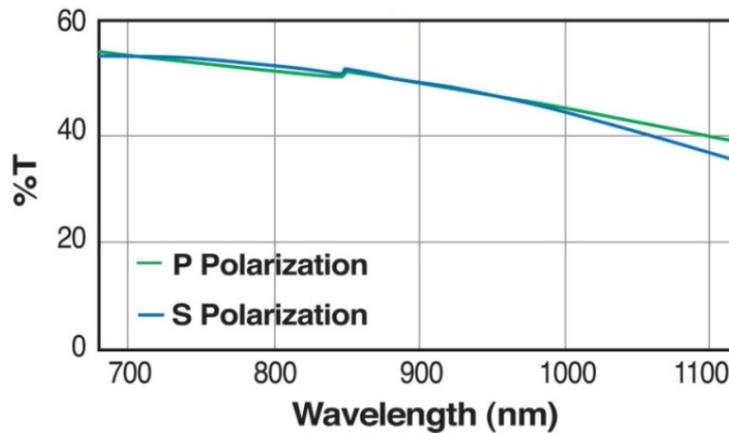


Figure II.6 : Courbe de transmission du cube séparateur (données Thorlabs).

Dans les bras de l'interféromètre de Linnik se trouvent deux objectifs de microscope, identiques afin de minimiser tout écart de dispersion et de maximiser le recouvrement entre les fronts d'onde interférant. Le choix de ces objectifs influe sur le champ observé, via le grossissement, et sur la résolution transverse, via l'ouverture numérique (équation I.1). Une grande ouverture numérique permet d'améliorer la résolution transverse, mais entraîne en contrepartie des aberrations importantes lorsqu'on image à grande profondeur à cause des inhomogénéités de l'indice de réfraction au sein de l'échantillon. Il faut donc trouver un compromis pour minimiser les aberrations tout en ayant une résolution transverse la meilleure possible. Après plusieurs essais, notre choix s'est finalement porté sur des objectifs à immersion dans l'eau, d'ouverture numérique 0,3 et de grossissement 10× (Olympus, référence UMPLFL 10XW/0.3). Les milieux biologiques étant principalement constitués d'eau [78], l'utilisation d'objectifs à immersion dans l'eau a plusieurs intérêts. Tout d'abord, l'utilisation d'une solution minéralisée de type sérum physiologique limite la dégradation des échantillons, permettant ainsi d'accroître les durées d'observation. De plus, les objectifs à immersion dans l'eau permettent de minimiser la réflexion à la surface de l'échantillon, qui dans l'air sature les caméras (cf. Figure II.19 et

Figure II.20) et la dissymétrie de dispersion entre les deux bras de l'interféromètre, qui réduit la résolution axiale et le contraste des interférences. Enfin, avec des objectifs de microscope à air, lorsque l'objet est translaté axialement pour imager en profondeur, une partie de la différence de marche dans l'air est remplacée par une différence de marche dans l'échantillon, d'indice de réfraction supérieur à celui de l'air. Cela entraîne un décalage entre le plan de mise au point de l'objectif (ou plan de focalisation) et le plan de cohérence (plan

correspondant à la différence de marche nulle), comme illustré sur la Figure II.7, décalage d'autant plus important que la profondeur de milieu biologique traversée est grande. Les interférences, localisées dans le plan de cohérence, perdent alors en contraste puisqu'elles ne coïncident plus avec le plan de mise au point, et il est donc nécessaire, dès quelques dizaines de micromètres de profondeur, de réajuster la coïncidence de ces deux plans [77]. Avec des objectifs à immersion dans l'eau d'ouverture numérique modeste, ce phénomène est minimisé, facilitant ainsi la mise en place du dispositif d'OCT plein champ [79]. Les objectifs de microscope utilisés dans ce dispositif ne sont pas optimisés dans l'infrarouge. Cela signifie en particulier que leurs traitements antireflets ne sont pas parfaits : la transmission chute ainsi de 81% à 800 nm à 59% à 1300 nm. De même, les aberrations ne sont pas corrigées à 1300 nm, ce qui risque de dégrader la résolution transverse et le contraste des images.

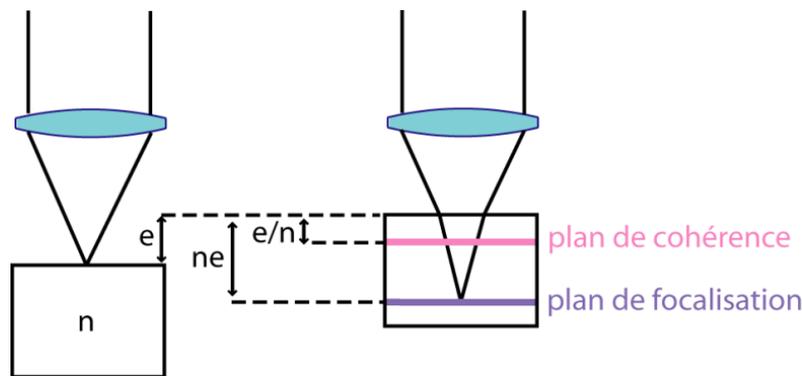


Figure II.7 : Décalage entre les plans de focalisation et de cohérence. Cas d'un milieu d'indice n translaté d'une distance e et imagé par un objectif à immersion dans l'air.

Dans le bras de référence de l'interféromètre se trouve un transducteur piézoélectrique qui permet de réaliser le décalage de phase. Sur ce transducteur, on vient placer dans le plan focal de l'objectif de microscope une surface plane de réflectivité uniforme. Au cours de ces travaux, plusieurs surfaces de réflectivités différentes ont été utilisées (barreau de $Y_3Al_5O_{12}$ couramment appelé YAG, lame de verre ...), suivant la nature de l'échantillon étudié. On a cherché à utiliser à chaque fois une référence ayant une réflectivité proche de celle de l'échantillon, afin de maximiser le contraste des franges d'interférences (une discussion plus détaillée du choix de la surface de référence sera faite lors de l'étude de la sensibilité de détection). Dans le bras objet de l'interféromètre, se trouve deux platines de translation micrométrique permettant de déplacer l'objet dans les deux directions du plan transverse, ainsi qu'une platine de translation axiale, motorisée et commandée par ordinateur, permettant l'acquisition de piles d'images tomographiques (Micro Contrôle, ITL09).

• Le système d'acquisition

Comme nous l'avons expliqué précédemment, deux types de détecteurs sont nécessaires pour réaliser des images tomographiques à deux longueurs d'onde. Notre choix s'est porté pour la caméra CCD Si, sensible dans la région spectrale autour de 800 nm, sur le modèle CA-D1 de Dalsa (256×256 pixels, 8 bits, fréquence maximale de 200 Hz, capacité de charge des pixels de 120 000 électrons) et pour la caméra CCD InGaAs, sensible dans la région spectrale autour de 1300 nm, sur le modèle SU320MS de Sensor Unlimited (320×256 pixels, 12 bits, fréquence maximale de 50 Hz, capacité de charge des pixels de 800 000 électrons).

Un second cube séparateur achromatique, identique au premier et placé en sortie de l'interféromètre, permet d'envoyer la lumière simultanément sur ces deux caméras, via un doublet achromatique réalisant la conjugaison. La focale de ce doublet doit être choisie afin de ne pas perdre en résolution transverse. Le critère choisi ici est que la réponse percussionnelle (PSF pour *Point Spread Function*) à travers l'objectif de microscope doit être imagée par le dispositif optique (constitué des objectifs en retour et du doublet achromatique) sur au moins deux pixels des caméras. Les objectifs Olympus possèdent une focale équivalente f_1 (évaluée, pour les deux gammes de longueurs d'onde, en mesurant le grandissement d'un montage afocal constitué de l'objectif de microscope et d'une lentille de focale connue). En considérant le dispositif optique {objectif de microscope + doublet de focale f_2 }, la taille y_2 de l'image d'un objet de taille y_1 vaut :

$$y_1 f_2 = y_2 f_1 \quad (\text{II.1})$$

En notant p la taille d'un pixel de la caméra et PSF le rayon de la PSF, on doit donc avoir :

$$y_2 = 2p = PSF \frac{f_2}{f_1} \Leftrightarrow f_2 = \frac{2p}{PSF} f_1 \text{ où } PSF = 0.61 \frac{\bar{\lambda}}{ON} \quad (\text{II.2})$$

On peut alors calculer la focale du doublet achromatique, connaissant la longueur d'onde moyenne $\bar{\lambda}$ et la taille de pixel pour chaque caméra :

	Caméra Si	Caméra InGaAs
Longueur d'onde centrale (nm)	820	1300
PSF (μm)	1,7	2,6
Taille du pixel (μm)	16	25
Focale de l'objectif (mm)	17,9	19,5
Focale adaptée (mm)	340	370

Tableau II.1 : Focales calculées par le critère de Shannon-Nyquist pour chaque dispositif.

Notre choix s'est porté sur des doublets achromatiques de focale 300 mm (Thorlabs AC254-300-B ou C). Cette focale est légèrement inférieure à celle calculée à partir de l'équation (II.2), ce qui impliquera un léger sous-échantillonnage par les pixels des détecteurs. Ce choix a été dicté par des contraintes de champ, relativement faible avec des doublets de focale 300 mm ($236 \times 236 \mu\text{m}^2$ pour la caméra Si et $436 \times 349 \mu\text{m}^2$ pour la caméra InGaAs), et qui l'aurait été d'autant plus avec des doublets de focale supérieure. Les deux doublets sont de plus respectivement optimisés dans le proche infrarouge (650 – 1050 nm) pour la caméra Si et l'infrarouge (1050 – 1620 nm) pour la caméra InGaAs, afin de minimiser au maximum les aberrations. Enfin, comme la focale des objectifs est légèrement différente aux deux longueurs d'onde (quelques dizaines de micromètres, dus aux aberrations chromatiques des objectifs), le doublet L1 permettant de projeter l'image tomographique sur la caméra InGaAs est reculée de 2,5 cm par rapport à la position correspondante du doublet L2 utilisé pour projeter sur la caméra Si. Ce déplacement entraîne des aberrations optiques (puisque le doublet n'est plus utilisé dans la conjugaison infini-foyer pour laquelle il est corrigé), mais qui sont négligeables compte tenu de la profondeur de champ du doublet (environ 2 cm). En revanche, les objectifs présentent des aberrations à 1300 nm.

Une densité variable est également ajoutée devant la caméra InGaAs, caméra la plus sensible, pour égaliser les flux reçus par les deux détecteurs (i.e. la saturation des deux détecteurs a lieu pour la même intensité d'illumination).

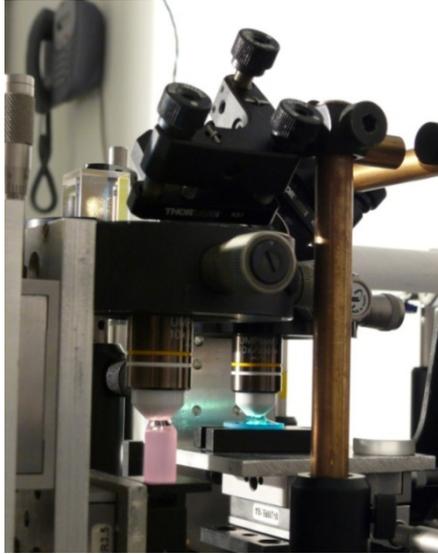


Figure II.8 : Photographie de l'interféromètre de Linnik du dispositif expérimental.

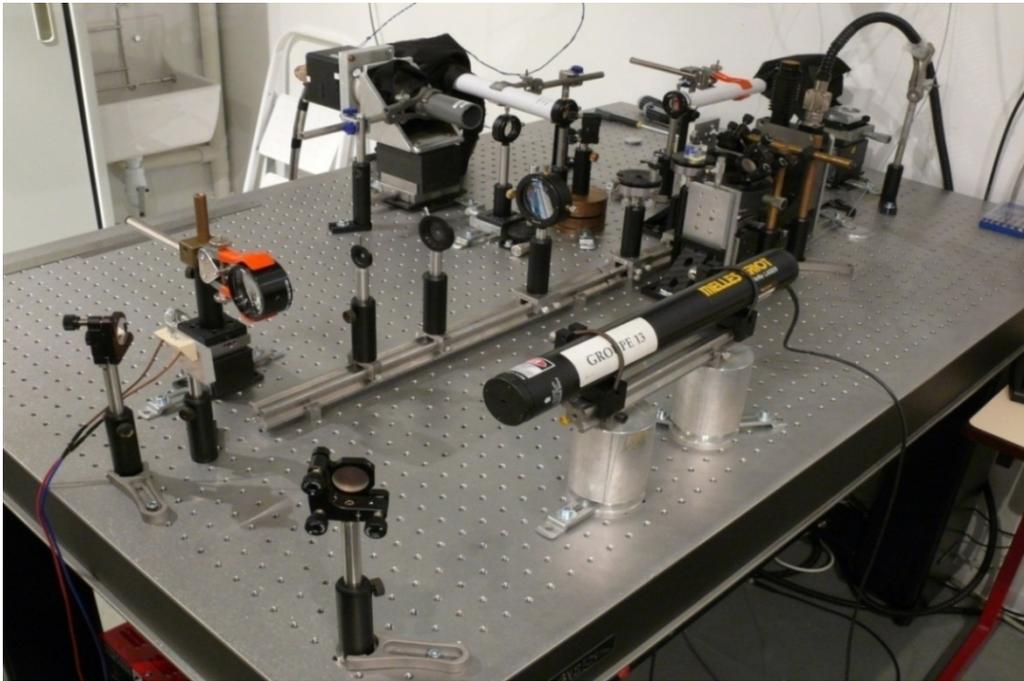


Figure II.9 : Photographie du dispositif d'OCT plein champ à deux longueurs d'onde.

II.1.3 Calcul des images tomographiques et traitements numériques

Dans ce paragraphe, nous présentons la méthode utilisée pour extraire l'image tomographique des images interférométriques acquises par les deux caméras CCD du dispositif expérimental, ainsi que les traitements numériques développés pour améliorer la qualité de ces images.

• Calcul de l'image tomographique : méthode à décalage de phase

L'intensité lumineuse perçue par chaque pixel (x,y) des caméras peut s'écrire sous la forme (signal d'interférences à deux ondes) :

$$I(x, y) = K \frac{I_0}{8} \left[R_{réf} + R_{inc}(x, y) + R_{coh}(x, y) + 2 \sqrt{R_{réf} R_{coh}(x, y)} \cos \phi(x, y) \right] \quad (II.3)$$

où I_0 est l'intensité lumineuse à l'entrée de l'interféromètre, K un coefficient qui prend en compte les différentes pertes (transmission des objectifs et réflexions parasites sur les composants optiques), $R_{réf}$ est le coefficient de réflexion (uniforme) de la surface de référence, $R_{inc}(x, y)$ le coefficient de réflexion équivalent à la proportion de lumière arrivant sur les caméras mais n'interférant pas (lumière venant de la zone hors volume de cohérence de l'objet et des réflexions parasites éventuelles) et $R_{coh}(x, y)$ le coefficient de réflexion équivalent à la proportion de lumière provenant du volume de cohérence dans l'échantillon.

L'information nécessaire pour l'image tomographique est contenue dans le terme $R_{coh}(x, y)$: c'est lui qu'il faut extraire de l'image interférométrique. La méthode la plus classique pour effectuer cela est basée sur un décalage de phase des images interférométriques, par exemple en déplaçant axialement le miroir de référence [17] ou en jouant sur la polarisation des images en sortie de l'interféromètre [31]. L'image tomographique est ensuite déduite par combinaison de ces différentes images. On parle alors d'OCT plein champ à décalage de phase. Un certain nombre d'algorithmes de décalage de phase ont été proposés, utilisant 2, 4 voire 7 images [46, 48, 80] acquises successivement ou simultanément.

Pour le dispositif d'OCT plein champ à deux longueurs d'onde, le décalage de phase est réalisé grâce à un transducteur piézoélectrique (PZT) et l'acquisition de deux images. Le transducteur piézoélectrique induit une oscillation sinusoïdale du miroir de référence, induisant ainsi une modulation sinusoïdale de la phase :

$$I(x, y, t) = K \frac{I_0}{8} \left[R_{réf} + R_{inc}(x, y) + R_{coh}(x, y) + 2 \sqrt{R_{réf} R_{coh}(x, y)} \cos(\phi(x, y) + \psi \sin(2\pi f t)) \right]$$

où ψ est l'amplitude de la modulation de phase et f la fréquence d'oscillation du transducteur piézoélectrique.

Les caméras CCD sont synchronisées avec l'oscillation du transducteur, à une fréquence de fonctionnement double ($2f$), grâce à deux générateurs (Agilent, modèle 33220A). Ainsi, au cours d'une oscillation du miroir de référence, deux images interférométriques sont acquises, correspondant à l'intégration du signal sur deux demi-périodes de modulation. En pratique, on acquiert en fait N séries de deux images pour améliorer le rapport signal sur bruit :

$$I_1 = \eta N \int_0^{T/2} I(x, y, t) dt \quad \text{et} \quad I_2 = \eta N \int_{T/2}^T I(x, y, t) dt \quad (II.5)$$

où η représente l'efficacité quantique du détecteur CCD considéré et $T = 1/f$ la période d'oscillation du transducteur.

En intégrant ces équations, après avoir développé le cosinus en série de fonctions de Bessel du premier ordre, et en prenant la différence au carré, on obtient l'image tomographique :

$$(I_1 - I_2)^2(x, y) = 4(N\xi_{sat})^2 \frac{R_{réf} \cos^2 \phi(x, y)}{(R_{réf} + R_{inc}(x, y))^2} R_{coh}(x, y) \quad (II.6)$$

On peut ainsi extraire l'information nécessaire à partir de l'acquisition et de la combinaison de deux images¹, réalisable numériquement très rapidement. Expérimentalement,

¹ Dans un dispositif à décalage de phase à deux images, le terme de phase $\cos^2 \phi$ n'est pas éliminé : les franges d'interférences demeurent dans les images tomographiques. Cependant, au vue de la taille et de la distribution des structures dans un échantillon biologique, aucune frange n'est visible sur les images interférométriques.

l'acquisition et le traitement des images sont réalisés à l'aide d'un programme développé en Visual C++.

Notons que le critère de stabilité de la source lumineuse postulé précédemment prend ici tout son sens : le flux envoyé sur l'échantillon ne doit absolument pas varier entre les deux images en opposition de phase pour que tout ce que nous avons écrit soit possible. Une variation de flux entraîne un fond non nul sur les images tomographiques, limitant ainsi le contraste et la sensibilité. Il peut même faire apparaître des structures qui ne correspondent à aucune information structurelle réelle.

• Traitement numérique : transformée de Hilbert

Dans le cas de certains échantillons, comme par exemple les fibres de papier ou de cheveux, la reconstruction de l'image tomographique à l'aide de seulement deux images tomographiques en opposition de phase ne permet pas d'éliminer la modulation de l'enveloppe par les interférences, correspondant au terme de phase ϕ de l'équation (II.6). Une méthode à décalage de phase utilisant quatre images en quadrature de phase est possible [48] mais double le temps d'acquisition nécessaire par rapport à la méthode à deux images. Une seconde solution, adoptée ici, est de réaliser un traitement numérique des images *a posteriori*. Ce traitement, basé sur la transformée de Hilbert, s'est inspiré des travaux de Na *et al* [49].

Considérons l'intensité de l'image tomographique détectée par un pixel (x, y) d'une des caméras CCD du montage :

$$(I_1 - I_2)(x, y) = A\sqrt{R_{coh}(x, y)}\cos\phi \quad (\text{II.7})$$

En calculant la transformée de Hilbert de l'image tomographique, qui a pour effet dans l'espace réciproque de tourner de 90° les composantes de fréquence négative, on obtient :

$$TH[I_1 - I_2](x, y) = A\sqrt{R_{coh}(x, y)}\sin\phi \quad (\text{II.8})$$

On peut donc par combinaison de l'image tomographique et de sa transformée de Hilbert s'affranchir complètement de la modulation de l'enveloppe par les interférences, et cela sans acquisition d'images supplémentaires :

$$(I_1 - I_2)^2(x, y) + TH[I_1 - I_2]^2(x, y) = A^2R_{coh}(x, y) \quad (\text{II.9})$$

Ce traitement, développé sous Matlab, présente cependant deux inconvénients majeurs :

- les images acquises possédant 256×256 (caméra Si) ou 320×254 (caméra InGaAs) pixels, il faut faire très attention aux problèmes d'échantillonnage qui peuvent dégrader la résolution spatiale des images (en pratique, on sur-échantillonne les images en 1024×1024 en ajoutant des zéros au niveau des bords de l'image)
- le traitement est lourd, puisqu'il nécessite le traitement numérique de plus d'une centaine d'images, donc long et coûteux en mémoire.

C'est pourquoi ce traitement a été peu utilisé au cours de ces travaux de thèse, seulement pour des échantillons dont la taille et la distribution des structures faisaient apparaître une modulation d'enveloppe gênante pour l'interprétation des coupes tomographiques (le papier par exemple).

• Acquisition simultanée avec les deux caméras

Les deux caméras fonctionnant à des fréquences différentes, l'imagerie simultanée n'est pas aussi simple que la méthode à décalage de phase à deux images décrite dans le paragraphe

précédent. La fréquence d'acquisition et le temps d'exposition de chaque caméra doivent être choisis judicieusement.

Pour se placer à une vitesse de fonctionnement maximale, nous avons fixé la fréquence d'oscillation du transducteur piézoélectrique à la moitié de la fréquence d'acquisition de la caméra la plus rapide, à savoir la caméra Si qu'on utilise à une fréquence de travail de 180 Hz. Comme la caméra InGaAs est plus lente, sa fréquence d'acquisition doit être un multiple entier n de la fréquence d'acquisition de la caméra Si (cf. Figure II.10) :

$$f(\text{Si}) = nf(\text{InGaAs}) = 2f(\text{piezo}) \Leftrightarrow 2nT(\text{Si}) = 2T(\text{InGaAs}) = nT(\text{piezo}) \quad (\text{II.10})$$

Deux cas peuvent se présenter :

- si n est un entier pair, les images acquises successivement par la caméra InGaAs sont identiques car le transducteur est toujours à la même position : ceci est schématisé sur la Figure II.10(c).

- si n est un entier impair, les images acquises successivement par la caméra InGaAs sont bien en opposition de phase et une image interférométrique pourra être extraite : ceci est schématisé sur la Figure II.10(b).

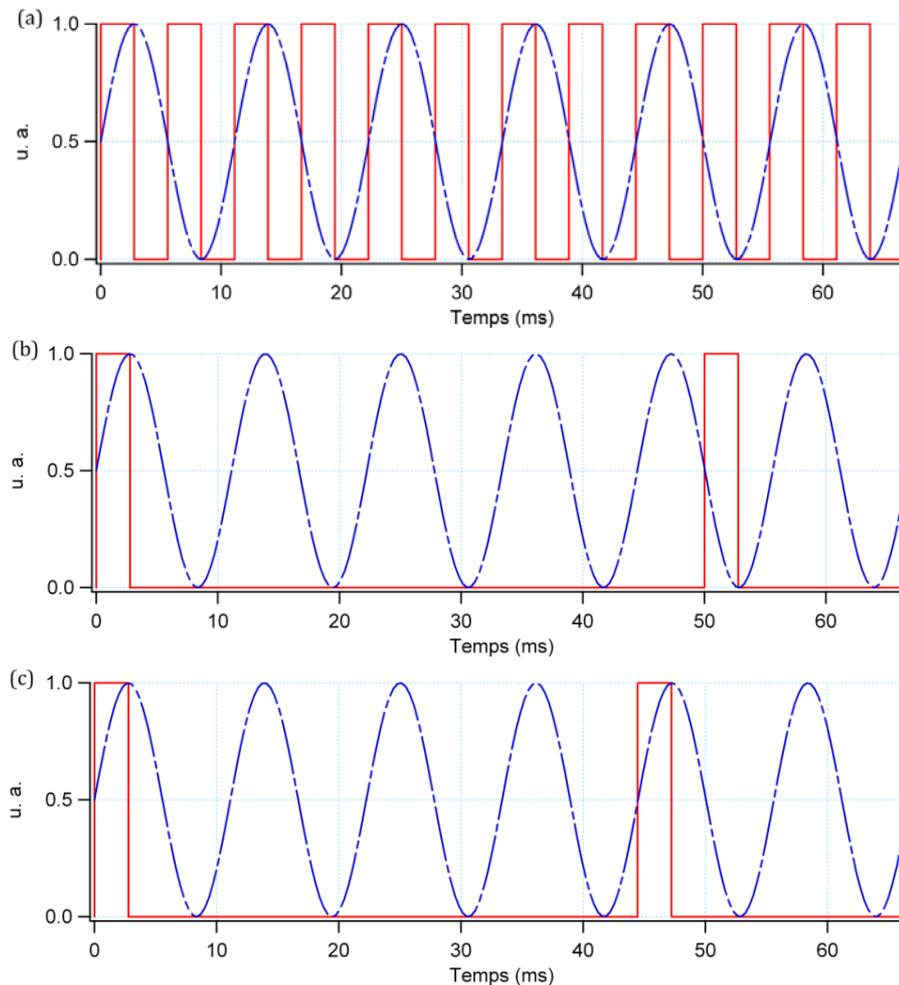


Figure II.10 : Diagrammes temporels du système d'acquisition du dispositif d'OCT à deux longueurs d'onde. Les courbes rouges correspondent au signal de synchronisation des caméras Si (a) et InGaAs dans le cas où n est impair (b) ou pair (c). Les courbes en pointillés bleus correspondent à l'oscillation du transducteur piézoélectrique.

Ainsi, en choisissant n impair et avec une synchronisation adéquate entre l'oscillation du transducteur piézoélectrique et le signal de déclenchement des acquisitions de chaque caméra, la caméra Si acquiert $2n$ images en opposition de phase pendant n oscillations du PZT tandis que la caméra InGaAs n'acquiert que 2 images en opposition de phase. Electroniquement, nous avons choisi des fréquences de travail de 180 Hz et de 20 Hz respectivement pour les caméras Si et InGaAs. Dans cette situation, la fréquence d'oscillation du transducteur piézoélectrique est de 90 Hz et $n = 9$.

Dans une méthode à décalage de phase continue, les images sont intégrées alors que la phase varie, ce qui induit une légère dégradation du contraste des interférences. Cette dégradation du contraste, qui dépend du temps d'exposition des caméras mais pas de leur fréquence d'acquisition, doit être le même pour les deux caméras si l'on veut pouvoir comparer les images interférométriques aux deux gammes de longueurs d'onde. Pour cette raison, nous avons réglé un temps d'exposition de 2,05 ms pour les deux caméras, qui correspond au temps d'exposition maximal de la caméra la plus rapide.

• Mise à l'échelle des images tomographiques

Afin de visualiser correctement la structure tridimensionnelle des échantillons, le rapport entre les dimensions axiales et transverses doit être respecté :

- la dimension axiale est déterminée par le moteur puisqu'un pixel de la coupe tomographique selon la direction axiale Z correspond à un pas du moteur, à savoir $1 \mu\text{m}$
- la dimension transverse est quant à elle donnée par la taille des pixels des caméras et du grandissement du système d'imagerie. Une calibration du champ transverse vu par les caméras à l'aide d'une mire de microscope a été réalisée. Ainsi, un pixel sur la caméra Si voit un champ de $0,923 \mu\text{m}$ au niveau de l'objet ce qui correspond à un champ total vu par la caméra de $236 \times 236 \mu\text{m}^2$ alors qu'un pixel sur la caméra InGaAs voit un champ de $1,364 \mu\text{m}$ au niveau de l'objet ce qui correspond à un champ total vu par la caméra de $436 \times 349 \mu\text{m}^2$.

On interpole alors les images tomographiques *en face* afin qu'un pixel selon les directions transverses X et Y corresponde à $1 \mu\text{m}$ au niveau de l'échantillon. On assure ainsi un rapport 1:1 entre les trois directions des images tomographiques et donc un rapport d'aspect réaliste.

• Traitement colorimétrique : image différentielle

Pour faciliter la comparaison des images tomographiques obtenues sur les deux gammes de longueur d'onde, nous avons développé une technique de traitement numérique colorimétrique s'appuyant sur le mode de couleur Teinte/Saturation/Luminosité (TSL). Dans ce mode de représentation, chaque couleur est caractérisée par trois paramètres (cf. Figure II.11), qui sont la teinte, mesurée par un angle autour de la roue chromatique, la saturation, mesurée depuis la couleur la plus neutre au centre de la roue vers les couleurs les plus vives en allant vers les bords et enfin la luminosité, mesurée entre le noir (pas de lumière) et le blanc (lumière maximum).

Les avantages de ce modèle, par rapport au mode de représentation Rouge/Vert/Bleu (RVB), sont de séparer clairement la composante luminosité des composantes chromatiques et de permettre de définir pour chaque teinte, un plan de teinte constante où les couleurs varient en luminosité et en saturation.

Nous avons utilisé cette propriété pour traiter les images tomographiques à l'aide d'un programme écrit sous Matlab : après normalisation de l'intensité des images entre 0 et 1, la

valeur de la teinte est fixée (teinte de vert pour les images acquises à 800 nm et de rouge pour les images acquises à 1300 nm), la saturation et la luminosité étant quant à elle données par l'intensité de l'image. On définit ensuite l'image différentielle comme la moyenne colorimétrique des images à 800 et 1300 nm. Par ce processus, les structures qui ont une intensité plus importante à 1300 nm apparaîtront rouges sur l'image différentielle, alors que les structures dominantes à 800 nm apparaîtront vertes.

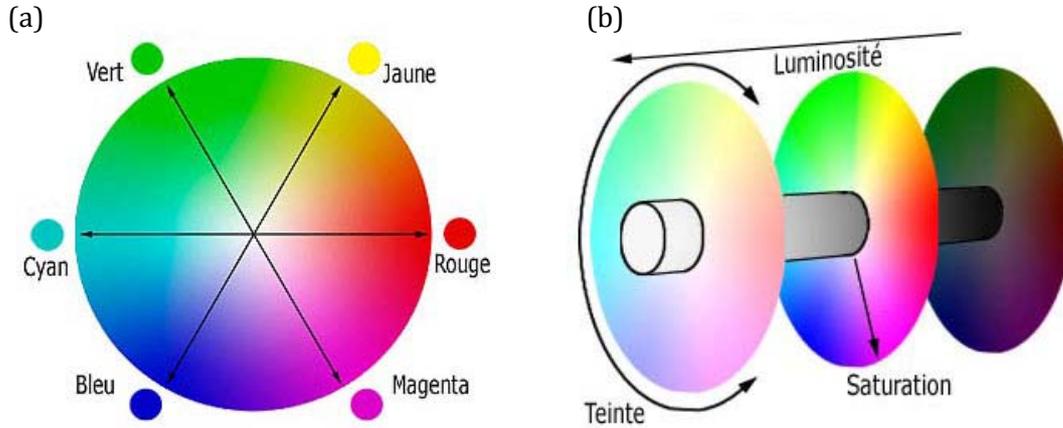


Figure II.11 : (a) Roue chromatique ; (b) Principe du mode de représentation TSL.

II.1.4 Performances du dispositif

Nous présentons dans ce paragraphe les performances du dispositif expérimental d'OCT plein champ à deux longueurs d'onde, à savoir sa résolution spatiale (axiale et transverse), sa sensibilité de détection et le temps d'acquisition des coupes tomographiques.

• Résolution axiale

Nous avons vu au chapitre précédent que les interférences ne se produisent que si la différence de marche entre les deux bras de l'interféromètre est inférieure à la longueur de cohérence temporelle effective du dispositif. Ainsi, la résolution axiale d'un dispositif d'OCT, dans le cas d'une distribution spectrale gaussienne de la puissance lumineuse et en l'absence d'écart de dispersion entre les deux bras de l'interféromètre, est donnée par (voir calcul détaillé en Annexe A) :

$$\Delta z = \frac{l_c}{2} = \frac{2 \ln 2}{n\pi} \left(\frac{\bar{\lambda}^2}{\Delta \lambda} \right) \quad (\text{II.11})$$

où n est l'indice de réfraction du milieu, $\bar{\lambda}$ la longueur d'onde centrale d'illumination et $\Delta \lambda$ la largeur totale à mi-hauteur du spectre effectif. Les composants optiques étant large bande, on peut considérer avec une bonne approximation que le spectre effectif est le produit du spectre de la lampe halogène par la réponse spectrale de chaque caméra. Sur la Figure II.12 sont représentés le spectre de la lampe halogène, modélisé par une réponse de corps noir de température 3200 K, les réponses spectrales de chaque caméra, fournies par les constructeurs, et le spectre effectif équivalent pour chaque gamme de longueur d'onde.

Les résolutions axiales théoriques dans l'eau pour les deux gammes de longueurs d'onde, évaluées à partir de l'équation (II.11), sont regroupées dans le Tableau II.2. L'indice de l'eau aux deux longueurs d'onde est évalué à partir des coefficients de Sellmeier à la température de 21°C, température de la salle d'expérimentation [81, 82].

	Caméra Si	Caméra InGaAs
Longueur d'onde centrale (nm)	820	1300
Largeur du spectre (nm)	300	600
Indice de l'eau	1,3285	1,3223
Résolution axiale dans l'eau (μm)	0,75	1,0

Tableau II.2 : Résolutions axiales théoriques dans l'eau pour les deux gammes de longueurs d'onde.

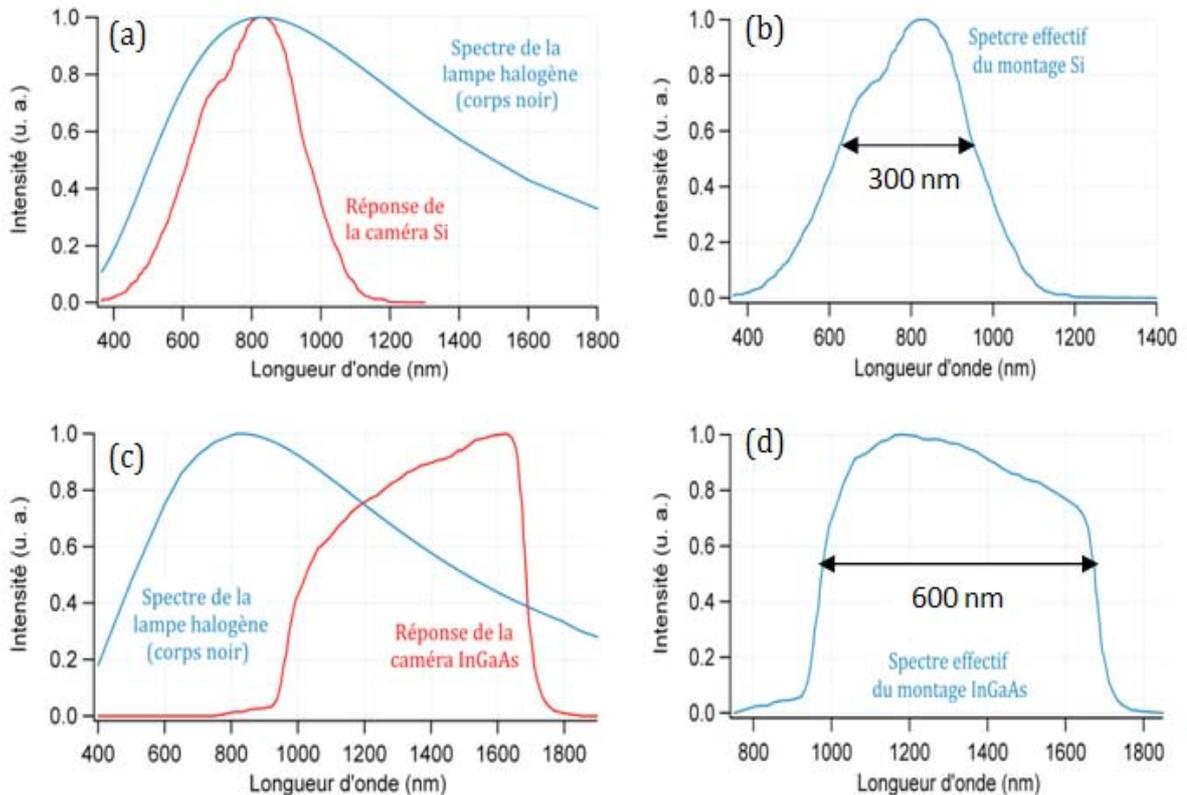


Figure II.12 : (a) et (c) Respectivement réponse spectrale des caméras Si et InGaAs et spectre de la lampe halogène assimilée à un corps noir. (b) et (d) Respectivement spectre effectif du dispositif d'OCT avec caméra Si et avec caméra InGaAs.

Expérimentalement, et comme expliqué dans le chapitre précédent, la résolution axiale est définie par la largeur à mi-hauteur de l'enveloppe de l'interférogramme. Pour évaluer cette résolution, on a donc enregistré l'interférogramme obtenu dans l'eau, dans la configuration où un miroir métallique est présent dans chaque bras de l'interféromètre. On obtient des franges caractéristiques d'un coin d'air, dont on peut extraire l'interférogramme par coupe sur une ligne de pixels (cf. Figure II.13). La conversion pixel - distance axiale est ensuite réalisée grâce à une calibration en lumière monochromatique. Pour cela, on place un filtre interférentiel dans le trajet du faisceau, filtre interférentiel à 800 nm pour la caméra Si et à 1064 nm pour la caméra InGaAs. On en déduit la résolution axiale dans l'eau pour les deux dispositifs.

Ainsi, la résolution axiale expérimentale pour le dispositif avec caméra Si est de 0,8 μm , ce qui est très proche de la valeur théorique calculée précédemment. Par contre, pour le

dispositif avec caméra InGaAs, la résolution axiale expérimentale est de 1,5 μm , supérieure au 1,0 μm prévu par la théorie.

Pour expliquer cette dégradation par rapport à la valeur théorique, il faut s'interroger sur les conditions de validité de l'équation (II.11). Cette formule est en effet calculée en l'absence d'écart de dispersion et d'absorption par le milieu d'immersion. Il nous faut donc étudier l'influence de la non-validité de ces hypothèses.

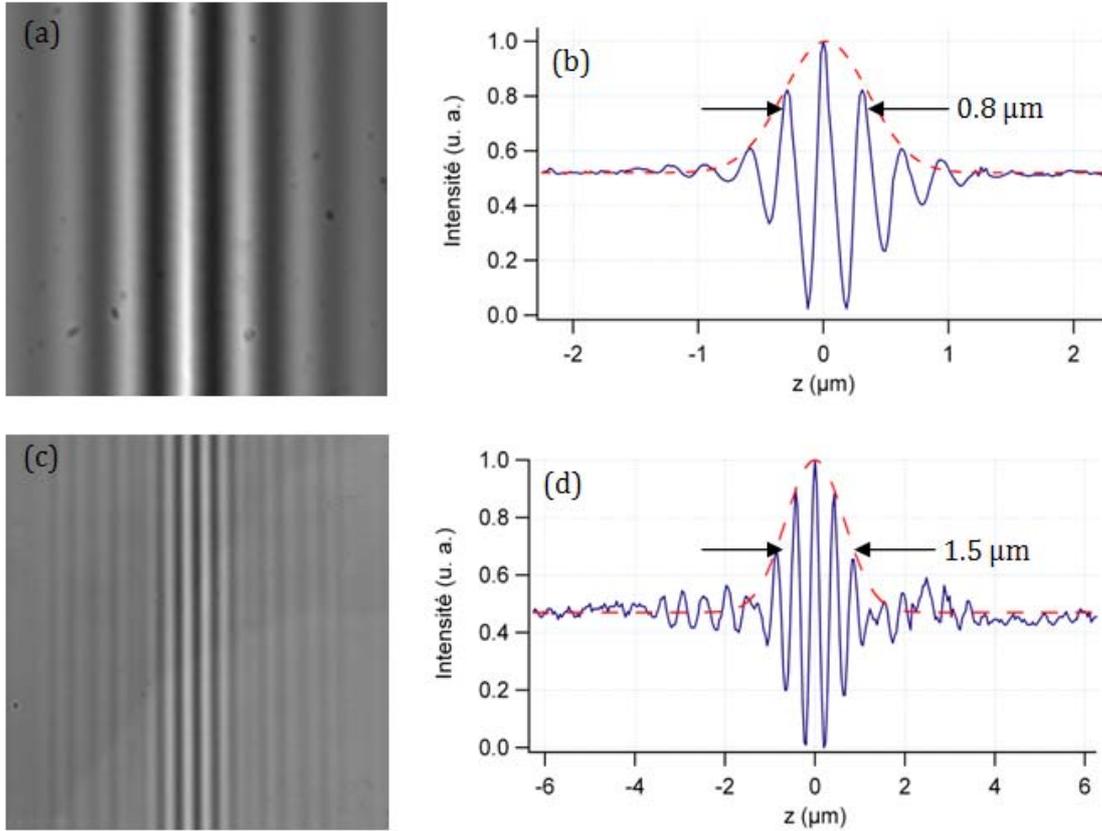


Figure II.13 : (a) et (c) Interférogramme dans l'eau enregistré respectivement par les caméras Si et InGaAs. (b) et (d) Coupe de l'interférogramme donnant la résolution axiale respectivement des dispositifs Si et InGaAs.

Influence de la dispersion : Dans le cas d'une dissymétrie de dispersion entre les deux bras de l'interféromètre, la résolution axiale est dégradée selon la loi suivante :

$$\Delta z = \sqrt{\left(\frac{2 \ln 2}{n\pi} \frac{\bar{\lambda}^2}{\Delta \lambda}\right)^2 + \left(z \Delta \lambda \frac{dn}{d\lambda}\right)^2} \quad (\text{II.12})$$

où z est la profondeur d'imagerie au sein de l'échantillon.

Dans le cas de notre dispositif expérimental, l'effet de la dispersion est minimisé (en particulier par le choix des objectifs de microscope, identiques et à immersion dans l'eau) et ne peut expliquer à lui seul l'écart constaté pour le dispositif InGaAs.

Influence de l'absorption : Le coefficient d'absorption de l'eau dépendant fortement de la longueur d'onde, la transmission par une épaisseur l d'eau peut modifier notablement le spectre effectif. Pour notre dispositif, l correspond au double (car configuration en aller-retour) de la frontale des objectifs de microscope, i.e. 6,2 mm. Comme le montre la Figure II.14, cet effet est minime pour la caméra Si, puisque la transmission de l'eau est constante et

pratiquement égale à 1 sur la plage 650-950 nm, mais n'est pas négligeable au-delà de 1000 nm donc pour la caméra InGaAs, puisque le spectre de transmission de l'eau est très accidenté. Le spectre vu par la caméra InGaAs va donc être grandement modifié par l'absorption de l'eau, ce qui rend les calculs précédents inapplicables dans la configuration actuelle.

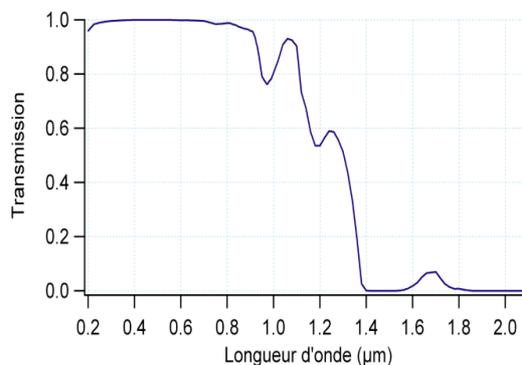


Figure II.14 : Transmission de l'eau (épaisseur de 6,2 mm).

Pour s'assurer que la dégradation de la résolution axiale pour le dispositif InGaAs est bien due à l'absorption par l'eau, nous avons comparé :

- le spectre effectif vu par la caméra InGaAs, calculé par transformée de Fourier de l'interférogramme. Il est représenté sur la Figure II.15(a).

- le spectre théorique résultant du spectre effectif déterminé précédemment modulé par la transmission de l'eau sur une épaisseur de 6,2 mm. Il est représenté sur la Figure II.15(b).

Ces deux spectres concordent, donc la dégradation de la résolution axiale est bien due à l'absorption par l'eau. Cependant, pour les raisons citées précédemment (en particulier dégradation de la résolution axiale par la dispersion), une configuration avec objectifs à immersion à eau reste optimale.

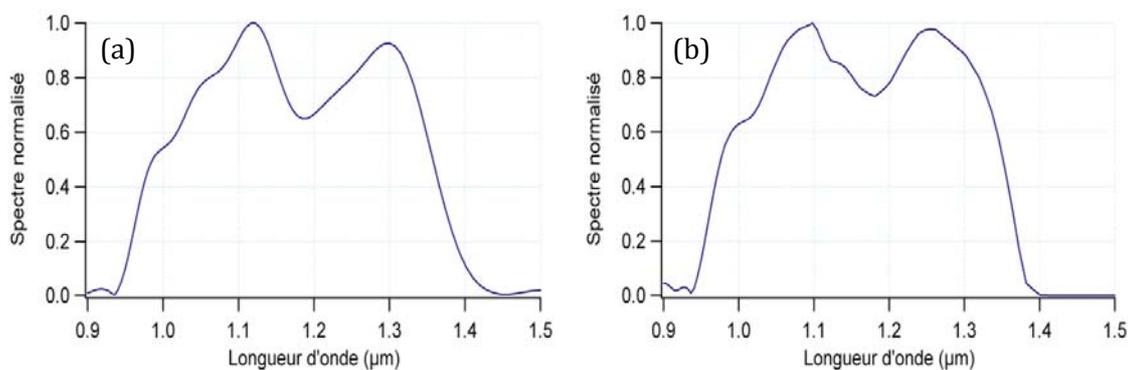


Figure II.15 : Spectre effectif pour le dispositif à caméra InGaAs, expérimental (a) et théorique (b).

Il est enfin à noter que les résolutions axiales mesurées ici sont les meilleures résolutions à notre connaissance en OCT plein champ sur les deux gammes de longueurs d'onde.

• Résolution transverse

La résolution transverse d'un système d'imagerie est communément définie comme la largeur totale à mi-hauteur de la réponse percussionnelle (PSF) de ce système. Dans le cas d'un dispositif d'OCT plein champ, la résolution transverse est similaire à celle d'un

microscope conventionnel. Ainsi, en supposant que le système optique est limité par la diffraction, la PSF est la célèbre fonction d'Airy :

$$h(u) = \left| \frac{2J_1(u)}{u} \right|^2 \text{ avec } u = \frac{2\pi}{\lambda} r ON \quad (\text{II.13})$$

où J_1 est la fonction de Bessel du premier ordre, ON l'ouverture numérique des objectifs de microscope, λ la longueur d'onde moyenne et r la coordonnée radiale.

Nous avons mesuré la résolution transverse du dispositif dans l'eau en enregistrant le profil d'intensité le long d'une marche (typiquement le bord d'un miroir de silicium). Les résultats de ces mesures pour les deux gammes de longueur d'onde sont présentés sur la Figure II.16. Un critère est ici nécessaire pour définir la résolution transverse à partir de la largeur de ce profil d'intensité. Nous avons choisi de définir la résolution transverse comme la largeur entre 10 et 90% du profil d'intensité acquis par la caméra. Ce critère permet d'obtenir pour une réponse parfaite, simulée numériquement par la convolution de la fonction d'Airy définie par l'équation (II.13) et d'une fonction d'Heaviside, des valeurs de résolution transverse proche de celle donnée par l'équation (I.2). Les différentes valeurs de ces simulations sont regroupées dans le tableau II.3. Les résolutions transverses expérimentales mesurées avec ce critère sont de 1,8 μm pour le dispositif avec la caméra Si et de 3,6 μm pour celui avec la caméra InGaAs. Notons qu'il est normal d'avoir une résolution sensiblement dégradée pour le dispositif à 1200 nm d'après l'équation (I.2) puisque la longueur d'onde est plus élevée.

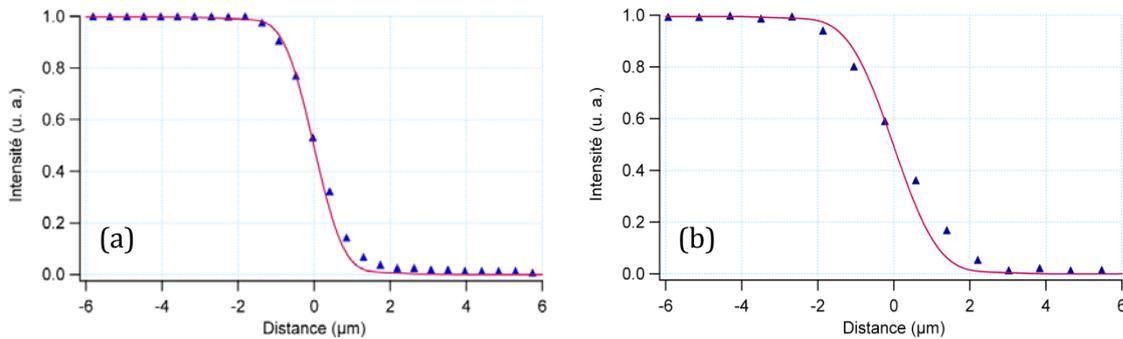


Figure II.16 : Résolution transverse à 800 nm (a) et 1200 nm (b). Les points bleus correspondent aux mesures expérimentales et la courbe rouge à la formule théorique.

Les résultats expérimentaux ont été comparés aux profils d'intensité théoriques (courbes rouges), correspondant à la convolution entre une fonction de Heaviside, modélisant la marche parfaite, et la fonction d'Airy, approximation de la PSF de notre système optique. Nous avons également tenu compte, comme expliqué lors du choix de la focale du doublet chromatique d'imagerie, de l'échantillonnage des pixels de la caméra, modélisé par une fonction porte de largeur égale à la taille objet des pixels de la caméra (les valeurs correspondantes des simulations prenant en compte ce phénomène sont également reportées dans le tableau II.3). Les résolutions transverses calculées à partir de ce profil théorique sont respectivement de 1,6 μm et 2,3 μm pour les dispositifs à 800 nm et 1200 nm.

La dégradation entre les résolutions transverses expérimentale et théorique peut s'expliquer par les aberrations optiques des objectifs de microscope. La modélisation de la PSF par la fonction d'Airy n'est donc pas valable et la résolution transverse sous-évaluée.

Cette dégradation est d'autant plus importante à 1200 nm puisque les objectifs ne sont pas conçus pour travailler dans cette gamme de longueur, ils présentent donc plus d'aberrations.

	Caméra Si	Caméra InGaAs
Expression de l'équation I.2	1,3	2,0
Largeur entre 10 et 90% sans tenir compte de l'échantillonnage par les pixels	1,4	2,1
Largeur entre 10 et 90 % en tenant compte de l'échantillonnage par les pixels	1,6	2,3
Valeurs expérimentales entre 10 et 90%	1,8	3,6

Tableau II.3 : Résolutions transverse théoriques et expérimentales (exprimées en μm).

• Sensibilité de détection

La sensibilité de détection de notre système d'imagerie correspond au plus petit coefficient de réflexion détectable. C'est un paramètre crucial puisqu'il est un indicateur à la fois du contraste et de la profondeur de pénétration maximale. Ainsi, dans les milieux faiblement diffusants, où le signal est souvent difficile à détecter (les structures diffusantes ayant des tailles et/ou des différences d'indice par rapport au milieu environnant faible), la sensibilité de détection impose le contraste des images tomographiques. Au contraire, dans les milieux très diffusants, où le signal décroît exponentiellement avec l'épaisseur de milieu traversé, la sensibilité de détection fixe une limite à la profondeur de pénétration.

La discrimination des photons dans le volume de cohérence se faisant par une opération numérique (méthode à décalage de phase) et non matériellement, la totalité de la lumière en sortie de l'interféromètre est enregistrée par les caméras. L'amplitude du signal d'interférence enregistré est souvent extrêmement faible mais ne peut pas être amplifiée par augmentation de la lumière incidente, en raison de la saturation des pixels par le flux de lumière incohérente. Il faut donc connaître l'expression de la sensibilité de détection d'un dispositif d'OCT plein champ à décalage de phase en fonction des paramètres de l'instrument pour tenter de la maximiser au mieux. En supposant que les caméras fonctionnent proche de la saturation et qu'elles sont limitées par le bruit de grenaille (ou *shot-noise*), la statistique des photoélectrons obéit à une distribution de Poisson. Dans ce cas, la sensibilité de détection du dispositif d'OCT plein champ est donnée par :

$$R_{min} = 0,4 \frac{(R_{réf} + R_{inc})^2}{N \xi_{sat} R_{réf}} \quad (\text{II.14})$$

où ξ_{sat} représente la capacité de charge des pixels des caméras, N le nombre d'images accumulées, $R_{réf}$ la réflectivité de la surface de référence et R_{inc} la réflectivité équivalente à la proportion de lumière incohérente, résultant principalement des réflexions parasites sur les optiques de l'instrument et de la rétrodiffusion par des structures de l'objet se situant en dehors du volume de cohérence. La démonstration de cette expression, valable pour une méthode à décalage de phase à deux images¹, est faite dans l'encadré de la page suivante.

¹ Dans le cas d'un dispositif à décalage de phase enregistrant quatre images en quadrature de phase, le coefficient numérique n'est plus de 0,4 mais de 0,48. La sensibilité de détection est donc légèrement dégradée, ce qui conforte notre choix d'une méthode à décalage de phase n'enregistrant que deux images en opposition de phase.

Sensibilité de détection : dispositif d'OCT plein champ à décalage de phase

On considère un dispositif d'OCT plein champ à décalage de phase, dont le terme de phase est modulé dans le temps. L'intensité lumineuse perçue par un pixel (x, y) de la caméra est :

$$I(x, y, t) = \frac{I_0}{8} \left[R_{réf} + R_{inc}(x, y) + R_{coh}(x, y) + 2 \sqrt{R_{réf} R_{coh}(x, y)} \cos(\phi(x, y) + \psi \sin(2\pi ft)) \right]$$

La méthode à décalage de phase acquiert deux images, intégrée sur des demi-périodes de l'oscillation du transducteur piézoélectrique, soit :

$$I_1 = \eta N \int_0^{T/2} I(x, y, t) dt \quad \text{et} \quad I_2 = \eta N \int_{T/2}^T I(x, y, t) dt$$

où η représente l'efficacité quantique du détecteur CCD et $T = 1/f$ la période de modulation.

On a donc en différence d'images interférométriques :

$$(I_1 - I_2) = \eta N \frac{I_0}{4} \sqrt{R_{réf} R_{coh}(x, y)} \left[\int_0^{T/2} \cos(\phi + \psi \sin(2\pi ft)) dt - \int_{T/2}^T \cos(\phi + \psi \sin(2\pi ft)) dt \right]$$

A
B

On développe la fonction cosinus à l'aide des fonctions de Bessel:

$$\cos(\phi + \psi \sin(u)) = J_0(\psi) \cos(\phi) + 2 \cos(\phi) S_1(u) - 2 \sin(\phi) S_2(u)$$

$$\text{où } S_1(u) = \sum_{n=1}^{\infty} J_{2n}(\psi) \cos(2nu) \quad \text{et} \quad S_2(u) = \sum_{n=1}^{\infty} J_{2n+1}(\psi) \cos((2n+1)u)$$

On obtient donc :

$$\begin{cases} A = J_0(\psi) \cos(\phi) \frac{T}{2} + 2 \cos(\phi) \int_0^{T/2} S_1(2\pi ft + \theta) dt - 2 \sin(\phi) \int_0^{T/2} S_2(2\pi ft + \theta) dt \\ B = J_0(\psi) \cos(\phi) \frac{T}{2} + 2 \cos(\phi) \int_{T/2}^T S_1(2\pi ft + \theta) dt - 2 \sin(\phi) \int_{T/2}^T S_2(2\pi ft + \theta) dt \end{cases}$$

$$\Rightarrow (A - B) = -\frac{2T \sin(\phi)}{2\pi(2n+1)} \sum_{n=0}^{\infty} J_{2n+1}(\psi) \times 4 \cos((2n+1)\theta)$$

$$\text{soit } (E_1 - E_2)^2 = \left(\frac{\Gamma}{\pi} \eta N T I_0 \right)^2 \sin^2 \phi R_{réf} R_{coh} \quad \text{où } \Gamma = \frac{\cos((2n+1)\theta)}{2n+1} \sum_{n=0}^{\infty} J_{2n+1}(\psi)$$

On recherche alors les paramètres θ et ψ qui maximise cette différence :

$$(E_1 - E_2)^2 \text{ maximum si } \begin{cases} \cos((2n+1)\theta) = 1 \Leftrightarrow \theta = 0 \\ \psi = 1.97835 \Leftrightarrow \Gamma = 0.62 \end{cases}$$

La capacité de charge des pixels de la caméra à la saturation est donnée par :

$$\xi_{sat} = \eta \frac{T I_0}{2} (R_{réf} + R_{inc}) \quad \text{donc } (E_1 - E_2)^2 = 256 \left(\frac{\Gamma}{\pi} N \xi_{sat} \right)^2 \sin^2 \phi \frac{R_{réf} R_{coh}}{(R_{réf} + R_{inc})^2}$$

Dans le cas idéal, la sensibilité de l'instrument est limitée par le bruit de photo-électrons, bruit dont la statistique obéit à une loi de Poisson. Le plus petit coefficient de réflexion objet détectable est alors tel que le signal en sortie est de même amplitude que le bruit, soit :

$$256 \left(\frac{\Gamma}{\pi} N \xi_{sat} \right)^2 \sin^2 \phi \frac{R_{réf} R_{min}}{(R_{réf} + R_{inc})^2} = 2N \xi_{sat}$$

$$\text{donc } R_{min} = \frac{\pi^2}{64 \Gamma^2} \times \frac{(R_{réf} + R_{inc})}{N \xi_{sat} R_{réf}}$$

En dérivant l'équation (II.14), on trouve que le maximum de sensibilité est atteint lorsque :

$$R_{réf} = 2R_{inc} \quad (II.15)$$

Il faut donc adapter la réflectivité de la surface de référence à la lumière incohérente provenant du montage, tout en restant proche de la saturation des caméras. Il faut de plus éliminer au mieux la lumière incohérente, qui noie le signal utile. C'est pourquoi, au cours de toutes nos expériences, un grand soin a été apporté à la minimisation de la lumière parasite : tous les composants optiques utilisés sur le montage possèdent un traitement antireflet large bande et ont été orientés de façon à diriger les réflexions spéculaires hors de l'axe optique du montage. Avec ces précautions, nous avons estimé que la lumière parasite provenant du dispositif en l'absence d'échantillon représente une réflectivité d'environ 0,02 %. La lumière incohérente provenant de l'échantillon biologique est quant à elle minimisée par l'adaptation d'indice réalisée par les objectifs de microscope à immersion dans l'eau et est ainsi de l'ordre de 0,6% à 1,0% selon l'échantillon. La lumière incohérente totale correspond donc à une réflectivité équivalente de l'ordre du pourcent. Il faut donc utiliser, d'après l'équation (II.15) une surface de référence possédant une réflectivité de quelques pourcents. Notre choix s'est porté sur un cristal de YAG ($Y_3Al_5O_{12}$, indice 1,8) présentant une réflectivité de 2% dans l'eau. Ainsi, dans toutes nos expériences les images tomographiques d'échantillons biologiques sont réalisées avec un cristal de YAG comme surface de référence, afin de maximiser la sensibilité de détection.

La mesure de la sensibilité de détection d'un dispositif d'OCT plein champ peut être effectuée en deux étapes :

- on enregistre l'image tomographique d'un échantillon de réflectivité R connue (dans notre cas, une lame de verre de réflectivité dans l'eau de 0,4%) pour un nombre N d'accumulations donné et avec un flux tel que les caméras travaillent proche de la saturation. On mesure le maximum S_{max} de cette image.

- on enregistre l'image tomographique sans interférence en défocalisant légèrement l'échantillon afin de ne plus avoir d'interférences. Le signal tomographique devient alors égal au bruit. Notons que la défocalisation appliquée est suffisamment faible pour que le flux détecté par la caméra demeure quasiment inchangé. On extrait la moyenne S_{min} de cette image, qui correspond au bruit de fond propre à notre dispositif.

La sensibilité de détection est alors donnée par :

$$R_{min} = R \frac{S_{min}}{S_{max}} \quad (II.16)$$

En utilisant cette méthode, nous avons mesuré en fonction du nombre d'images accumulées la sensibilité de détection du dispositif d'OCT plein champ à deux longueurs d'onde (cf. Figure II.17). Des sensibilités de détection de l'ordre de 90 dB, correspondant à un coefficient de réflexion minimal détectable de 10^{-9} , sont facilement accessibles avec les deux détecteurs, même en tenant compte de la dégradation due à l'augmentation de la quantité de lumière incohérente provenant de l'échantillon biologique (~ 3 dB). On observe une saturation de la sensibilité de détection pour un grand nombre d'accumulations, qui peut s'expliquer par les dérives et vibrations (mécaniques et thermiques) du dispositif. Une comparaison à la courbe donnée par l'équation (II.14) avec les valeurs constructeur de la capacité de charge des pixels ($1,2 \times 10^5$ et 8×10^5 électrons respectivement pour les caméras Si et InGaAs) confirme que la statistique des photoélectrons obéit bien à une loi de Poisson (le léger décalage pour

la caméra InGaAs correspond à un bruit électrique résiduel, mais faible puisque de l'ordre de 2 dB pour des faibles nombres d'images accumulées).

Le but de notre dispositif est d'étudier le seul effet de la longueur d'onde sur les images tomographiques. Pour cela, la sensibilité de détection doit être similaire pour les deux dispositifs, donc d'après les résultats expérimentaux le nombre d'images accumulées différent. Ainsi, pour toutes les images présentées dans la suite de ce chapitre, nous avons choisis une sensibilité de détection de l'ordre de 95 dB, ce qui correspond à une accumulation de 250 images pour la caméra Si et de 50 images pour la caméra InGaAs.

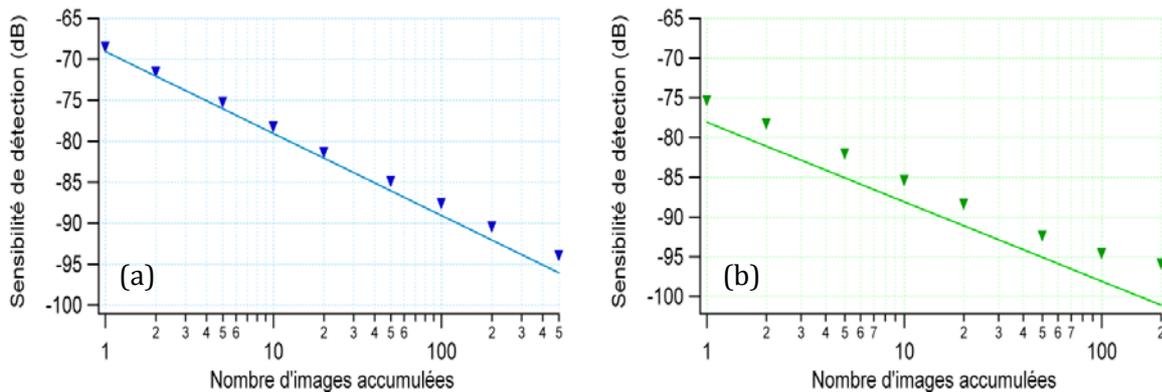


Figure II.17 : Sensibilité de détection du dispositif avec caméra Si (a) et InGaAs (b). Les points correspondent aux mesures et les courbes à l'équation (II.14).

Pour vérifier que les deux dispositifs avaient la même sensibilité de détection avec ce facteur 5 entre les nombres d'accumulations, nous avons enregistré une pile d'images tomographiques d'une lame de verre dans l'eau. Le rapport maximum du signal au niveau de la surface de la lame sur la moyenne du signal lorsque la surface de la lame est reculée (de sorte qu'il n'y ait plus d'interférences), quantité que nous appelons le bruit de fond, doit être le même pour les deux caméras. Les résultats, regroupés dans le tableau II.4, montrent que ce facteur assure bien l'égalité des deux sensibilités de détection.

	Caméra Si	Caméra InGaAs
Maximum du signal (niveaux)	17972	64832
Bruit de fond (niveaux)	24	90
Rapport signal/bruit	749	720

Tableau II.4 : Vérification expérimentale de l'égalité des sensibilités de détection.

• Temps d'acquisition des piles d'images tomographiques

En considérant le nombre d'accumulations retenus précédemment et la fréquence de travail des caméras, le temps d'acquisition d'une image tomographique est de 2,5 s pour le dispositif avec caméra Si et de 5 s pour le dispositif avec caméra InGaAs. Avant l'acquisition de chaque image tomographique à une profondeur donnée, une temporisation ajustable entre 0 et 1 s est introduite pour s'affranchir des vibrations transmises à l'échantillon par le mouvement brusque de la platine de translation axiale motorisée.

Les piles résultent de l'acquisition de ces images tomographiques à des profondeurs successives dans l'échantillon biologique, grâce au déplacement de la platine axiale

motorisée. Le pas de cette platine étant de $1\ \mu\text{m}$, une pile de $500\ \mu\text{m}$ (épaisseur typique au-delà de laquelle le signal utile n'est plus détectable dans les milieux biologiques faiblement diffusants) prend respectivement environ 20 minutes et 50 minutes pour les dispositifs à caméra Si et InGaAs. Ce temps d'acquisition est relativement long pour le dispositif InGaAs, ce qui est gênant pour les échantillons biologiques, qui peuvent être endommagés par le flux lumineux assez intense de la lampe halogène. Des solutions possibles seraient d'utiliser des caméras plus rapides, un moteur ayant un mouvement moins brutal ou un mouvement transverse imposé à l'interféromètre et non à l'objet pour pouvoir s'affranchir de la temporisation.

• Bilan

Le diagramme radar de notre dispositif d'imagerie à deux longueurs d'onde est présenté sur la Figure II.18. Les performances sont tout à fait honorables (en comparaison des dispositifs d'OCT conventionnels), mis à part la vitesse d'acquisition qui ne permet pas des applications *in vivo*.

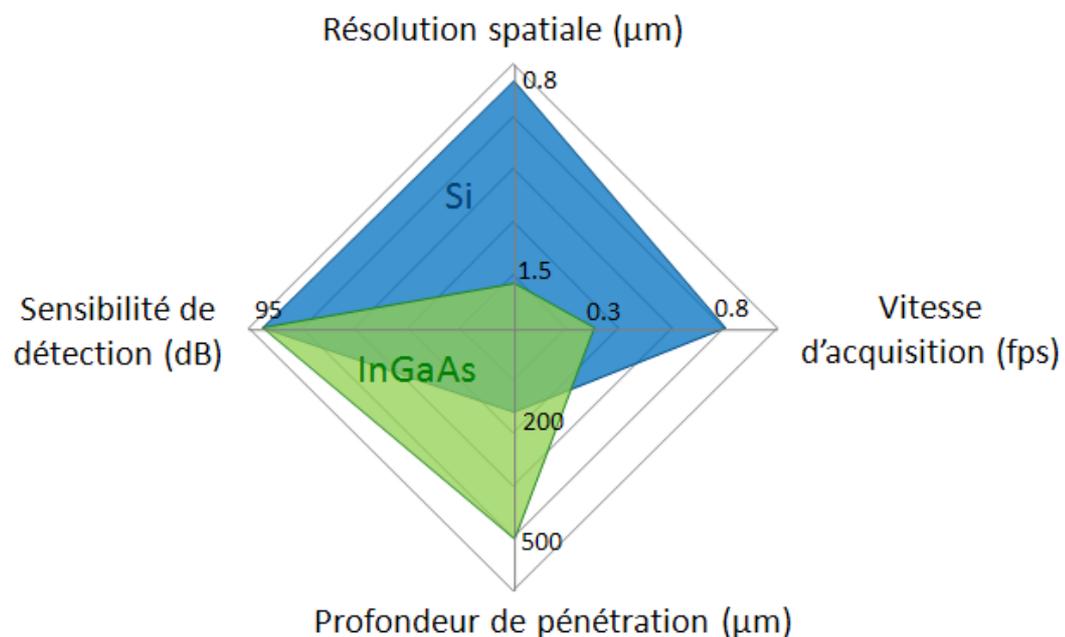


Figure II.18 : Diagrammes radars des dispositifs d'OCT plein champ aux deux longueurs d'onde.

II.2 Exemples d'images

Pour démontrer les performances du dispositif d'OCT plein champ à deux longueurs d'onde, une grande variété d'objets (matériaux ou milieux biologiques) a été imagée. Dans ce paragraphe, nous présentons les images tomographiques obtenues pour certains de ces échantillons.

La procédure expérimentale pour chacune de ces coupes a été d'acquérir une pile d'images tomographiques à différentes profondeurs en déplaçant l'échantillon par pas de $1\ \mu\text{m}$ à l'aide de la platine de translation axiale motorisée, avec une éventuelle temporisation afin de limiter au maximum les vibrations de l'échantillon. Les images présentées dans ce

paragraphe sont en échelle logarithmique, le noir correspondant au signal le plus faible (85-90 dB) et le blanc au signal le plus fort (55-60 dB).

• Profondeur réelle d'imagerie

Pour pouvoir comparer la profondeur de pénétration dans l'échantillon aux deux longueurs d'onde, il faut considérer la profondeur réelle d'imagerie. En effet, dans un milieu d'indice de réfraction n' , la distance optique parcourue dans ce milieu est égale à la distance géométrique z parcourue multipliée par n' . Lorsque l'échantillon est translaté axialement d'une distance z , le plan d'interférences est quant à lui translaté d'une distance $z n/n'$, où n est l'indice du milieu d'immersion. La profondeur d'imagerie réelle d s'obtient donc en multipliant la profondeur de pénétration physique, liée au déplacement du moteur, par le rapport des indices de réfraction d'immersion et du milieu :

$$d = \frac{n'}{n} z \quad (\text{II.17})$$

II.2.1 Premiers tests : images d'un cheveu

Les premiers tests avec le dispositif d'OCT plein champ à deux longueurs d'onde ont été réalisés sur un cheveu. Ce milieu est un candidat approprié pour les premiers tests du dispositif. En effet, de part sa faible épaisseur (d'environ 80 μm pour un cheveu fin jusqu'à 150 μm pour un cheveu très épais), il est possible de l'imager en entier. Si les deux dispositifs ont la même sensibilité de détection, les images tomographiques à 800 et 1200 nm devront donc être sensiblement identiques du point de vue de l'intensité et ne différeront que par leur résolution spatiale, différente pour les deux dispositifs.

Le cheveu étant un milieu peu fragile, on pourra également réaliser des images tomographiques dans l'air ainsi que dans l'eau pour pouvoir réaliser une étude comparative des deux modes d'imagerie et confirmer les avantages d'une imagerie avec des objectifs à immersion dans l'eau.

Toutes les images tomographiques présentées dans ce paragraphe ont été réalisées avec 250 et 50 accumulations, respectivement pour les dispositifs à 800 nm et 1200 nm, et avec une temporisation de 500 ms. Le cheveu, blond pour limiter l'absorption, était fixé sur une rondelle de plastique d'un centimètre d'épaisseur, afin d'avoir le même milieu extérieur au dessus et en dessous du cheveu. Les coupes (XZ) extraites des piles tomographiques obtenues aux deux longueurs d'onde dans l'eau et dans l'air sont respectivement représentées sur la Figure II.19 et la

Figure II.20. Dans les deux configurations, le gain dû à la meilleure résolution tridimensionnelle (axiale et transverse) du dispositif à 800 nm est assez frappant, le détail des structures du cheveu étant plus fin. Le gain lié à l'imagerie à immersion dans l'eau est d'une autre nature. Le coefficient de réflexion de la surface du cheveu, appelée cuticule, est bien plus important dans l'air que dans l'eau, la différence entre les indices de réfraction des deux milieux étant plus grande (indice du cheveu de l'ordre de 1.4). De ce fait, le signal rétrodiffusé par la cuticule dans l'air sera beaucoup plus important que celui rétrodiffusé par les structures internes du cheveu, qui n'apparaissent donc pratiquement pas sur les coupes tomographiques dans l'air. Au contraire, dans l'eau, on réalise une adaptation d'indice entre le milieu extérieur et la cuticule, ce qui permet d'avoir un signal tomographique d'intensité comparable à la surface du cheveu comme à l'intérieur et de pouvoir étudier la structure interne du cheveu.

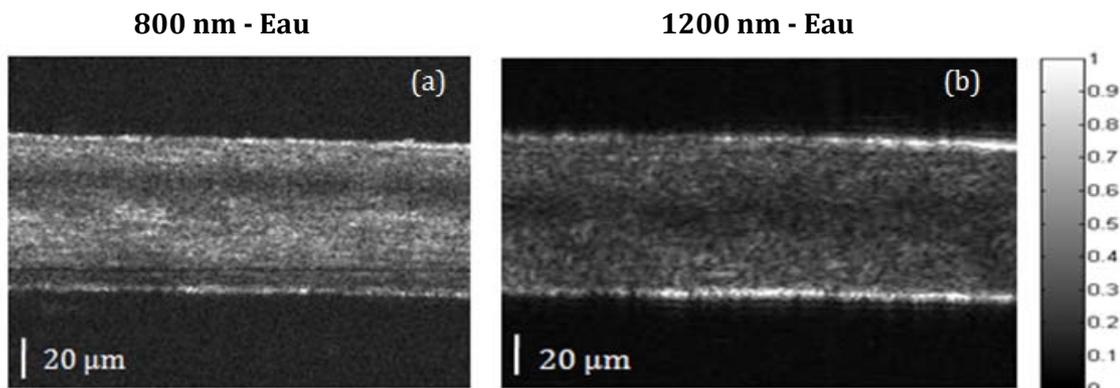


Figure II.19 : Images tomographiques (XZ) obtenues avec le dispositif d'OCT plein champ à 800 nm (a) et 1200 nm (b) d'un cheveu dans l'eau, extraites d'une pile de 200 images.

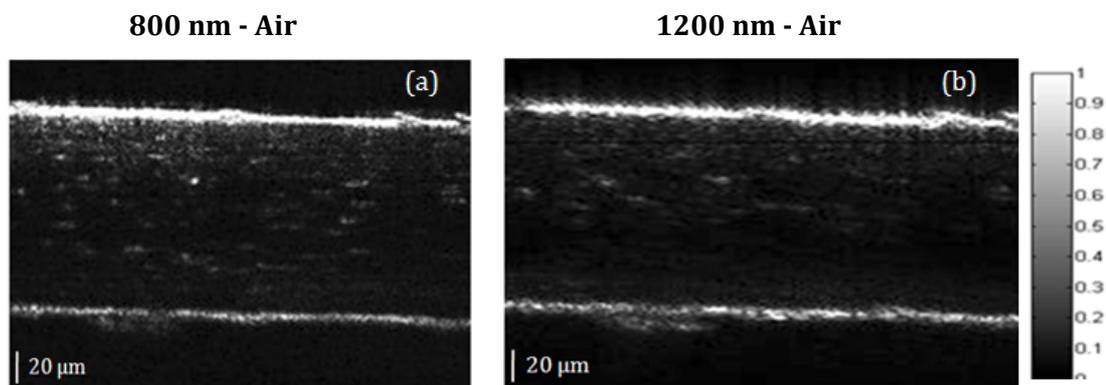


Figure II.20 : Images tomographiques (XZ) obtenues avec le dispositif d'OCT plein champ à 800 nm (a) et 1200 nm (b) d'un cheveu dans l'air, extraites d'une pile de 200 images.

L'adaptation d'indice a également un autre effet assez frappant : bien que le cheveu présenté sur les deux expériences soit le même, il semble plus épais dans le second cas. En effet, dans le cas d'une imagerie à l'aide d'objectifs à immersion dans l'eau, la profondeur de pénétration physique (liée au déplacement axial du moteur) est égale à la profondeur de pénétration réelle dans l'échantillon corrigée par le rapport des indices de réfraction dans l'eau et dans le cheveu alors que dans le cas de l'imagerie dans l'air, la profondeur de pénétration physique doit seulement être divisée par l'indice de réfraction du cheveu pour obtenir la profondeur de pénétration réelle. Il est donc normal que le cheveu semble plus épais lorsqu'on l'imagine dans l'air, puisque le facteur correctif est plus important (puisque la différence d'indice de réfraction entre l'air et le cheveu est plus importante que pour l'eau et le cheveu).

II.2.2 Images d'un milieu diffusant : le papier

Pour tester la validité du gain en profondeur de pénétration avec la longueur d'onde dans les milieux fortement diffusants [70], nous avons imagé du papier, matériau fibreux hautement diffusant. Au-delà de la validation du dispositif expérimental, le développement d'une technique d'imagerie optique à haute résolution est un besoin industriel fort pour caractériser les divers matériaux papier [83].

Dans ce paragraphe, nous présentons les images tomographiques obtenues pour deux sortes de papier, du papier calque 90 g et du papier blanc d'impression 80 g. Les coupes

tomographiques ont été réalisées avec 500 et 100 accumulations, respectivement pour les dispositifs à 800 et 1200 nm, et sans temporisation puisque les mouvements du moteur n'induisaient pas de vibrations notables au niveau de l'échantillon de papier. Le papier était fixé sur un support en U, afin d'éliminer la réflexion parasite du dessous (cf. Figure II.21).

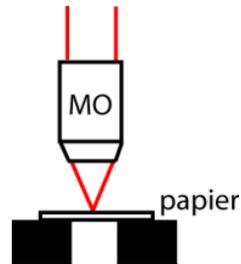


Figure II.21 : Principe de la fixation du papier sur le support en U.

Dans le cas du papier, l'indice de réfraction est assez difficile à définir de façon unique, de part la complexité de structure du matériau (pour illustration, un papier ordinaire est en outre constitué de kaolin, talc, gypse, carbonate de calcium, silice, dont les indices de réfraction sont compris entre 1.45 et 1.57, dans un réseau poreux d'air d'indice de réfraction unité). Dans les coupes axiales présentées dans ce paragraphe, nous avons pris un indice de réfraction moyen du papier de 1.55 (correspondant à l'indice de réfraction de la fibre de cellulose [83]) et corrigé les dimensions axiales par cet indice.

• Papier calque

Les coupes tomographiques obtenues pour le papier calque aux deux longueurs d'onde dans l'air sont représentées sur la Figure II.22.

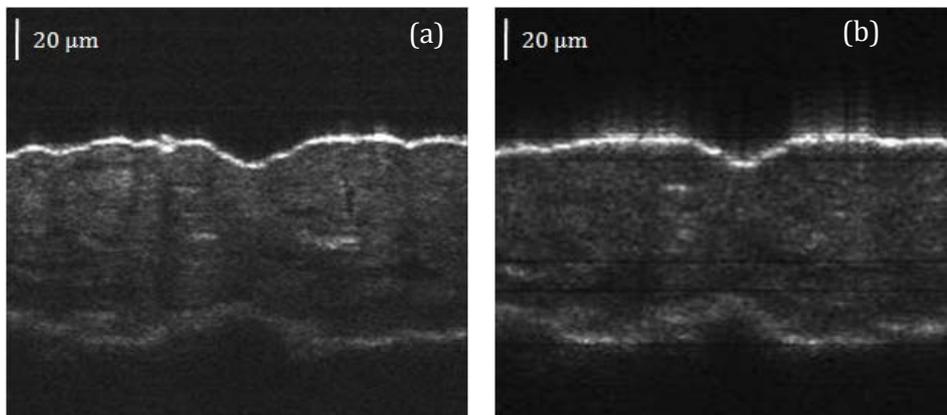


Figure II.22 : Coupes tomographiques (XZ) obtenues avec le dispositif d'OCT plein champ à 800 nm (a) et 1200 nm (b) de papier calque, extraites de 200 images tomographiques en face.

Une fois de plus, le gain lié à la meilleure résolution tridimensionnelle du dispositif à 800 nm apparaît assez clairement. Le gain en profondeur de pénétration n'est lui pas évident par simple comparaison des coupes tomographiques. Pour faciliter cette comparaison, on peut réaliser un profil d'intensité axiale des images tomographiques, sur lequel le gain en intensité de signal avec la profondeur de pénétration apparaît nettement (cf. Figure II.23). Ainsi, comme nous l'avons déjà expliqué pour un milieu fortement diffusant tel que le papier, la profondeur de pénétration augmente lorsqu'on augmente la longueur d'onde d'imagerie, c'est pourquoi la seconde interface est plus visible à 1200 nm.

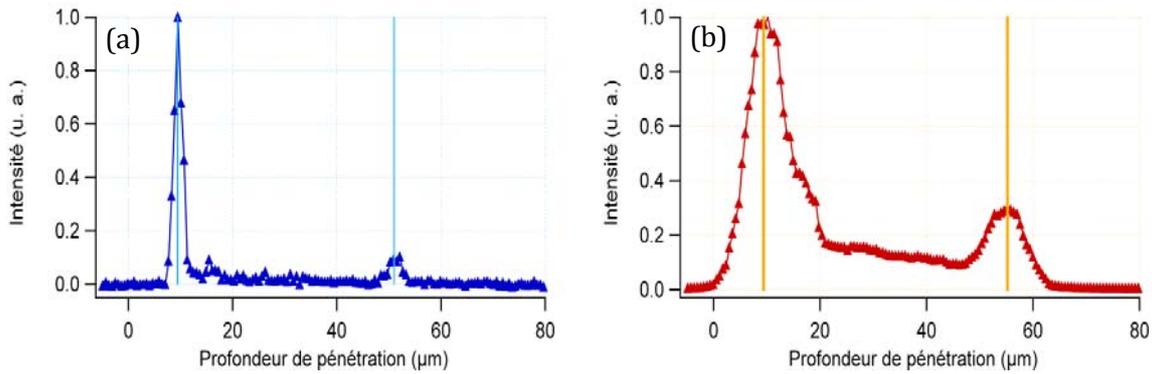


Figure II.23 : Profil d'intensité axiale des images tomographiques du papier calque à 800 nm (a) et 1200 nm (b).

• Papier

Les coupes (XZ) extraites des piles tomographiques obtenues pour le papier blanc d'impression 80 g aux deux longueurs d'onde dans l'air ainsi que le profil d'intensité axiale sont respectivement représentées sur les Figure II.24 et Figure II.25. En modélisant le signal tomographique en fonction de la profondeur de pénétration par une exponentielle décroissante typique de la diffusion par un milieu homogène, des profondeurs d'imagerie caractéristiques de 10,4 μm et 14,6 μm sont respectivement obtenues à 800 nm et 1200 nm.

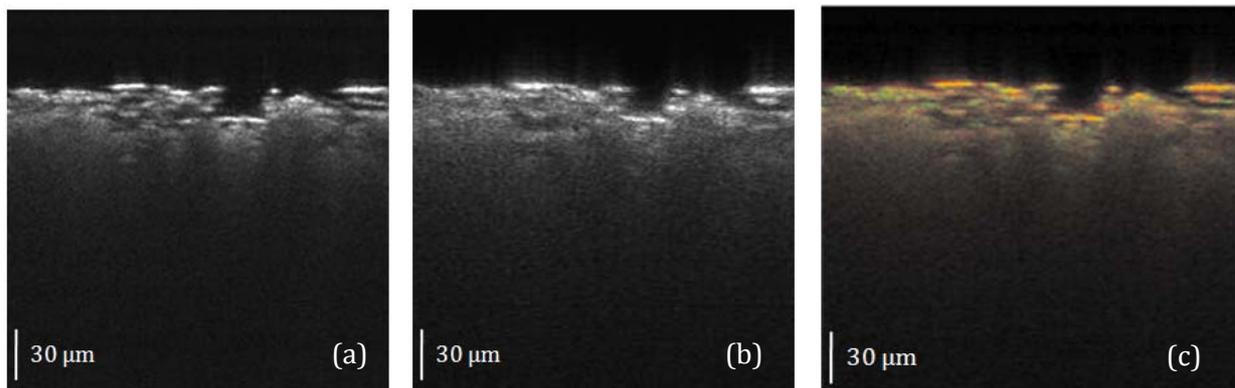


Figure II.24 : Coupes tomographiques (XZ) obtenues avec le dispositif d'OCT plein champ à 800 nm (a) et 1200 nm (b) de papier dans l'air et image différentielle correspondante (c).

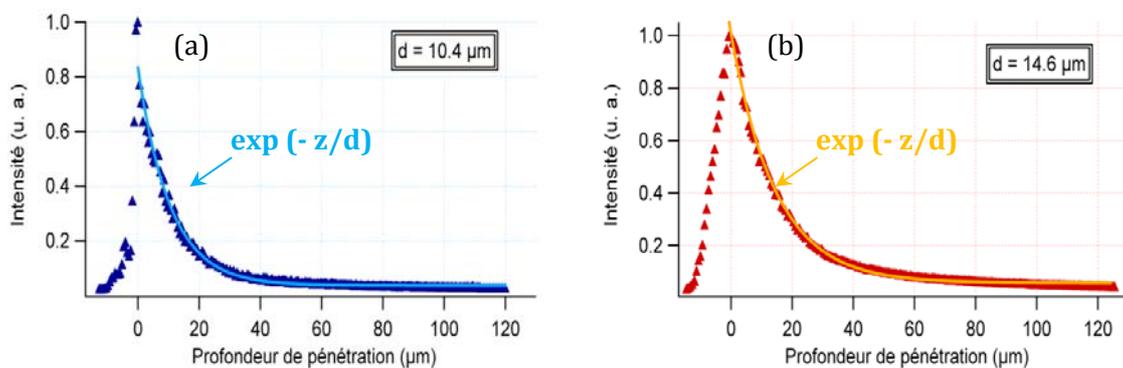


Figure II.25 : Profil d'intensité axiale des images tomographiques du papier à 800 nm (a) et 1200 nm (b).

II.2.3 Images de milieux biologiques

Afin d'illustrer les performances du dispositif à des fins d'imagerie biomédicale, un grand nombre de tissus animaux a été imagé. Tous les tissus ont été imagés *ex vivo*, dans une solution de sérum physiologique pour une plus grande préservation et fixés à l'aide de pâte à modeler pour limiter au maximum tout mouvement. La procédure expérimentale a consisté à enregistrer des piles d'images tomographiques par translation du moteur axial par pas de 1 μm .

Nous présentons dans ce paragraphe une sélection des images obtenues avec ces tissus.

• *Xenopus laevis*

Dans le but de valider la haute résolution tridimensionnelle qu'offre ce dispositif pour l'imagerie d'échantillons biologiques millimétriques, nous avons réalisé des images de la larve *Xenopus laevis*, animal modèle de la famille des amphibiens en biologie du développement. Des coupes tomographiques (XZ) d'une profondeur de 1200 μm ont été réalisées (cf. Figure II.26). Elles sont présentées ici en échelle logarithmique inversée, le blanc correspondant au signal le plus faible (environ à 60 dB) et le noir au signal le plus fort (environ 85 dB).

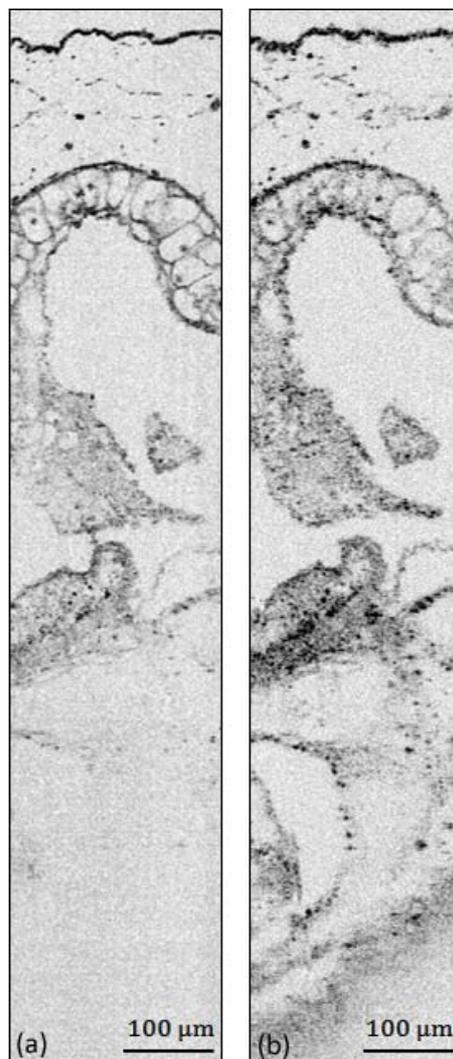


Figure II.26 : Coupes (XZ) obtenues avec le dispositif d'OCT plein champ à 800 nm (a) et 1200 nm (b) de *Xenopus laevis*

On peut ainsi voir l'épiderme, une couche de cellules mésenchymateuses ainsi que certaines structures du système digestif. Comme attendu, les résolutions axiale et transverse sont meilleures avec la caméra Si, pour laquelle la membrane et le noyau des cellules apparaissent clairement. Par contre, une meilleure profondeur de pénétration est atteinte avec la caméra InGaAs, qui révèle les structures diffusantes de l'estomac au-delà de 800 μm de profondeur de pénétration là où la caméra Si ne détecte aucun signal tomographique.

• Trachée et côte de lapin

Nous avons réalisé des images de nombreux tissus de lapin. Nous présentons ici des coupes (XZ) extraites des piles tomographiques d'une partie de la trachée et d'une côte d'une profondeur de 400 μm (cf. Figure II.27 et Figure II.28). Les images présentées sont en échelle logarithmique, le noir correspondant au signal le plus faible (environ 65 dB) tandis que le blanc correspond au signal le plus élevé (environ 85 dB). Les résolutions axiale et transverse sont meilleures avec la caméra Si, mais une meilleure profondeur de pénétration est atteinte avec la caméra InGaAs, du fait de la réduction des phénomènes de diffusion.

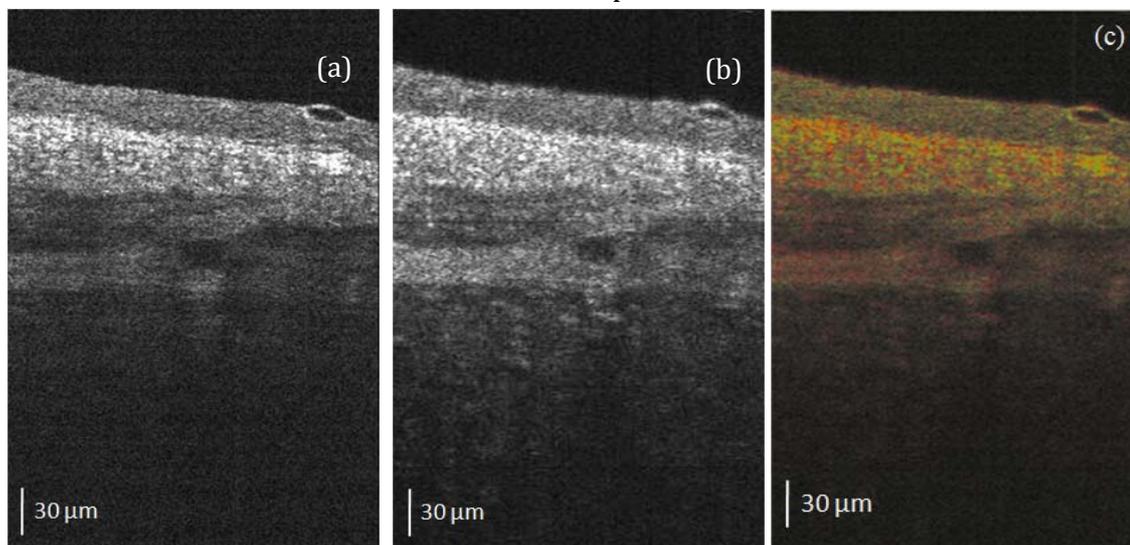


Figure II.27 : Coupes (XZ) obtenues avec le dispositif d'OCT plein champ à 800 nm (a) et 1200 nm (b) d'une trachée de lapin et image différentielle (c).

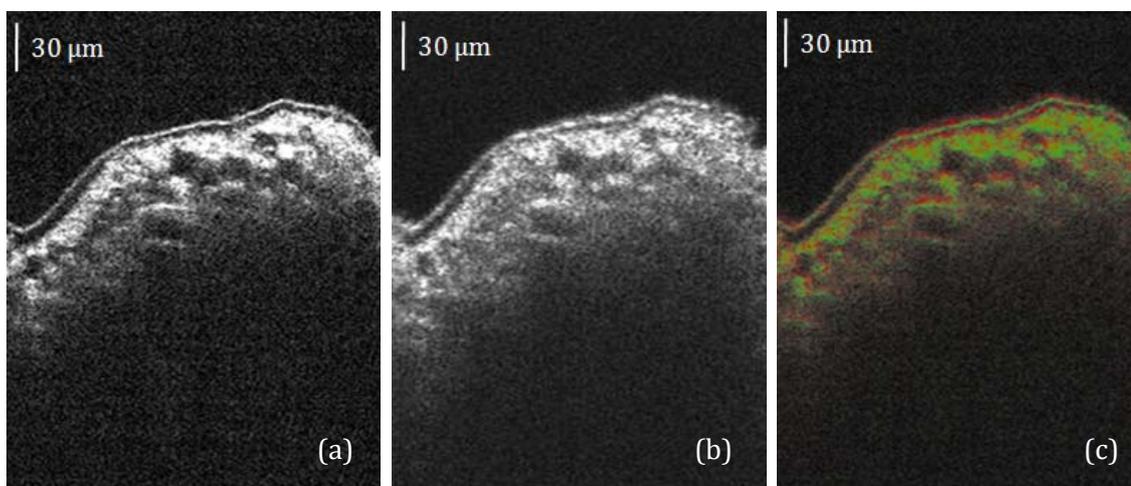


Figure II.28 : Coupes (XZ) obtenues avec le dispositif d'OCT plein champ à 800 nm (a) et 1200 nm (b) d'une côte de lapin et image différentielle (c).

II.2.4 Images de cornée – Application au traitement du glaucome

Le gain en profondeur de pénétration obtenue avec l'augmentation de la longueur d'onde est intéressant pour l'imagerie des cornées pathologiques atteintes de glaucome, puisque celles-ci deviennent très diffusantes. Un projet soutenu par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) est actuellement en cours entre notre laboratoire, le Laboratoire d'Optique Appliquée de l'École Polytechnique (UMR 7639), le Laboratoire Biotechnologie de l'œil de l'Hôpital Hôtel Dieu (EA 2395) et l'entreprise Amplitude Systèmes.

Le glaucome, qui touche entre 80 et 105 millions de personnes, est la seconde cause de cécité dans le monde, 5 à 6 millions de personnes étant aveugles suite au développement de cette maladie [84, 85]. Le glaucome se caractérise par une atrophie progressive des fibres du nerf optique, causant une perte de la vision périphérique puis de la vision centrale, pouvant aller en l'absence de traitement jusqu'à la cécité complète. Les causes exactes de cette pathologie ne sont pas connues, bien que de nombreux facteurs de risque aient pu être identifiés (pression intraoculaire élevée, myopie, antécédents familiaux, augmentation des risques au-delà de 40 ans...). Etant le seul à pouvoir être traité cliniquement, l'élévation de la pression intraoculaire (normalement comprise entre 9 et 21 mm Hg¹) a été le facteur de risque le plus largement étudié au cours des dernières années. Ainsi, plusieurs études ont montré que lorsque la pression intraoculaire dépasse 21 mm Hg, la probabilité de développer une perte du champ visuel augmente rapidement, devenant critique au-delà de 30 mm Hg.

C'est pourquoi la diminution de la pression intraoculaire est un traitement avéré pour prévenir et soigner le glaucome [86]. Il est conduit selon une escalade thérapeutique en plusieurs étapes. Un traitement par collyre bêta-bloquant ou collyre dérivé des prostaglandines est prescrit en premier lieu. Il n'est cependant efficace que dans la moitié des cas. Si le champ visuel continue à se détériorer avec un tel traitement, un traitement chirurgical ou laser est alors effectué.

- Traitement chirurgical : sous microscope opératoire, un canal est créé à travers la sclère dans la chambre antérieure de l'œil afin de permettre à l'humeur aqueuse d'être correctement évacuée (cf. Figure II.29). Cette nouvelle voie d'évacuation de l'humeur aqueuse permet une diminution rapide de la pression intraoculaire. Correctement réalisée, cette opération délicate donne d'excellents résultats, mais la nouvelle voie ainsi créée peut se reboucher, nécessitant une ré-opération dans 50% des cas.

- Traitement par laser : en quelques séances, un laser femtoseconde crée à travers la sclère plusieurs points d'impact sur la circonférence de la cornée élargissant les orifices de sortie de l'humeur aqueuse (i.e. le canal de Schlemm sur la Figure II.29) et améliorant son évacuation. Ce traitement simple ne nécessite pas d'hospitalisation et peut être pratiqué directement au cabinet du praticien. Les résultats de ce traitement sont bons : la pression intraoculaire baisse en moyenne de 30% suite à l'opération permettant d'alléger un traitement médical non efficace et de différer une intervention chirurgicale.

Cependant, la sclère et les cornées pathologiques sont des milieux hautement diffusants. Elles ne sont donc pas transparentes autour de 1 μm , longueur d'onde typiquement utilisée

¹ Le millimètre de mercure (mm Hg) est une unité de mesure de la pression, historiquement définie comme la pression exercée à 0°C par une colonne de 1 mm de mercure. Elle a plus tard été indexée sur le système d'unités international : 1 mm Hg = 133,322 Pa.

pour le traitement laser de la cornée du fait d'une diffusion importante. Il est donc impossible de contrôler l'intervention *in situ*. Le gain en profondeur de pénétration démontré avec la caméra InGaAs dans les autres tissus permettrait d'entrevoir une nouvelle méthode de traitement laser du glaucome : l'utilisation d'un laser femtoseconde centré autour de $1,3 \mu\text{m}$ couplé à une observation *in situ* de l'opération grâce à un dispositif d'OCT utilisant le même faisceau laser pour une illumination à $1,3 \mu\text{m}$.

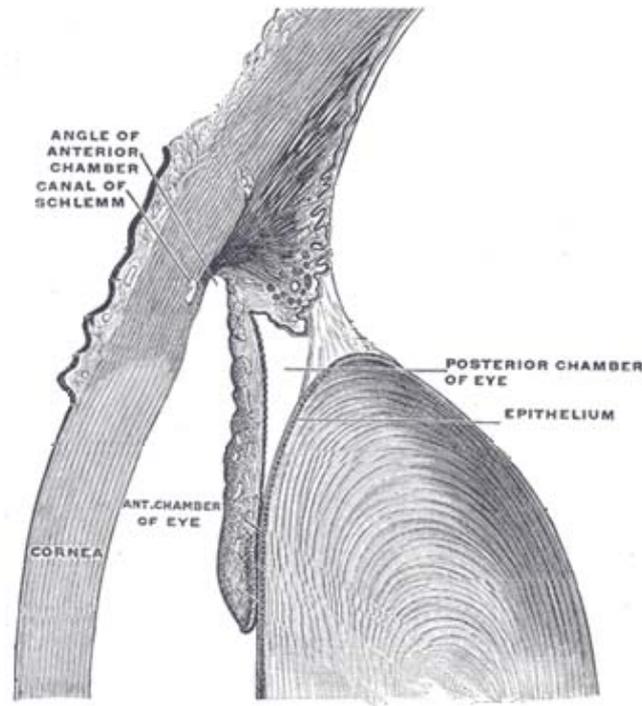


Figure II.29 : Anatomie de l'œil. La chambre antérieure contient l'humeur aqueuse, qui dans le cas d'une cornée saine s'écoule par le canal de Schlemm.

Dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire d'Optique Appliquée de l'Ecole Polytechnique (UMR 7639), nous nous sommes intéressés à l'étude de la cornée, et plus principalement à l'étude de cornées pathologiques, afin de démontrer la faisabilité d'une imagerie à $1,3 \mu\text{m}$.

La cornée est la partie antérieure transparente du globe oculaire. Avec une épaisseur moyenne de $500 \mu\text{m}$, elle représente les deux tiers du pouvoir réfractif de l'œil, le reste étant assuré par le cristallin. La cornée est constituée de trois couches de cellules et de deux membranes (cf. Figure II.30) :

- ✓ l'épithélium : composé d'environ cinq couches de cellules, il a pour rôle de protéger la cornée et faciliter la dispersion du film de larmes à sa surface
- ✓ la membrane de Bowman : couche de collagène diffus
- ✓ le stroma : couche la plus épaisse de la cornée (environ $400 \mu\text{m}$), elle est constituée de cellules, les kératocytes, ainsi que d'un arrangement régulier de fibrilles de collagène permettant la transmission de la lumière
- ✓ la membrane de Descemet : d'une épaisseur d'environ $10 \mu\text{m}$, elle est très élastique, tout en étant perméable à l'eau
- ✓ l'endothélium : monocouche cellulaire, l'endothélium assure la régulation de l'hydratation du stroma, permettant ainsi de conserver l'agencement régulier de ses fibrilles de collagène

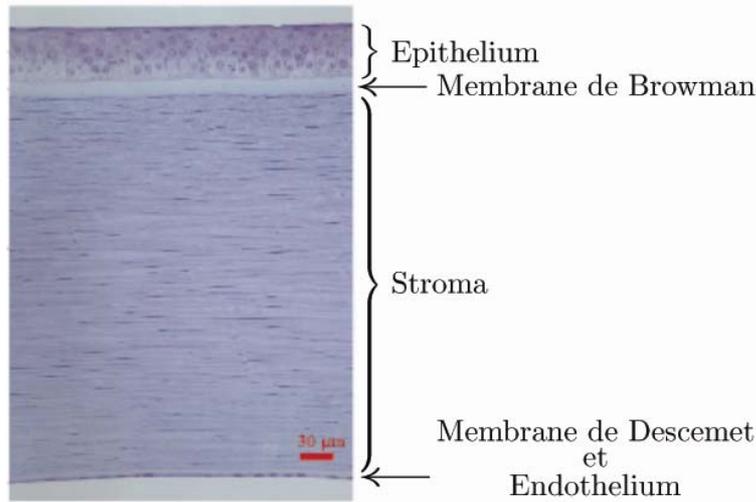


Figure II.30 : Structure axiale de la cornée.

Des coupes (XZ) extraites de piles d'images tomographiques *en face* d'une cornée d'une profondeur de 800 μm ont été réalisées dans la partie transparente de la cornée (au niveau de l'iris) et sont présentées sur la Figure II.31. Les différentes couches supérieures de la cornée sont visibles : l'épithélium dans un premier temps puis la membrane de Bowman ainsi que les deux couches de stroma (le stroma antérieur pour lequel les lamelles de collagène sont organisées de façon oblique et le stroma postérieur pour lequel les lamelles de collagène sont organisées de façon horizontale).

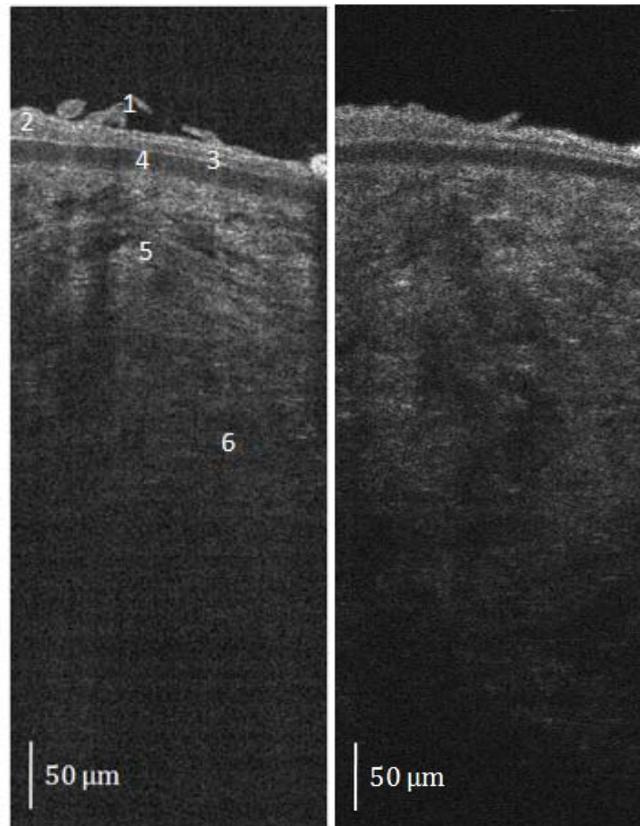


Figure II.31 : Coupes (XZ) d'une cornée obtenues avec le dispositif d'OCT plein champ à 800 nm (gauche) et 1200 nm (droite). (1) Lambeaux d'épithélium, (2) Épithélium, (3) Lamelle basale de l'épithélium, (4) Membrane de Bowman, (5) Stroma antérieur et (6) Stroma postérieur.

Ici encore, les résolutions axiale et transverse sont meilleures avec la caméra Si (pour laquelle l'organisation des lamelles de collagène dans le stroma est plus nette), mais une meilleure profondeur de pénétration est atteinte avec la caméra InGaAs, du fait de la réduction des phénomènes de diffusion. Le gain en profondeur de pénétration est cependant moins important que dans les échantillons précédents puisque le milieu étudié ici est transparent donc faiblement diffusant.

II.3 Conclusion

L'ensemble des expériences effectuées sur différents types d'échantillons a permis de valider le potentiel de notre dispositif d'OCT plein champ sur deux gammes de longueur d'onde. Des images de haute résolution spatiale (échelle micrométrique dans les trois directions) et de sensibilité de détection élevée ont pu ainsi être acquises.

Le dispositif s'est avéré particulièrement efficace pour l'imagerie des milieux biologiques diffusants, pour lesquels un gain substantiel en profondeur de pénétration d'imagerie a été observé à une longueur d'onde d'observation de 1,3 μm par rapport à la longueur d'onde d'observation classique de 0,8 μm .

A partir de ces observations, il serait intéressant d'augmenter encore la longueur d'onde d'illumination/observation pour diminuer les phénomènes de diffusion et donc améliorer la profondeur de pénétration d'imagerie dans les milieux hautement diffusants. Nous sommes toutefois toujours limités par l'absorption des milieux biologiques dans ces gammes de longueurs d'onde, correspondant en majorité à l'absorption de l'eau. Compte tenu de la courbe de transmission de l'eau représentée sur la Figure A.II.12, seule la plage de longueur d'onde 1,6 – 1,8 μm n'est pas totalement absorbée dans la zone de sécurité oculaire (au-delà de 1,4 μm). Il serait donc intéressant dans un travail futur de développer un système d'OCT fonctionnement dans cette gamme de longueur d'onde. Il existe des caméras InGaAs à réponse spectrale étendue dans l'infrarouge, sensibles entre 0,9 et 2,2 μm , qui permettrait d'imager au voisinage de cette longueur d'onde de 1,7 μm .

III. Développement de nouvelles sources lumineuses pour la tomographie par cohérence optique plein champ

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, les performances d'un dispositif de tomographie par cohérence optique dépendent fortement de la source d'illumination.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons développé deux sources lumineuses originales pour l'OCT plein champ basées sur la fluorescence de cristaux dopés ainsi que la combinaison de plusieurs diodes électroluminescentes décalées spectralement.

Pour chacune de ces deux sources, nous présenterons le principe général de fonctionnement, les efficacités obtenues, les performances pour le dispositif d'OCT plein champ ainsi qu'une application spécifique.

III.1 Combinaison de diodes électroluminescentes

Les diodes électroluminescentes ou LED (acronyme de *Light-Emitting Diode*) sont des sources de choix pour l'OCT plein champ du fait de leurs coûts réduits, de leur compacité, de leur faible cohérence spatiale et de l'essor de leur marché qui permet de trouver aujourd'hui des LED de relativement haute luminance à de nombreuses longueurs d'onde, couvrant la quasi-totalité des spectres visible et proche infrarouge. Le premier dispositif d'OCT plein champ utilisait ainsi une LED comme source d'illumination [47]. La principale limitation de ces sources pour l'OCT plein champ est leur relative faible largeur spectrale (typiquement de 30 à 100 nm pour les modèles dans le proche infrarouge) qui limite les résolutions axiales accessibles (typiquement de l'ordre de 4 à 7 μm dans l'eau) comparées à celle obtenue avec une lampe à filament (inférieure au micromètre). Une solution envisagée au cours de ces travaux est la combinaison des faisceaux émis par plusieurs LED spectralement décalées afin d'obtenir un spectre total plus large, fournissant une résolution axiale similaire à celle obtenue avec une lampe à filament.

Lorsqu'on souhaite combiner plusieurs LED spectralement décalées afin d'élargir la largeur spectral totale, plusieurs questions se posent :

- quelles sont les solutions technologiques qui s'offrent à nous pour réaliser la combinaison de ces LED ?
- comment choisir la répartition spectrale (longueur d'onde centrale et largeur spectrale) et l'intensité de chaque LED pour obtenir un spectre total de forme proche d'une gaussienne dans l'espace des nombres d'onde ?
- quelles sont les caractéristiques pertinentes des LED (puissance d'émission au courant nominal, taille de la surface émettrice, angle de rayonnement) pour optimiser le flux émis par la source ?

III.1.1 Techniques de combinaison

Considérons le cas où l'on veut combiner 4 LED spectralement décalées, les techniques présentées ici se généralisant assez facilement à des combinaisons avec un nombre plus important de LED. La forme et la position des différents spectres seront imposées par le spectre global que l'on souhaite réaliser, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. Considérons donc pour fixer les idées l'exemple schématisé sur la Figure III.1.

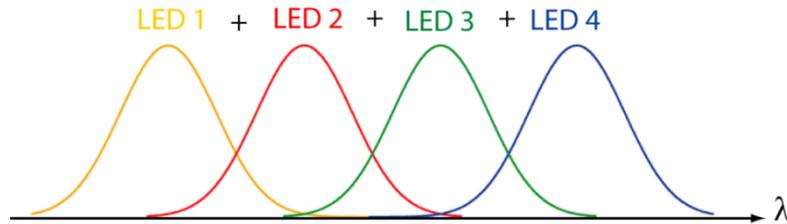


Figure III.1 : Schématisation des spectres normalisés des différentes LED à combiner.

Plusieurs techniques de combinaison peuvent être envisagées pour mélanger spatialement les spectres issus de chaque LED :

- **Combinaison par cubes séparateurs non polarisants** : les faisceaux émis par les LED sont combinés successivement par des cubes non polarisants comme illustré sur la Figure III.2. Cette technique est relativement simple à mettre en œuvre, à condition de collimater correctement les faisceaux issus des LED (ce qui n'est pas toujours aisé compte tenu de la divergence parfois très importante de certains modèles) mais présente l'inconvénient majeur d'une perte massive de flux à chaque passage de cube (pertes de 50%). Ces pertes ne sont de plus pas identiques pour toutes les LED, puisque le faisceau émis par chacune d'entre elles ne traverse pas le même nombre de cubes séparateurs.

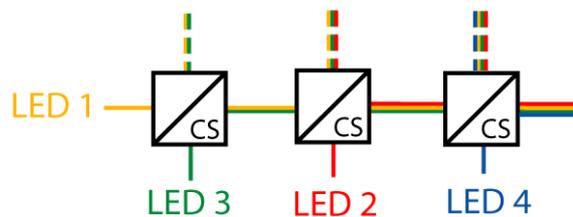


Figure III.2 : Méthode de combinaison par cubes séparateurs non polarisants (CS).

- **Combinaison par miroirs dichroïques et cubes polarisants¹** : les LED (1,3) et (2,4) respectivement sont combinées à l'aide de miroirs dichroïques présentant une haute réflectivité respectivement pour la longueur d'onde centrale de la LED 1 et 4 et une haute transmission respectivement pour la longueur d'onde centrale de la LED 3 et 2. Les LED sont donc couplées deux à deux sans pertes notables ni déformation de la forme globale du spectre, à condition que les spectres des LED combinées par miroirs dichroïques ne se chevauchent pas (comme ceci est le cas dans l'exemple de la Figure III.1). Les faisceaux des deux combinaisons résultantes sont ensuite polarisées selon des directions perpendiculaires afin d'être combinées par un cube polarisant (cf. Figure III.3). Cette méthode est beaucoup

¹ Cette méthode fait l'objet d'un brevet déposé par Thales RT, brevet n°FR2909459(A1).

plus efficace que la précédente et guère plus compliquée à mettre en œuvre si l'on possède les miroirs dichroïques adéquats.

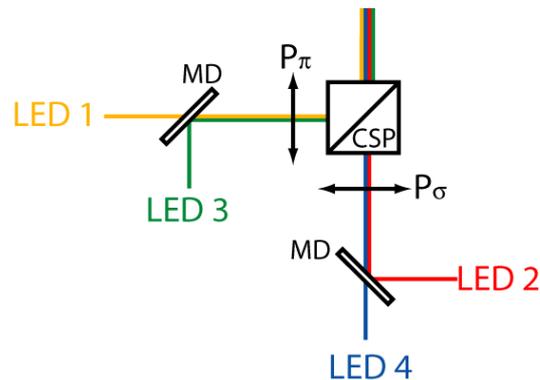


Figure III.3 : Méthode de combinaison par miroirs dichroïques (DM) et cubes polarisants (CSP) après polarisation par des polariseurs (P) sur deux directions perpendiculaires.

- **Combinaison par fibres optiques** : chaque LED est couplée dans une fibre optique et la sortie de la totalité des fibres optiques est ensuite réinjectée dans une unique fibre optique (cf. Figure III.4). Ceci peut être réalisé par fusion des fibres optiques en une unique fibre optique (on parle alors d'un coupleur de fibres optiques) ou par accolement des fibres optiques dans une même gaine (on parle alors d'un *bundle* de fibres) et réinjection dans une unique fibre optique en sortie pour une homogénéisation spatiale des différentes contributions spectrales. Cette méthode, bien que limitée par l'efficacité d'injection dans les fibres optiques, présente un avantage certain en termes de compacité et de facilité d'utilisation finale de la source, puisque celle-ci est fibrée. C'est pour cette raison que nous nous sommes orientés vers cette solution.

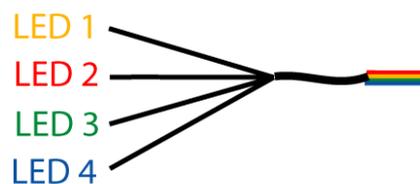


Figure III.4 : Méthode de combinaison par fibres optiques.

III.1.2 Optimisation numérique du spectre global

On souhaite déterminer ici la répartition spectrale (longueur d'onde centrale et largeur spectrale) et la puissance de chaque LED pour obtenir un spectre total qui s'approche le plus possible d'un spectre gaussien dans l'espace des nombres d'onde.

Pour cela, un programme d'optimisation numérique a été développé sous Matlab. Il prend comme paramètres d'entrée la longueur d'onde centrale, la largeur spectrale et la puissance de chacune des LED utilisées pour la combinaison. Ces paramètres peuvent être fixes ou variables afin de s'adapter ou non aux conditions expérimentales (dans la pratique, les longueurs d'onde centrale et les largeurs spectrales sont en effet imposées et seules les puissances relatives de chaque LED sont variables). Le programme optimise alors le spectre total, calculé par somme des spectres individuels, par minimisation de l'écart quadratique moyen entre le spectre total et son ajustement par une fonction gaussienne.

Grâce à ce programme d'optimisation, nous avons pu déterminer l'écart spectral maximal entre LED qui permet de reconstruire un spectre gaussien, et donc acheter les LED appropriées à nos exigences. Pour illustrer cela, prenons l'exemple de 4 LED individuelles de spectres gaussiens dans l'espace des nombres d'onde et de largeur spectrale fixée de 50 nm (valeur typique des LED que nous utiliserons en pratique).

Il est assez aisé de se rendre compte que si les LED sont espacées d'au moins leur largeur spectrale, il est impossible à l'aide du programme d'optimisation d'obtenir une combinaison satisfaisante pour le spectre total (cf. Figure III.5). Le spectre possède une allure assez chahutée, qui aura pour conséquence des rebonds dans l'interférogramme et donc une perte de résolution axiale.

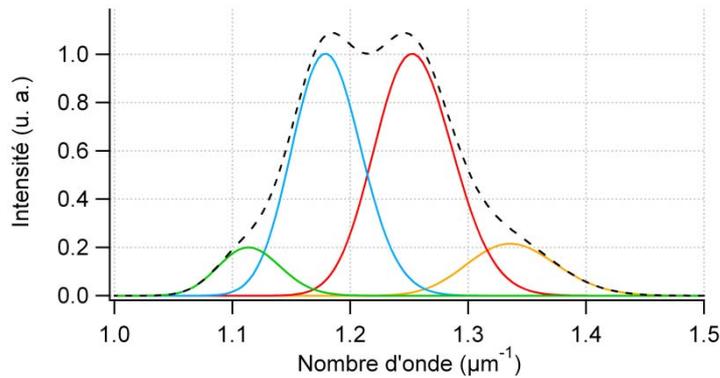


Figure III.5 : Résultat de l'optimisation du spectre total (courbe noire en pointillée) obtenu pour 4 LED (courbes pleines) espacées d'au moins la moitié de leur largeur spectrale.

Au contraire, lorsque les LED sont espacées de la moitié de leur largeur spectrale ou moins, il est possible d'obtenir une combinaison satisfaisante pour le spectre total (cf. Figure III.6), avec un écart quadratique moyen inférieur à 0,05 par rapport à une gaussienne idéale. L'interférogramme est quasiment gaussien dans l'espace des nombres d'onde, ce qui nous assure une résolution axiale optimale pour l'OCT plein champ.

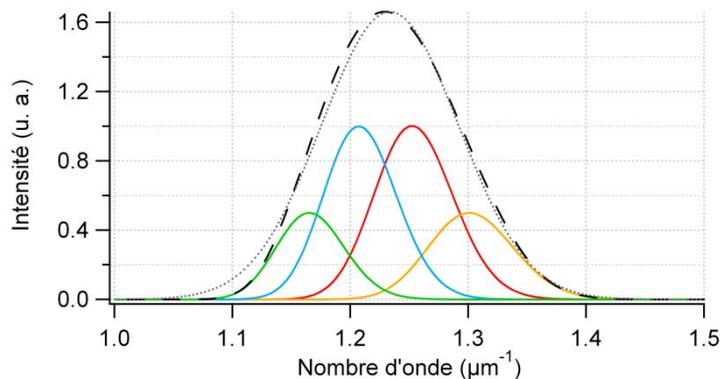


Figure III.6 : Résultat de l'optimisation du spectre total (courbe noire en pointillée) obtenu pour 4 LED (courbes pleines) espacées de moins de la moitié de leur largeur spectrale.

Ce programme sera utilisé dans toute la suite pour optimiser le spectre expérimental résultant de la combinaison de LED.

III.1.3 Mise en place et performances de la source lumineuse

Nous décrivons dans ce paragraphe la mise en place expérimentale de la source par combinaison de LED, ainsi que les efficacités d'injection obtenues.

• Mise en place expérimentale de la source

La technique de combinaison adoptée au cours de ces travaux est donc une combinaison des LED par un *bundle* de fibres optiques¹.

Le *bundle* est constitué de 7 fibres optiques multimodes en silice, possédant une ouverture numérique de 0,35, un cœur de 400 μm de diamètre et une longueur de 1 m, regroupées en sortie de *bundle* dans une unique gaine de diamètre 2000 μm et de longueur 1 m. Une fibre optique multimode est accolée en sortie du *bundle* pour homogénéiser spatialement le spectre de la combinaison (cf. Figure III.7). L'ouverture numérique et le diamètre de cœur de cette fibre multimode (0,35 et 1500 μm respectivement) sont parfaitement adaptés aux caractéristiques du bundle pour un couplage supérieur à 90%.

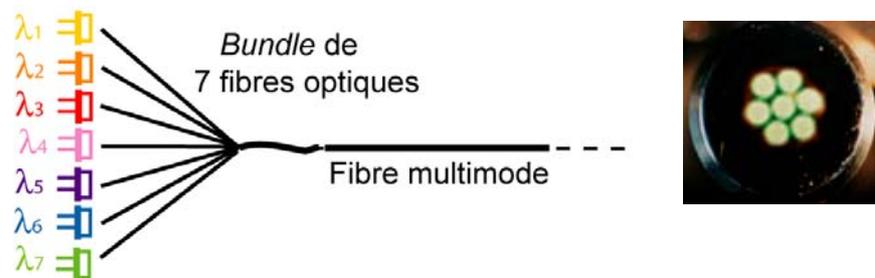


Figure III.7 : Schéma expérimental de la combinaison de LED par bundle (gauche) et sortie du bundle de 7 fibres optiques (droite)

Un large choix de LED infrarouges est disponible sur le marché. Nous avons étudié les caractéristiques principales de LED provenant de trois fournisseurs différents (Opnext, Thorlabs et Roithner Laser), qui sont résumées dans le tableau ci-dessous :

	Opnext	Thorlabs	Roithner
Longueur d'onde centrale (nm)	740 – 900	780 – 940	810 – 940
Largeur spectrale à mi-hauteur (nm)	50	40	30
Courant d'alimentation nominal (mA)	250	100	350
Puissance d'émission (mW)	50	18	40
Diamètre de la zone d'émission (mm)	0,45	1	2
Demi-angle de rayonnement (°)	50	15	15
Luminance ($\text{W}/\text{cm}^2.\text{sr}$)	14	11	6

Tableau III.1 : Caractéristiques des différents modèles de LED testés.

¹ Des essais ont également été réalisés avec un coupleur de fibres optiques mais les diamètres de cœur et les ouvertures numériques sont plus faibles dans ce type de technologie (respectivement 200 μm et 0,22) ce qui réduit considérablement les efficacités d'injection et donc la puissance disponible en sortie du système.

Pour maximiser l'efficacité d'injection lors du couplage dans une fibre optique du *bundle*, il faut que la luminance de la LED, définie comme le rapport de la puissance d'émission sur le produit de la surface par l'angle solide d'émission, soit le plus grand possible.

Il apparaît au vu de ces considérations que les LED de Roithner Laser ne sont pas du tout adaptées. Les deux autres modèles de LED sont quant à eux pratiquement équivalents en termes de luminance. Cependant, les LED Thorlabs présentent une lentille boule en sortie de la surface émettrice. Celle-ci dégrade considérablement l'homogénéité spatiale d'émission, ce qui se reporte directement sur l'efficacité d'injection. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur les modèles proposés par Opnext. Bien qu'il soit possible de combiner jusqu'à 7 LED, la source a été constituée pour cette étude de 5 LED de longueurs d'onde différentes disponibles commercialement chez Opnext : 771 et 804 nm (modèle HE7601SG), 830 et 836 nm (modèle HE8404SG) et 859 nm (modèle HE8812SG). Ces LED sont bien espacées d'environ la moitié de leur largeur spectrale.

• Performances

Les meilleures performances pour l'injection dans les fibres optiques du *bundle* du faisceau émis par les LED ont été obtenues sans optique de collimation¹, en accolant la LED au plus près de la face d'entrée de la fibre. Dans ces conditions, une efficacité d'injection moyenne de 18% a été obtenue avec les différentes LED. Cette efficacité est proche de l'efficacité théorique de 25%, donnée par le rapport des étendues géométriques et en tenant compte des pertes par réflexion aux faces d'entrée et de sortie des fibres optiques du *bundle* qui ne possèdent pas de traitement antireflet.

III.1.4 Performances comme source pour l'OCT plein champ

• Dispositif expérimental

Pour caractériser les performances de la combinaison de LED pour l'imagerie tomographique, nous l'avons utilisée pour illuminer notre dispositif d'OCT plein champ (cf. Figure III.8). La caméra du dispositif est la caméra Silicium précédente (modèle CA-D1 de Dalsa, 256×256 pixels, 8 bits, 200 Hz, capacité de charge des pixels de 120 000 électrons) puisqu'elle possède la sensibilité spectrale la plus adaptée au spectre généré par la combinaison.

Le faisceau issu de la fibre multimode est collimaté à l'aide d'une lentille de courte distance focale ($f' = 30$ mm,) et de grande ouverture ($\phi = 2,54$ cm) pour maximiser l'ouverture numérique de collection et donc optimiser le flux envoyé dans le dispositif d'OCT plein champ. Afin d'obtenir un éclairage homogène au niveau du plan de mise au point des objectifs de microscope, la face de sortie de la fibre est dans un premier temps placée au foyer objet de la lentille de collimation puis légèrement décalée axialement (de quelques millimètres) afin de ne pas ré-imager la structure de la surface de sortie au niveau du plan de mise au point des objectifs de microscope.

Le schéma du dispositif expérimental {source à combinaison de LED + OCT plein champ} est présenté sur la Figure III.8.

¹ La divergence des LED est telle qu'un couplage avec optique de collimation nécessiterait des optiques de grande ouverture numérique, tels que des objectifs de microscope, ce qui est très coûteux.

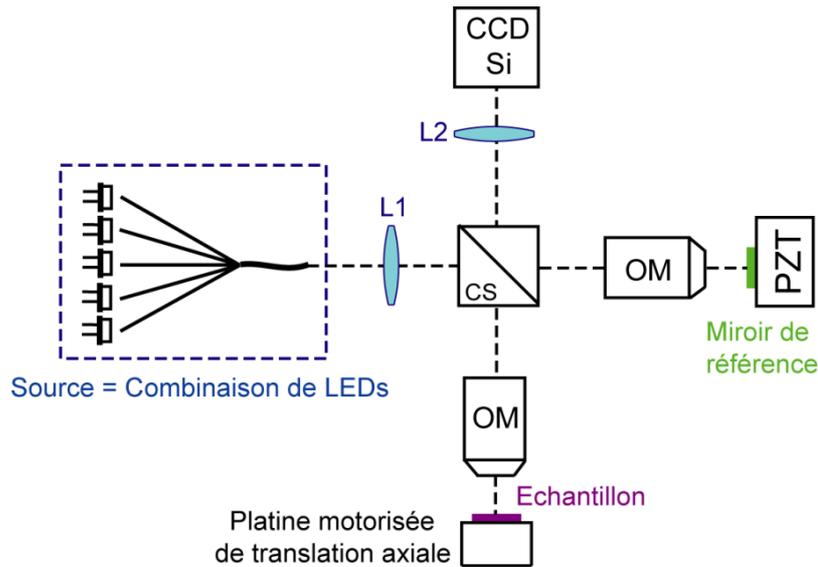


Figure III.8 : Dispositif expérimental pour la tomographie par cohérence optique plein champ avec illumination par combinaison de LED. CS : cube séparateur, OM : objectif de microscope, PZT : transducteur piézoélectrique, L1 et L2 doublets achromatiques.

• Résolution spatiale

Comme nous l'avons vu précédemment, la *résolution axiale* du dispositif d'OCT plein champ est imposée par la longueur d'onde centrale et la largeur spectrale de la source d'illumination. De plus, l'interférogramme étant la transformée de Fourier du spectre effectif (produit du spectre de la source, de la transmission des différents composants optiques et de la réponse spectrale du détecteur), la forme du spectre doit être idéalement de forme gaussienne dans l'espace des nombres d'onde, afin d'éviter tout rebond qui dégraderait la résolution. Dans le cas de la combinaison de LED, il faut donc ajuster la contribution de chaque LED dans le spectre afin d'optimiser la largeur spectrale totale sans dégrader l'interférogramme. Cet ajustement est réalisé à l'aide du courant d'alimentation de chaque LED, qui permet de modifier finement la puissance délivrée par la LED (cf. Figure III.9).

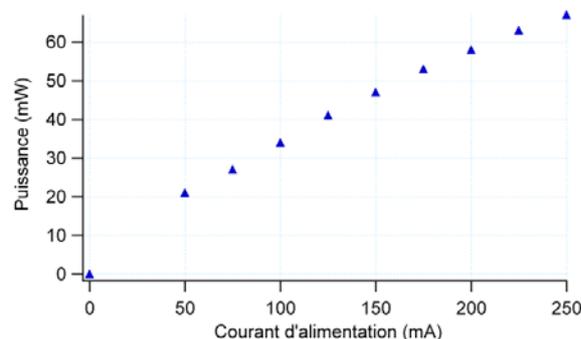


Figure III.9 : Puissance délivrée par une LED en fonction de son courant d'alimentation.

Cependant, le courant d'alimentation de la LED influe également sur sa longueur d'onde centrale d'émission ainsi que sur sa largeur spectrale (par élévation de la température de la jonction p-n), et donc sur le spectre de la combinaison. Nous avons caractérisé le spectre d'émission de chaque LED en fonction de son courant d'alimentation (cf. Figure III.10). De manière générale, la longueur d'onde d'émission et la largeur spectrale augmentent avec le courant d'alimentation.

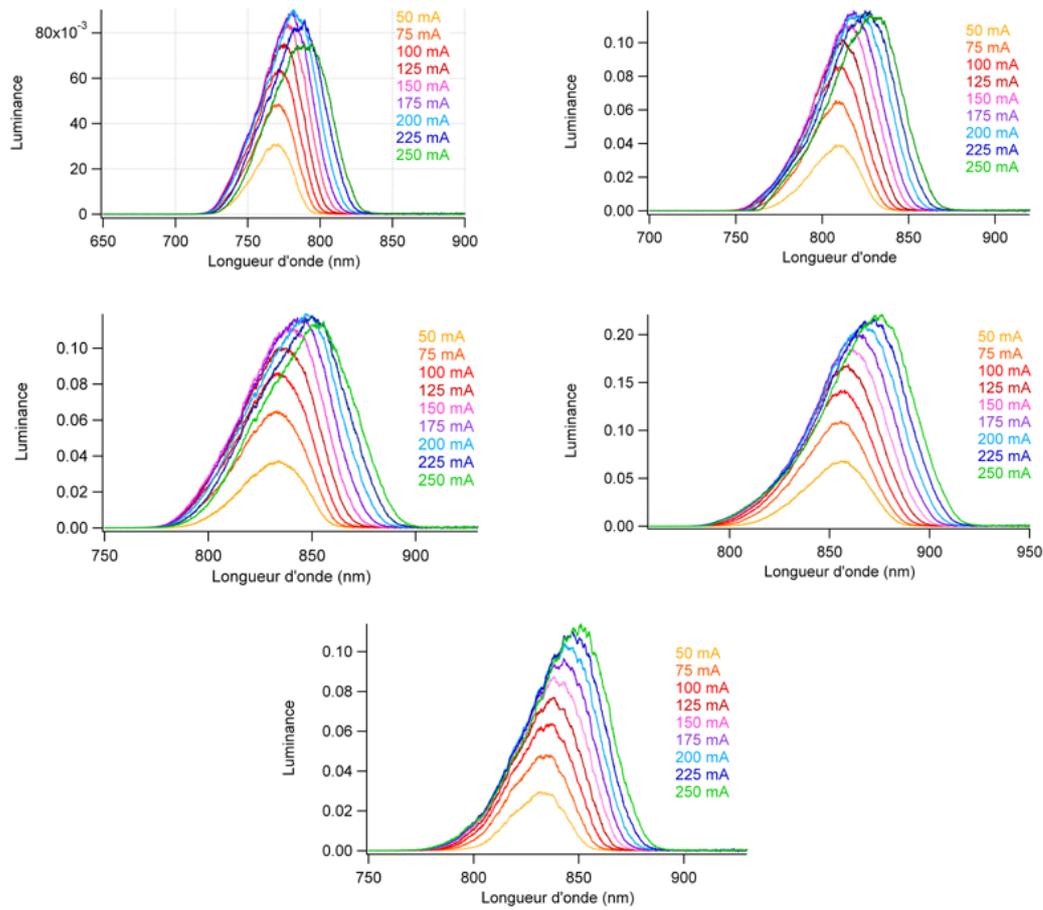


Figure III.10 : Caractérisation spectrale des différentes LED utilisées pour la source en fonction du courant d'alimentation appliqué.

Le Tableau III.2 résume les valeurs de puissance, longueur d'onde centrale d'émission et largeur spectrale en fonction du courant d'alimentation pour les différentes LED utilisées pour la source. Ces valeurs nous ont permis de développer un programme sous Matlab, permettant de déduire les courants d'alimentation à appliquer à chaque LED pour obtenir le spectre idéal, de largeur spectrale maximale tout en possédant une forme s'approchant le plus possible d'une gaussienne dans l'espace des nombres d'onde.

I (mA)	Puissance (mW)					Longueur d'onde (nm)					Largeur spectrale (nm)				
	772	804	830	836	859	772	804	830	836	859	772	804	830	836	859
50	16	19	20	21	22	765	804	830	831	851	19	20	21	17	22
75	21	25	26	27	28	767	806	830	831	852	21	21	23	19	24
100	27	32	32	34	34	769	807	831	833	854	22	23	25	21	25
125	33	38	38	41	42	771	809	833	835	856	23	24	26	22	26
150	39	44	45	47	49	774	812	835	837	858	24	25	27	23	27
175	44	49	51	53	54	776	815	838	839	861	25	26	28	24	28
200	47	53	55	57	60	779	818	841	841	863	27	27	29	25	29
225	50	58	61	62	63	783	821	845	843	866	28	28	30	26	30
250	53	60	64	65	67	786	825	848	845	869	29	29	31	27	31

Tableau III.2 : Valeurs des puissance, longueur d'onde centrale d'émission et largeur spectrale des différentes LED utilisées pour la combinaison en fonction de leur courant d'alimentation.

La Figure III.11 représente les spectres expérimentaux individuels de chaque LED ainsi que le spectre expérimental total optimisé par le programme Matlab, correspondant à une puissance totale en sortie de la fibre multimode de ~ 40 mW. Le spectre total est centré autour de 850 nm et de largeur spectrale 115 nm, ce qui conduit à une résolution axiale de $2,1 \mu\text{m}$ dans l'eau d'après l'équation (II.11).

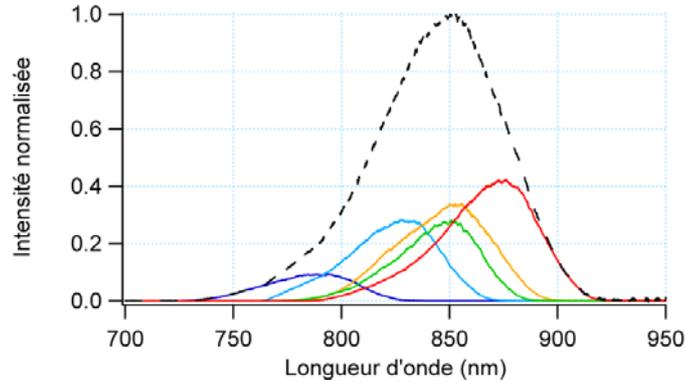


Figure III.11 : Spectre individuels des LEDs (courbes pleines) et spectre émis par leur combinaison (courbe en pointillé) après optimisation sous Matlab.

Expérimentalement, la résolution axiale est définie par la largeur à mi-hauteur de l'enveloppe de l'interférogramme. Pour l'évaluer, nous avons donc enregistré l'interférogramme obtenu dans l'eau (cf. Figure III.12). On en déduit une résolution axiale expérimentale de $2,2 \mu\text{m}$ dans l'eau, ce qui est similaire à la valeur théorique calculée précédemment. Les rebonds présents dans l'interférogramme sont dus à la forme non parfaite du spectre (i.e. non gaussienne dans l'espace des nombres d'onde) mais ne modifieront pas de façon notable la qualité des images tomographiques du fait de leur faible intensité relative.

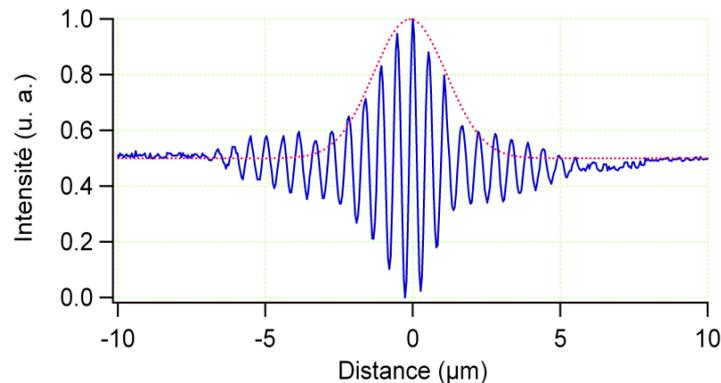


Figure III.12 : Interférogramme du dispositif d'OCT plein champ éclairé par la combinaison de LEDs, réalisé avec un miroir métallique dans chaque bras et dans l'eau.

La *résolution transverse* est quant à elle liée à la longueur d'onde centrale d'illumination, à l'ouverture numérique des objectifs de microscope et à l'éventuel échantillonnage de la caméra. Elle vaut donc $1,6 \mu\text{m}$, comme dans le chapitre précédent.

• Sensibilité de détection

La sensibilité de détection d'un dispositif d'OCT dépend de la proportion de signal utile dans le signal total détecté, c'est-à-dire du contraste des interférences. Pour un dispositif

d'OCT plein champ basé sur une configuration Linnik, il a été démontré que ce contraste dépend de la cohérence spatiale de la source d'illumination [52, 87]. On améliore la cohérence spatiale de la source à LED à l'aide d'un diaphragme placé entre la sortie de la fibre et la lentille de collimation. En pratique, on réduit la taille du diaphragme, ce qui réduit le flux envoyé dans l'interféromètre, jusqu'à être à la limite de saturation sur la caméra en conditions expérimentales (échantillons biologiques dans l'eau pour le bras objet et cristal de YAG dans l'eau pour le bras de référence). Dans ces conditions, nous avons comparé la sensibilité de détection expérimentale du dispositif d'OCT plein champ éclairé par la source à LED et la lampe halogène avec diaphragme d'ouverture fermé au maximum (ce qui permet également d'être à la limite de saturation sur la caméra dans les mêmes conditions expérimentales). La méthode de cette mesure est expliquée dans la section II.1.4. Les résultats expérimentaux sont présentés sur la Figure III.13.

Des sensibilités de détection de 80 dB, correspondant à un coefficient de réflexion minimal détectable inférieur à 10^{-8} , sont facilement accessibles avec les deux sources d'illumination pour un nombre d'accumulations similaire. La sensibilité de détection varie linéairement avec le nombre d'accumulation, ce qui indique que la détection est limitée par le bruit de grenaille.

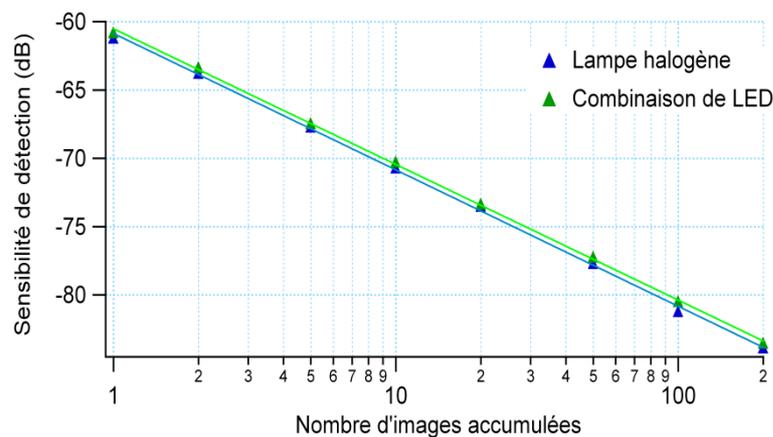


Figure III.13 : Sensibilité de détection du dispositif avec illumination par la lampe halogène et illumination par la combinaison de LED. Les points correspondent aux mesures expérimentales et les courbes à l'équation (II.14).

• Comparaison des performances d'imagerie lampe halogène/source de fluorescence

Pour démontrer les performances de la combinaison de LED comme source d'illumination pour l'OCT plein champ, une larve *Xenopus Laevis* a été imagée, l'échantillon *ex vivo* étant immergé dans une solution de sérum physiologique. La procédure expérimentale a consisté à enregistrer une pile d'images tomographiques à différentes profondeurs de pénétration par translation de la platine axiale par pas de $1 \mu\text{m}$. L'échantillon a été éclairé successivement avec la lampe halogène et la source de fluorescence. Les coupes (XZ) ainsi obtenues au niveau de la tête de l'échantillon, extraites d'une pile de $250 \times 250 \times 500 \mu\text{m}^3$ sont présentées sur la Figure III.14 en échelle logarithmique, le noir correspondant au signal le plus élevé (~ 60 dB) tandis que le blanc correspond au signal le plus faible (~ 85 dB). Les performances d'imagerie des deux sources d'illumination sont en conclusion assez comparables.

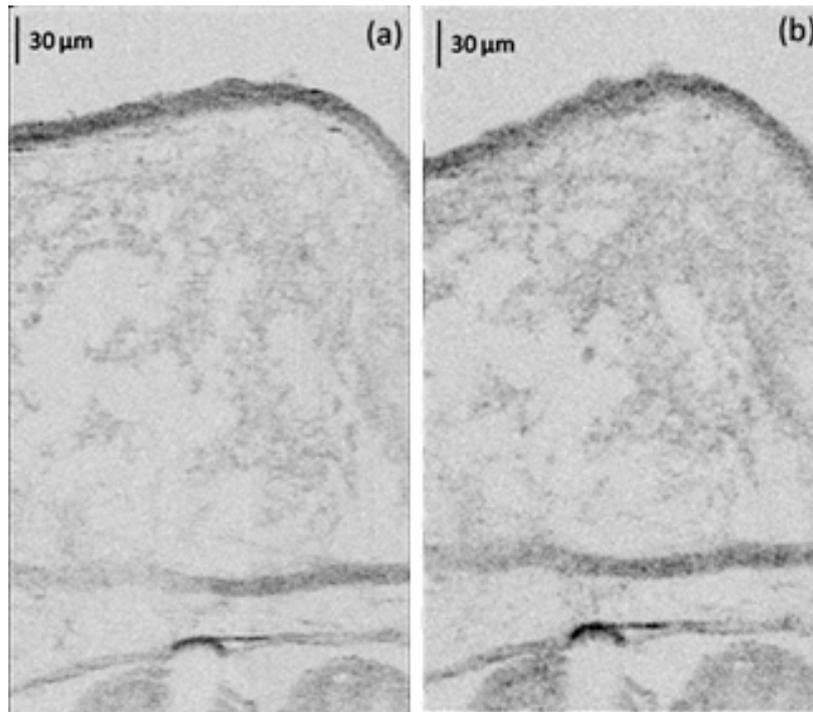


Figure III.14 : Coupes tomographiques (XZ) obtenues avec le dispositif d'OCT plein champ avec illumination par la lampe halogène (a) et la combinaison de LED (b) de *Xenopus laevis*

III.1.5 Application spectroscopique

Nous décrivons dans ce paragraphe une application de la source à combinaison de LED pour l'OCT plein champ : une alternative simple et rapide à l'OCT plein champ spectroscopique « traditionnelle ».

• Principe et limitation de l'OCT plein champ spectroscopique « traditionnelle »

L'OCT spectroscopique est une extension des techniques d'OCT conventionnelles qui permet d'extraire, outre l'image tomographique de l'échantillon, une information spectroscopique [72, 75, 88], obtenue à l'aide d'une analyse de Fourier du signal interférométrique. Elle donne accès aux composantes spectrales rétrodiffusées par l'échantillon et donc aux propriétés de diffusion et d'absorption de l'échantillon sur la totalité du spectre incident. Bien que très différents (l'absorption est un phénomène global se cumulant sur tout le chemin optique alors que la diffusion est un phénomène local ayant lieu aux interfaces d'inhomogénéités d'indices de réfraction), ces deux processus sont difficiles à distinguer [89, 90].

Dans l'OCT plein champ spectroscopique développée antérieurement, l'information spectroscopique, la densité spectrale de puissance, est obtenue par transformées de Fourier discrètes du signal interférométrique acquis par chaque pixel de la caméra sur la totalité de la profondeur de l'échantillon [75]. Cette méthode spectroscopique nécessite donc un déplacement axial de l'échantillon inférieur à 200 nm, afin que l'échantillonnage du signal interférométrique à partir duquel on reconstruit l'information spectroscopique respecte le critère de Nyquist. L'étude d'un échantillon sur 200 μm d'épaisseur nécessite donc l'acquisition 4000 images tomographiques, imposant un temps d'acquisition très long, puis le traitement numérique de ces 4000 images. Le traitement numérique consiste en la

réalisation de $N \times N$ transformées de Fourier rapides locales (N étant le nombre de pixels de la caméra utilisée) avec accroissement de la taille des vecteurs données par ajout de zéros afin de réduire le pas d'échantillonnage de la transformée de Fourier discrète, puis calcul du centre de masse du spectre. Ce traitement numérique est évidemment très lourd en termes de temps de calcul (plusieurs heures) et capacité de stockage requise (plusieurs centaines de giga-octets), ce qui limite considérablement son application, en particulier pour l'imagerie *in vivo*.

Nous proposons ici une méthode alternative, en tirant parti de la modularité spectrale de la source à combinaison de LED. En éclairant successivement l'échantillon avec différents spectres (par exemple les spectres des différentes LED) et en comparant les images tomographiques obtenues, on peut en déduire les propriétés de diffusion et d'absorption de l'échantillon sur les différentes gammes spectrales utilisées. L'analyse spectroscopique proposée ici est certes beaucoup moins précise que par analyse de Fourier (on n'a accès aux propriétés de l'échantillon que sur des gammes spectrales plus ou moins larges) mais présente l'avantage d'être simple dans sa mise en œuvre et ses traitements numériques.

• Illustration de la modularité du spectre et de sa reconstruction

L'un des avantages majeurs de la combinaison de LED est la grande facilité dans la modularité du spectre d'émission : en modifiant simplement le courant d'alimentation de chaque LED, on peut créer sans ajouter de filtres de nombreux spectres, de longueur d'onde moyenne, de largeur spectrale et de forme diverses.

Afin d'illustrer cette propriété, nous avons réalisé différents spectres d'émission que nous avons acquis à l'aide d'un spectromètre sensible dans le proche infrarouge (spectromètre HR4000 de Ocean Optics). La Figure III.15 (haut) montre les spectres obtenus dans le cas où seule la LED à 804 nm est alimentée (figure de gauche) et dans le cas où deux LED, à 771 nm et 859 nm, sont alimentées (figure de droite). L'interférogramme associé à ces spectres est présenté sur la Figure III.15 (milieu). Une transformée de Fourier discrète, avec apodisation par fenêtre de Hanning et accroissement de la taille des vecteurs données par ajout de zéros afin de réduire le pas d'échantillonnage de la transformée de Fourier discrète, de ces interférogrammes permet de retrouver la forme exacte du spectre incident, comme le montre la Figure III.15 (bas).

On retrouve bien la forme du spectre incident puisque les objets présents dans les bras de l'interféromètre ont un coefficient de réflexion quasiment indépendant de la longueur d'onde dans la plage de longueur d'onde considérée. Dans le cas où l'objet présente une réponse dépendant de la longueur d'onde, le spectre reconstruit sera différent du spectre incident et la comparaison de ces deux spectres permettra de déduire les propriétés spectroscopiques de l'échantillon sur la gamme spectrale sondée. C'est ce principe que nous souhaitons mettre en œuvre dans l'analyse spectroscopique.

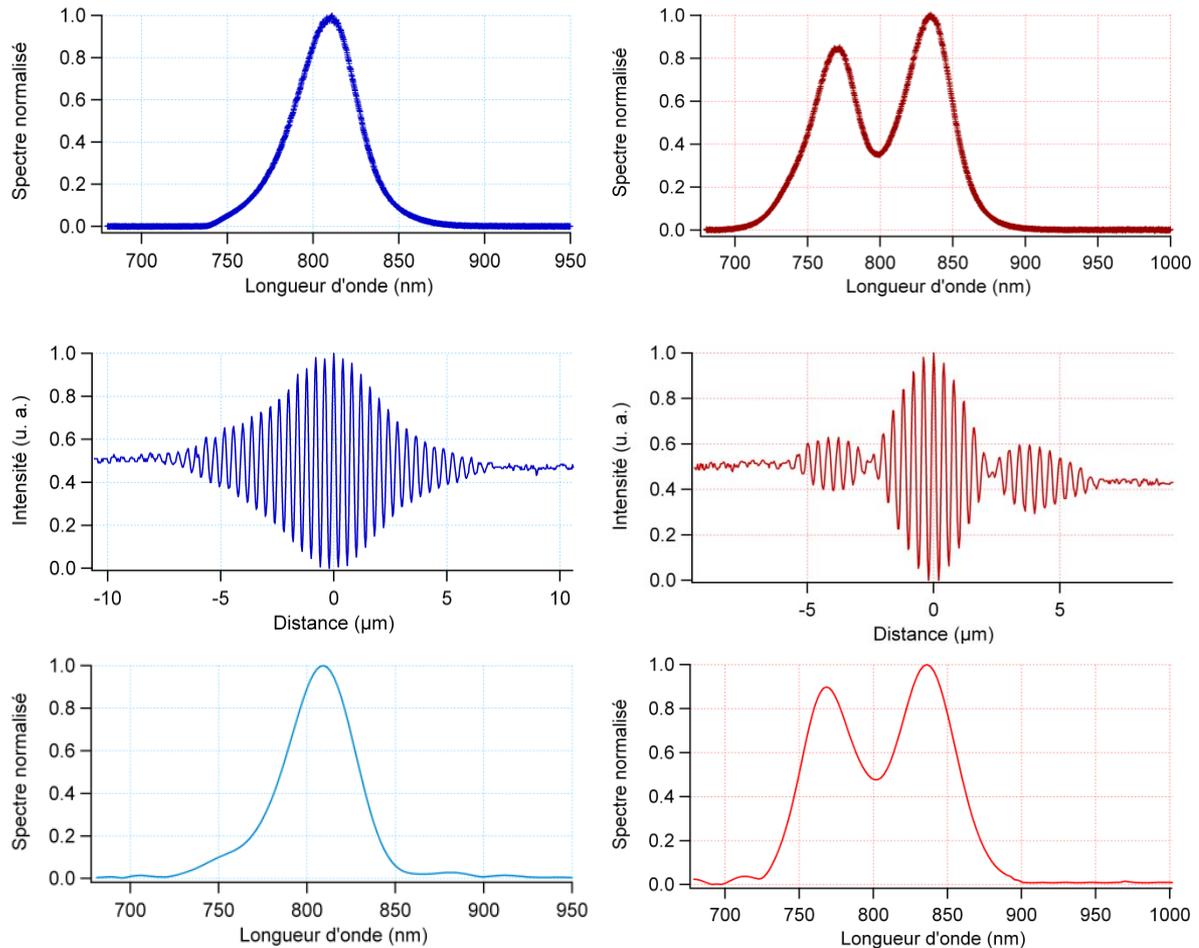


Figure III.15 : Illustration de la modularité du spectre obtenu par la combinaison LED et la reconstruction de ce spectre par le dispositif d'OCT plein champ.
 (haut) Spectre à la sortie de la fibre optique, mesuré à l'aide d'un spectromètre.
 (milieu) Interférogramme enregistré par le dispositif d'OCT plein champ.
 (bas) Spectre reconstruit par transformée de Fourier de l'interférogramme.

• OCT plein champ spectroscopique avec la combinaison de LED

Nous souhaitons étudier les différences de réponse de l'échantillon en fonction de la longueur d'onde, et ceci sur tout le spectre effectif du dispositif. Un premier diagnostic, peu coûteux en temps d'acquisition et en traitement numérique, consiste à enregistrer des images tomographiques standard (c'est-à-dire avec un pas d'échantillonnage axial de l'ordre du micromètre) en allumant successivement chaque LED, c'est-à-dire en illuminant l'échantillon successivement à 5 longueurs d'onde différentes, de 770 à 860 nm. Les différences éventuelles entre les différentes images tomographiques sont directement reliées aux propriétés spectrales d'absorption de l'échantillon (en général, les propriétés de diffusion ne variant pas de façon assez significative sur cette gamme de longueur d'onde).

Afin de tester la validité de cette méthode, nous l'avons appliqué à de l'encre bleue présentant un spectre d'absorption très marqué sur la gamme spectrale des LED utilisée (cf. Figure III.16). Une pile d'images tomographique a été réalisée sur une goutte d'environ 200 μm d'épaisseur en éclairant successivement avec la LED à 771 nm et la LED à 859 nm. Les coupes axiales obtenues sont présentées respectivement sur la Figure III.17 (gauche) et

la Figure III.17 (droite) et traduisent effectivement l'absorption supérieure de l'encre à 771 nm.

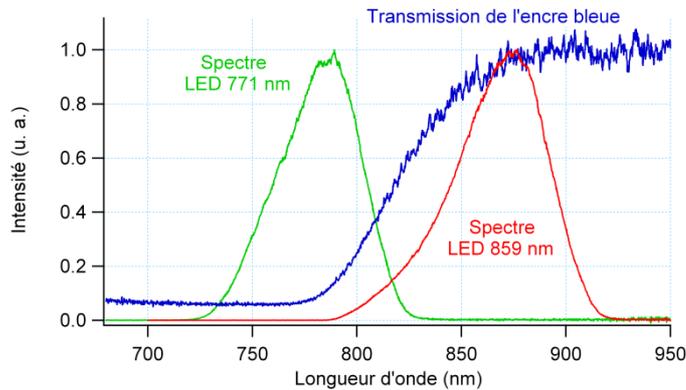


Figure III.16 : Transmission de l'encre bleue en fonction de la longueur d'onde et comparaison avec les spectres d'émission des LED utilisées pour la combinaison.

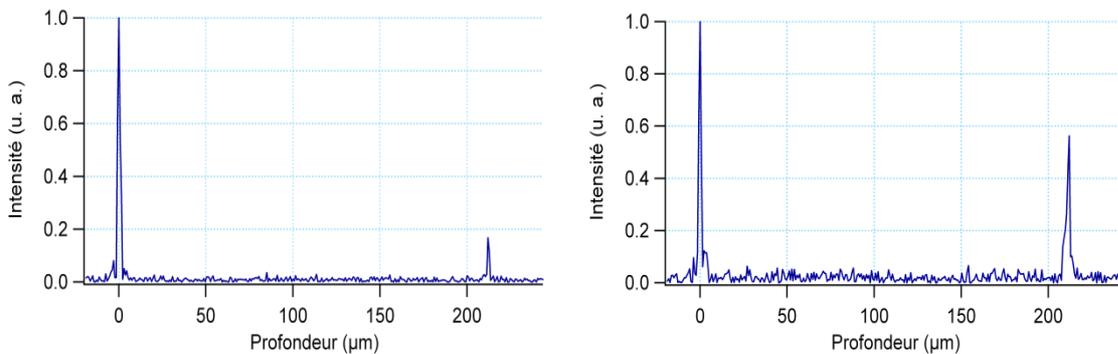


Figure III.17 : Coupes tomographiques axiales obtenues pour une goutte d'environ 200 µm d'encre bleue éclairée par la LED à 771 nm (gauche) et la LED à 859 nm (droite).

Cette méthode pourrait donc être utilisée pour distinguer différents pigments ou encres dans les œuvres artistiques (tableaux, vernis d'instruments de musique...). Cependant, il faut évidemment réaliser un compromis entre les résolutions axiale et spectrale des différentes images tomographiques réalisées, résolutions toutes deux imposées par la largeur spectrale de la source lumineuse utilisée.

Cette technique est donc un bon point de départ à l'étude spectroscopique de l'échantillon, qui peut être complétée si cela est nécessaire par la méthode « traditionnelle » décrite précédemment.

III.1.6 Perspectives : le projet BUNDEL

Depuis Septembre 2006, l'Institut d'Optique *Graduate School* a développé une nouvelle filière au sein de son cursus : la Filière Innovation Entrepreneurs (FIE). Cette filière a pour mission la diffusion d'un esprit d'innovation et d'entrepreneuriat auprès de ses étudiants. Afin d'y parvenir, elle se structure en 2 étages imbriqués l'un dans l'autre :

- un étage de formation ayant pour ambition de former des élèves-ingénieurs avec un double profil ingénieur-entrepreneur

- un étage de pré-incubation technologique permettant d'accompagner de jeunes projets d'entreprise innovante sur le plan de la maturation technologique au sein d'un véritable écosystème entrepreneurial.

Dans le cadre de cette filière, des groupes d'élèves travaillent pendant deux ans sur un projet d'innovation technologique, une idée novatrice, apportée par des intervenants extérieurs, que les étudiants s'approprient avec l'aide de tuteurs scientifiques et pédagogiques. Ils font évoluer le projet scientifiquement et techniquement et étudient également en détail les aspects marchés, les considérations financières et la gestion de la propriété intellectuelle du projet dans le but d'aboutir à un produit commercialisable. La source à combinaison de diodes électroluminescentes a été proposée comme projet de la FIE et a été retenue par un groupe de quatre étudiants, qui travaillent aujourd'hui avec des partenaires industriels impliqués dans le domaine biomédical (citons entre autres le CEA et la compagnie LLTech).

III.2 Fluorescence d'un cristal de Ti-Saphir

La fluorescence de cristaux dopés a récemment été exploitée pour produire des sources de grande largeur spectrale pour l'OCT temporelle [91, 92]. A ce titre, les cristaux utilisés dans les lasers femtosecondes sont les plus propices du fait de leurs larges spectres d'émission de fluorescence qui assurent des durées d'impulsions courtes par le principe d'incertitude d'Heisenberg. Le cristal de Saphir dopé aux ions Titane Ti^{3+} ($Ti:Al_2O_3$) présente ainsi une émission de fluorescence très avantageuse pour l'OCT plein champ :

- son spectre d'émission est centré autour de 760 nm et d'environ 150 nm de largeur (cf. Figure III.18 [93, 94]), ce qui est parfaitement adapté à la réponse spectrale du Silicium.

- sa durée de vie de fluorescence est de l'ordre de 3 μs , adapté au fonctionnement impulsif, ce qui permettra des applications *in vivo* comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

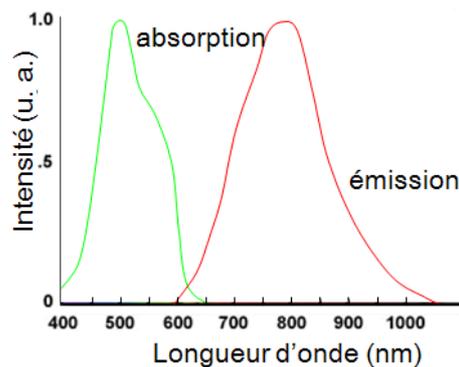


Figure III.18 : Spectre d'absorption et d'émission de fluorescence de la transition ${}^2T_2 \rightarrow {}^2E$ du cristal $Ti:Al_2O_3$.

III.2.1 Présentation du cristal de $Ti:Al_2O_3$

• Composition et structure cristalline

La formule chimique de la matrice de Saphir est Al_2O_3 , de structure hexagonale. Dans le cristal de Ti-Saphir, des ions Titane Ti^{3+} sont insérés comme dopant en se substituant à un

élément Aluminium. Le dopage du cristal correspond donc au pourcentage en masse d'ions Titane insérés dans la maille cristalline.

Le cristal de $\text{Ti}:\text{Al}_2\text{O}_3$ est biréfringent uniaxe : si l'on considère une propagation de la lumière parallèlement à l'axe optique, il existe deux axes neutres notés π (pour la polarisation parallèle à l'axe cristallin c) et σ (pour la polarisation parallèle à l'axe cristallin a) pour lesquels les propriétés optiques du cristal diffèrent.

• Données spectroscopiques

La structure électronique de l'ion Ti^{3+} est caractérisée par la présence d'un unique électron $3d$ sur la dernière couche électronique. Dans l'espace libre, les niveaux $3d$ accessibles par l'électron sont dégénérés (en négligeant bien entendu l'effet du spin) mais la dégénérescence est levée par le champ cristallin dans lequel l'ion est inséré. Dans le cas du cristal de Saphir, le champ cristallin sépare le niveau d'énergie de l'ion Ti^{3+} en deux niveaux dégénérés¹ : un niveau triplet 2T_2 , correspondant à l'état fondamental, et un niveau doublet 2E , correspondant à l'état excité.

Le spectre d'absorption de l'ion Ti^{3+} dans la matrice d' Al_2O_3 à 300K, correspondant à la transition ${}^2T_2 \rightarrow {}^2E$, est donné sur la Figure III.19 (gauche). Le spectre d'émission de fluorescence, présenté sur la Figure III.19 (droite), s'étend de 600 à 1000 nm avec un maximum d'émission à environ 750 nm. Notons que les sections efficaces d'absorption et d'émission sont supérieures pour la polarisation π .

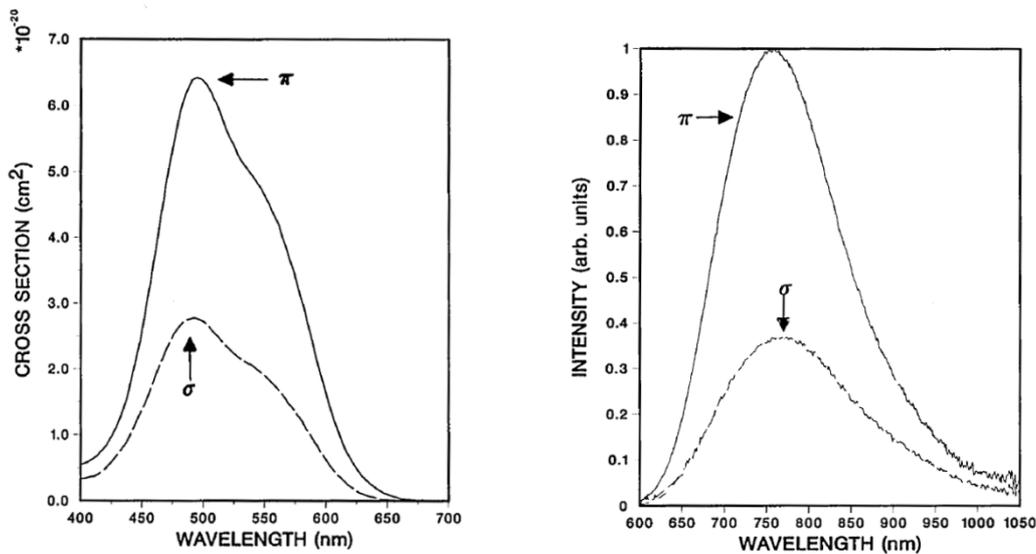


Figure III.19 : Spectre d'absorption (gauche) et d'émission de fluorescence (droite) du cristal de $\text{Ti}:\text{Al}_2\text{O}_3$ pour les polarisations σ et π [93, 94].

III.2.2 Principe général de la source

La fluorescence émise par un cristal de $\text{Ti}:\text{Al}_2\text{O}_3$ est donc un candidat idéal comme nouvelle source lumineuse pour un dispositif d'OCT plein champ à haute résolution.

Pour réaliser cette source, un laser solide Néodyme Vanadate ($\text{Nd}:\text{YVO}_4$) pompé par diode et doublé en fréquence par un cristal de LBO (Triborate de Lithium LiB_3O_5), émettant 6W en continu à 532 nm, permet de pomper le cristal de Ti-Saphir au maximum de sa section

¹ La dégénérescence de ces niveaux est levée par l'interaction spin-orbite.

efficace d'absorption (cf. Figure III.18). Les ions Ti^{3+} du cristal émettent alors de la fluorescence par un processus d'émission spontanée, fluorescence que nous allons chercher à collecter de façon optimale.

La fluorescence est émise de façon isotrope sur les 4π stéradians de l'espace. L'indice du cristal de Ti-Saphir étant bien plus élevé que celui de l'air ($n = 1,76$), une grande partie de la fluorescence est guidée au sein du cristal grâce au phénomène de réflexion totale interne, dans un cône de demi-angle au sommet α donné par l'angle de réflexion totale interne :

$$\alpha = \frac{\pi}{2} - \theta_c = \frac{\pi}{2} - \arcsin \frac{1}{n} = 55,4^\circ \quad (\text{III.1})$$

La fluorescence est donc guidée au sein du cristal et ne sortira que de chaque côté du cristal. Deux configurations sont alors possibles : une collection de la fluorescence co-propageant avec le faisceau de pompe ou une collection de la fluorescence contra-propageant (cf. Figure III.20).



Figure III.20 : Emission de fluorescence d'un cristal de Ti-Saphir avec guidage par réflexion totale interne.

III.2.3 Caractérisations optiques du cristal de Ti-Saphir

Pour tester la faisabilité de notre source de fluorescence, nous devons tout d'abord tester la qualité optique du cristal de Ti-Saphir, à savoir l'absorption à la longueur d'onde de pompe (532 nm) ainsi que la transmission et le guidage du signal de fluorescence (650 – 950 nm).

• Mesure de l'absorption à la longueur d'onde de pompe (532 nm)

Commençons par calculer l'absorption du faisceau de pompe en fonction des paramètres du faisceau de pompe et du cristal de Ti-Saphir. Si on suppose que le profil transverse de l'intensité du faisceau de pompe est gaussien, de la forme :

$$I_P(r, z) = I_P(z) \exp \left[-\frac{r^2}{w_P^2(z)} \right] \quad (\text{III.1})$$

$$\text{avec } w_P(z) = w_0 \sqrt{1 + \frac{\lambda_P}{\pi n w_0^2} (z - z_0)^2} \quad (\text{III.2})$$

où r est la direction transverse au cristal et z la direction axiale, $I_P(z)$ est l'intensité du faisceau de pompe le long de l'axe du cristal, w_0 est le diamètre (ou *waist*) du faisceau laser de pompe à la distance z_0 , n est l'indice du cristal de $Ti:Al_2O_3$, λ_P est la longueur d'onde du faisceau de pompe. L'équation différentielle de l'intensité de pompe le long du cristal en l'absence d'effet laser est donnée par :

$$\frac{dI_P}{dz} = -\frac{N\sigma_a(\lambda)}{1 + \tau\sigma_a(\lambda)I_P} I_P \quad (\text{III.3})$$

où N est la densité d'atomes inversables au sein du cristal, qui dépend du dopage d'ions Ti^{3+} au sein du cristal, τ est le temps de vie de l'état excité de la transition ${}^2T_2 \rightarrow {}^2E$ du cristal $Ti:Al_2O_3$ ($\tau = 3.15 \mu s$) et σ_a est la section efficace d'absorption de la transition, qui dépend de la longueur d'onde et de la polarisation du faisceau de pompe.

On peut donc calculer l'absorption du faisceau de pompe en fonction des paramètres expérimentaux (forme, longueur d'onde et puissance du faisceau de pompe à l'entrée du cristal, dopage et taille du cristal) afin de les optimiser pour garantir une absorption maximale de la pompe et donc une émission de la fluorescence maximale. Les paramètres choisis pour le faisceau de pompe et le cristal après simulations numériques sont regroupés dans le Tableau III.4.

Longueur d'onde de pompe	532 nm
Puissance de pompe	6W
Waist du faisceau de pompe	600 μm
Section transverse du cristal	1,24x1,24 mm ²
Longueur du cristal	10 mm
Dopage du cristal	3,3x10 ¹⁹ cm ⁻³
Section efficace d'absorption à 532 nm pour la polarisation π	5,1x10 ⁻²⁰ cm ²
Section efficace d'absorption à 532 nm pour la polarisation σ	2,2x10 ⁻²⁰ cm ²
Indice du cristal	1,76

Tableau III.4 : Paramètres utilisés pour les simulations d'absorption du faisceau de pompe par le cristal de Ti-Saphir.

Nous avons mesuré l'absorption du faisceau de pompe à 532 nm pour différentes puissance de pompe et cela pour les deux polarisations incidentes π et σ (réglées à l'aide d'une lame demi-onde) puisque le cristal de Ti-Saphir est uniaxe et présente donc des absorptions différentes selon ses différents axes cristallins. Pour cette expérience, la taille du faisceau de pompe a été adaptée aux dimensions du cristal de Ti-Saphir à l'aide d'un montage afocal, conduisant à un faisceau de pompe d'environ 600 μm de diamètre. Les résultats expérimentaux sont en bon accord avec les prédictions des simulations (cf. Figure III.21).

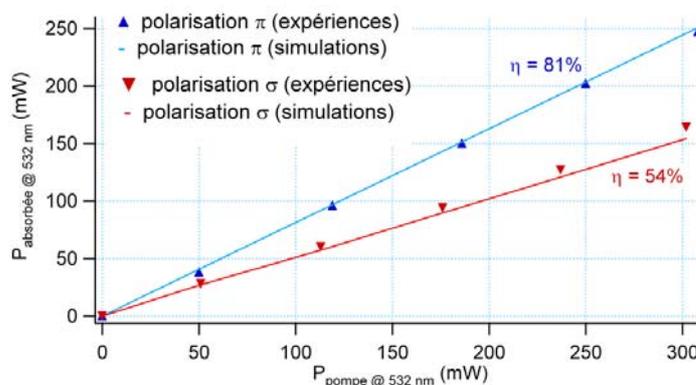


Figure III.21 : Efficacité d'absorption du faisceau de pompe pour les deux polarisations incidentes et comparaison aux simulations numériques.

Une configuration simple passage de la pompe est donc suffisante pour absorber plus de 80% de la pompe dans le cas de la polarisation π , qui présente la section efficace d'absorption la plus élevée.

• Mesure de la transmission à la longueur d'onde moyenne de fluorescence (750 nm)

Le but de cette mesure est de quantifier la capacité du cristal de Ti-Saphir à transmettre le signal de fluorescence émis. Le schéma de l'expérience est présenté en Figure III.22. Le faisceau d'une source laser à 750 nm est focalisé à l'aide d'une lentille au sein du cristal. La distance focale de la lentille est choisie de façon à obtenir un waist de 600 μm dans la fibre. De cette façon, la longueur de Rayleigh est bien plus grande que la longueur du cristal ($z_R \sim 1,5 \text{ m}$) et on s'assure ainsi de mesurer la transmission sans guidage. On mesure la puissance avec et sans la fibre pour connaître sa transmission. La taille du faisceau sonde est vérifiée en différents points de la propagation grâce à une caméra CCD. Le cristal est placé dans une monture possédant les réglages selon les trois axes de translations et les trois axes de rotations afin d'optimiser son positionnement. Le détecteur est enfin placé suffisamment loin pour que la lumière éventuellement diffusée par la fibre ne fausse pas la mesure. Les pertes par transmission, mesurées pour trois cristaux différents, sont inférieures à 5 % en moyenne et peuvent s'expliquer par la qualité cristalline des échantillons.

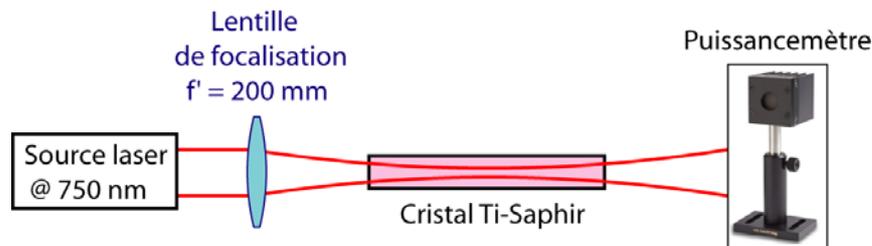


Figure III.22 : Schéma du dispositif expérimental pour la mesure de la transmission du cristal de Ti-Saphir à la longueur d'onde moyenne de fluorescence.

• Mesure du guidage à la longueur d'onde moyenne de fluorescence (750 nm)

Le but de cette mesure est de quantifier la capacité du cristal de Ti-Saphir à guider par réflexions totales internes le signal de fluorescence. Le schéma de l'expérience est présenté sur la Figure III.23. Le faisceau d'une source laser à 750 nm est cette fois-ci fortement focalisé à l'aide d'un objectif de microscope de très courte focale. La distance focale a été choisie de façon à obtenir un waist d'environ 10 μm dans la fibre. De cette façon, la longueur de Rayleigh est bien plus courte que la longueur du cristal ($z_R \sim 0,4 \text{ mm}$) et on s'assure ainsi de mesurer les pertes par guidage.

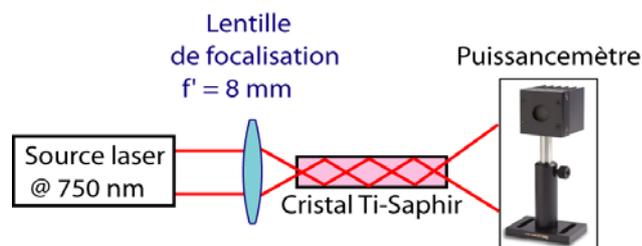


Figure III.23 : Schéma du dispositif expérimental pour la mesure des pertes par guidage du cristal de Ti-Saphir à la longueur d'onde moyenne de fluorescence.

On mesure la puissance avec et sans la fibre pour connaître les pertes par guidage dans les mêmes conditions que précédemment. Les pertes par guidage, présentés sur la Figure III.24, sont de l'ordre de 12% mais dépendent fortement du nombre de réflexions totales internes et donc de la focalisation du faisceau laser. Ces pertes par guidage peuvent s'expliquer par les défauts de surface et les variations de diamètre du cristal dû à un polissage difficile, le Saphir ayant une dureté importante.

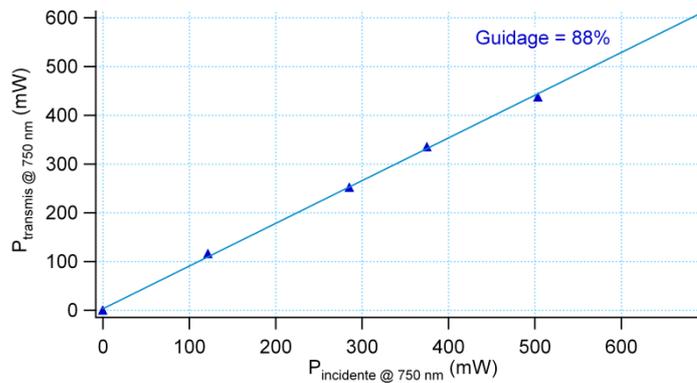


Figure III.24 : Efficacité de guidage du cristal de Ti-Saphir.

III.2.4 Performances de la source lumineuse

Nous décrivons dans ce paragraphe la mise en place expérimentale de la source ainsi que les performances obtenues pour différentes configurations.

• Mise en place expérimentale des deux configurations possibles

Nous avons vu précédemment qu'une grande partie de la fluorescence était guidée au sein du cristal par réflexion totale interne et ne sortait donc que par les extrémités du cristal, conduisant à deux configurations possibles de collection. Nous avons mis en place expérimentalement et testé ces deux configurations (cf. Figure III.25).

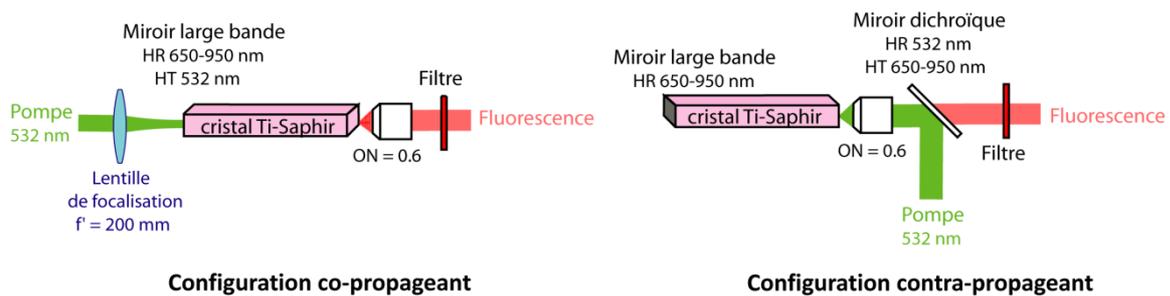


Figure III.25 : Les deux configurations testées pour la mise en place expérimentale de la source de fluorescence (HR : haute réflectivité ; HT : haute transmission).

- La *configuration co-propageant* : dans cette configuration, le faisceau de pompe est focalisé sans guidage à l'intérieur du cristal à l'aide d'un doublet de focale 200 mm et la fluorescence est collectée à la face de sortie du cristal à l'aide d'un objectif de collimation (focale 15 mm, diamètre utile 18 mm, ouverture numérique 0,6 et frontale 4,1 mm).

- La *configuration contra-propageant* : dans cette configuration, la fluorescence est collectée au niveau de la face d'entrée du cristal et un miroir large bande entre 650 et

950 nm est accolé sur la face arrière du cristal pour réfléchir la fluorescence émise dans la direction co-propageante. On utilise alors le même objectif pour collecter la fluorescence et focaliser le faisceau de pompe (focale 15 mm, diamètre utile 18 mm, ouverture numérique 0,6 et frontale 4,1 mm) et un miroir dichroïque permet de séparer le faisceau de pompe entrant dans le cristal de la fluorescence à collecter. Le miroir dichroïque possède une haute réflectivité (HR) à la longueur d'onde de pompe ($R > 99\%$) et une haute transmission (HT) sur le spectre de fluorescence 650-950 nm ($T > 95\%$).

Pour les deux configurations, un filtre coloré FGL 665 passe haut à 665 nm est placé par auto-collimation sur le faisceau de fluorescence pour filtrer la totalité de la pompe résiduelle non absorbée par le cristal, avec une transmission supérieure à 90% sur toute la largeur spectrale de la fluorescence (cf. Figure III.26).

Pour faciliter les réglages, le cristal est monté sur une mécanique possédant les réglages selon les trois axes de translation et les trois axes de rotation. L'objectif de collection est quant à lui inséré dans une monture possédant les trois axes de translation pour ajuster finement sa position par rapport au cristal ainsi que la collimation souhaitée.

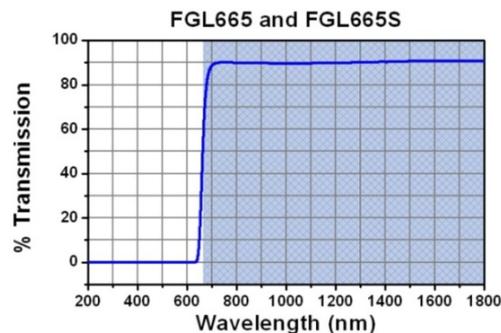


Figure III.26 : Courbe de transmission du filtre FGL665 (données Thorlabs).

• Efficacité de fluorescence

Le réglage de la source dans les deux configurations est assez délicat. On ajuste tout d'abord la position et l'orientation du cristal en l'absence des optiques de focalisation et/ou de collection sur le faisceau de pompe par optimisation de la forme du faisceau de pompe non absorbé et transmis à travers le cristal. Ce faisceau doit être le plus symétrique possible. On ajoute ensuite chaque élément de la focalisation et de la collection par auto-collimation afin de conserver le réglage précédent. La position axiale de ces optiques est optimisée par maximisation de la puissance de fluorescence générée et collectée.

La courbe d'efficacité de la fluorescence collectée dans les deux configurations en fonction de la puissance de pompe incidente sur le cristal est présentée sur la Figure III.27. Ces résultats expérimentaux montrent que la configuration contra-propageant est plus efficace en termes de puissance de fluorescence collectée. Théoriquement, cela peut se comprendre par le raisonnement suivant. D'après l'Equation (III.4), l'intensité de pompe peut être considérée, en première approximation, comme exponentiellement décroissante avec la longueur du cristal. La majorité de la puissance de pompe est donc absorbée au début du cristal, conduisant à une fluorescence fortement localisée sur les premiers millimètres du cristal. Cette fluorescence, équi-émise selon les deux directions du cristal, subira plus de réflexions dans la direction co-propageante que dans la direction contra-propageante. Considérant les pertes par guidage, il est donc plus judicieux de collecter la fluorescence en configuration contra-propageant qu'en configuration co-propageant.

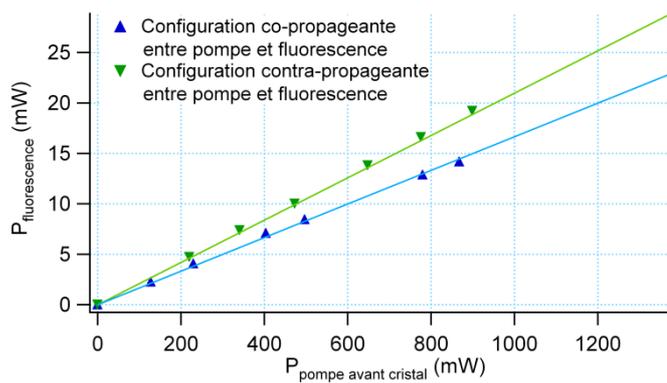


Figure III.27 : Courbes d'efficacité de collection de la fluorescence dans les deux configurations.

Cependant, pour ne pas perdre la totalité de la fluorescence émise dans la direction co-propageante, un miroir plan HR large bande sur la gamme spectrale de la fluorescence (650-950 nm) a été ajouté en sortie du cristal comme illustré sur la Figure III.25. Ce miroir est placé au plus près du cristal, par auto-collimation, de façon à renvoyer la fluorescence à l'intérieur du cristal et à la guider par réflexion totale interne jusqu'à la face d'entrée où elle sera collectée par l'objectif. Les mesures de puissance de fluorescence collectée en configuration contra-propageant ont été effectuées avec et sans ce miroir de recyclage et sont présentées sur la Figure III.28. L'ajout du miroir permet un gain de 60% en efficacité.

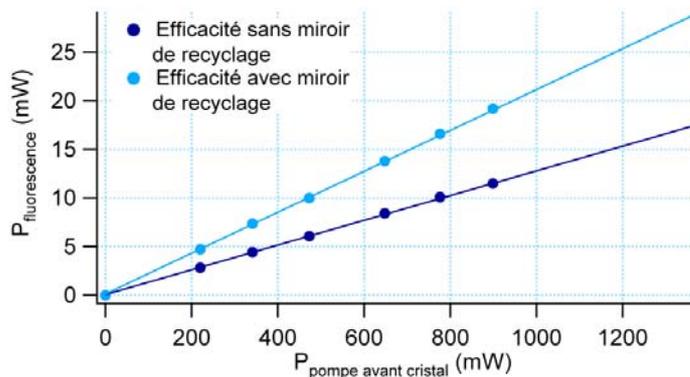


Figure III.28 : Courbes d'efficacité de fluorescence dans la configuration contra-propageant avec et sans miroir de recyclage.

• Effets thermiques

Après cette optimisation de la configuration de la source, une montée en puissance du faisceau de pompe a été réalisée. Les résultats des mesures d'efficacité à ces puissances de pompe sont présentés sur la Figure III.29. Expérimentalement, nous avons observé une saturation de la puissance pour des puissances de pompe élevées (environ 3W incident sur la face d'entrée du cristal). Cette saturation de l'émission de fluorescence peut s'expliquer par des effets thermiques importants au sein du cristal qui réduisent les sections efficaces d'absorption et d'émission et donc le rendement de fluorescence. Pour éviter cet effet, nous avons inséré le cristal de Ti-Saphir dans une monture en cuivre refroidie par une circulation d'eau à 18°C. Grâce à la très bonne conductivité thermique du cristal de Ti:Al₂O₃

($\kappa = 35 \text{ W.m}^{-1}\text{.K}^{-1}$) ce refroidissement suffit à faire disparaître complètement les effets de saturation et une puissance de $\sim 72 \text{ mW}$ est atteinte au maximum de la puissance de pompe.

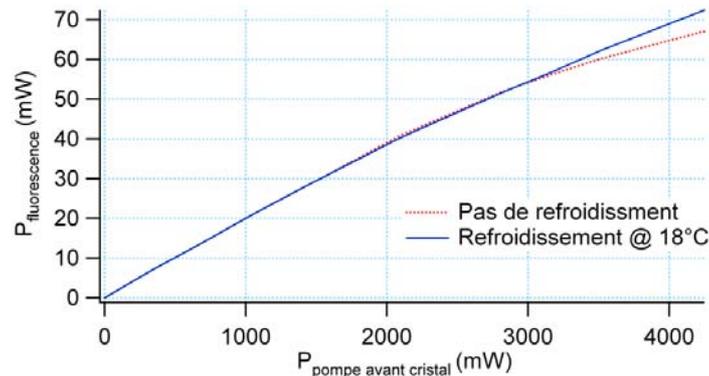


Figure III.29 : Courbes d'efficacité de la fluorescence collectée dans la configuration contra-propageant avec et sans refroidissement du cristal de Ti-Saphir.

III.2.5 Performances comme source pour l'OCT plein champ

• Dispositif expérimental

Pour caractériser les performances de notre source de fluorescence pour l'imagerie tomographique, nous l'avons utilisée pour illuminer notre dispositif d'OCT plein champ (cf. Figure III.30). La caméra utilisée ici est la caméra Silicium (modèle CA-D1 de Dalsa, 256×256 pixels, 8 bits, 200 Hz, capacité de charge des pixels de 120 000 électrons) puisqu'elle possède la sensibilité spectrale la plus adaptée au spectre de fluorescence du cristal de Ti-Saphir.

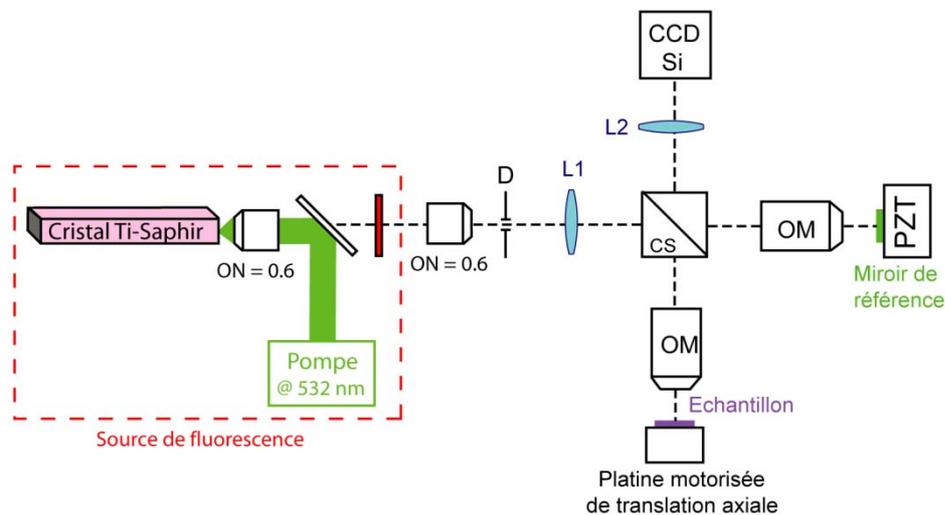


Figure III.30 : Dispositif expérimental pour la tomographie par cohérence optique plein champ avec illumination par source de fluorescence. CS : cube séparateur, OM : objectif de microscope, PZT : transducteur piézoélectrique, L1 et L2 doublets achromatiques.

La fluorescence émise par le cristal de Ti-Saphir et collectée par l'objectif de microscope est très divergente et présente une structure spatiale typique d'un guide carré. Afin d'obtenir un éclairage homogène au niveau du plan de focalisation des objectifs de microscope et de taille adaptée, une collimation et un filtrage spatial du faisceau de fluorescence sont réalisés à l'aide d'un second objectif de microscope, similaire au premier et placé tête bêche, d'un

diaphragme de champ pour le filtrage spatial, placé au plan focal image du second objectif de microscope, et d'une lentille de collimation de focale $f = 80$ mm. Ce filtrage s'accompagne cependant d'une perte de puissance de 17% soit 60 mW.

• Résolution spatiale

Comme nous l'avons vu précédemment, la *résolution axiale* du dispositif d'imagerie est imposée par la longueur d'onde centrale et la largeur du spectre effectif. Les composants optiques utilisés étant large bande dans l'infrarouge, on peut considérer avec une bonne approximation que le spectre effectif est uniquement le produit du spectre de fluorescence de la source par la réponse spectrale de la caméra Silicum.

La Figure III.31 (gauche) représente le spectre de fluorescence enregistré à l'aide d'un spectromètre infrarouge (modèle HR4000 d'Ocean Optics, résolution $\Delta\lambda = 0,2$ nm). Ce spectre, centré autour de 750 nm et de largeur 180 nm, est en très bon accord avec le spectre de fluorescence mesuré par Moulton en 1986 [93]. Le spectre effectif, calculé par produit du spectre de fluorescence expérimental et du spectre constructeur de la caméra, est quant à lui centré autour de 755 nm et de largeur spectrale 135 nm (cf. Figure III.31), ce qui conduit à une résolution axiale théorique de $1,4$ μm dans l'eau d'après l'équation (II.11).

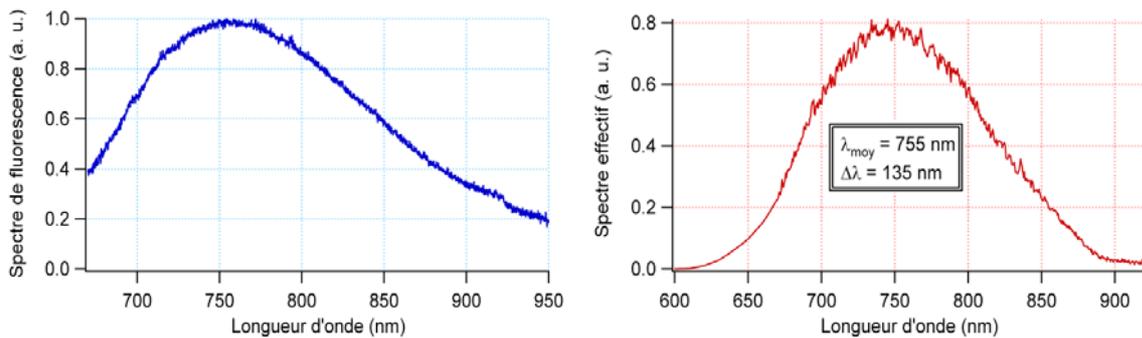


Figure III.31 : Spectre de fluorescence émis par le cristal de Ti-Saphir (gauche) et spectre effectif du dispositif d'OCT plein champ avec caméra Si (droite).

Expérimentalement, la résolution axiale est définie par la largeur à mi-hauteur de l'enveloppe de l'interférogramme. L'interférogramme expérimental obtenu dans l'eau, présenté sur la Figure III.32, conduit à une résolution axiale expérimentale de $1,4$ μm , ce qui est en très bon accord avec la valeur théorique calculée précédemment.

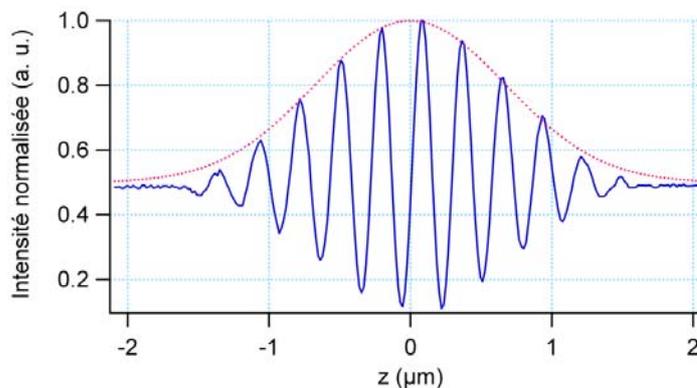


Figure III.32 : Interférogramme du dispositif d'OCT plein champ éclairé par la source de fluorescence Ti-Saphir, réalisé avec un miroir métallique dans chaque bras et dans l'eau.

La *résolution transverse* est quant à elle liée à la longueur d'onde centrale d'illumination, à l'ouverture numérique des objectifs de microscope et à l'éventuel échantillonnage de la caméra. Elle vaut donc toujours 1,6 μm .

• Sensibilité de détection

Comme nous l'avons dit précédemment, la sensibilité de détection d'un dispositif d'OCT plein champ dépend du contraste des interférences, et donc de la cohérence spatiale de la source d'illumination. On optimise au mieux la cohérence spatiale de la source de fluorescence à l'aide du filtrage spatial. En pratique, cela revient à réduire au maximum la taille du diaphragme jusqu'à être à la limite de saturation sur la caméra en conditions expérimentales (échantillons biologiques dans l'eau pour le bras et cristal de YAG dans l'eau pour le bras de référence). Dans ces conditions, nous avons comparé la sensibilité de détection expérimentale du dispositif d'OCT plein champ éclairé par la source de fluorescence et la lampe halogène avec diaphragme d'ouverture fermé au maximum (ce qui permet également d'être à la limite de saturation sur la caméra dans les mêmes conditions expérimentales). Les résultats expérimentaux sont présentés sur la Figure III.33.

Des sensibilités de détection de 80 dB, correspondant à un coefficient de réflexion minimal détectable inférieur à 10^{-8} , sont facilement accessibles avec les deux sources d'illumination. La dégradation observée entre les deux sources est due à la dégradation du contraste des interférences avec la source de fluorescence du fait de la plus faible cohérence spatiale de la source, même en réalisant le filtrage spatial.

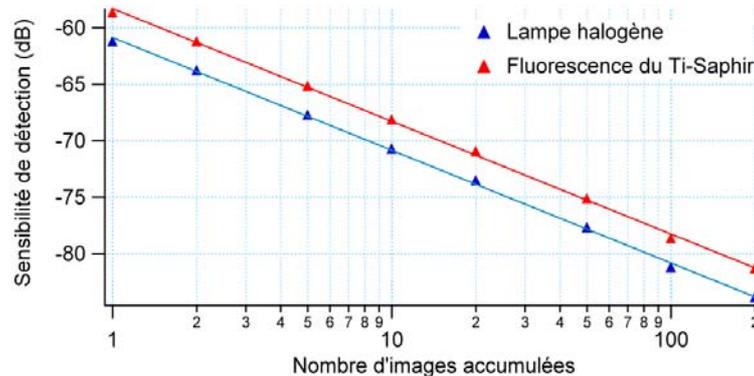


Figure III.33 : Sensibilité de détection du dispositif avec illumination par la lampe halogène et illumination par la fluorescence du Ti-Saphir. Les points correspondent aux mesures expérimentales et les courbes à l'ajustement par l'équation (II.14).

• Comparaison des performances d'imagerie lampe halogène/source de fluorescence

Comme précédemment, pour démontrer les performances de la fluorescence d'un cristal de Ti-Saphir comme source d'illumination pour l'OCT plein champ, une larve *Xenopus Laevis* a été imagée, successivement avec la lampe halogène et la source de fluorescence, en ajustant le nombre d'accumulations afin d'avoir la même sensibilité de détection avec les deux sources. Les coupes tomographiques (XZ) ainsi obtenues au niveau de la tête de l'échantillon, extraites d'une pile de $250 \times 250 \times 500 \mu\text{m}^3$ sont présentées sur la Figure III.34 en échelle logarithmique, le noir correspondant au signal le plus élevé (~ 60 dB) tandis que le blanc correspond au signal le plus faible (~ 85 dB). Les performances d'imagerie des deux sources d'illumination sont en conclusion assez comparables.

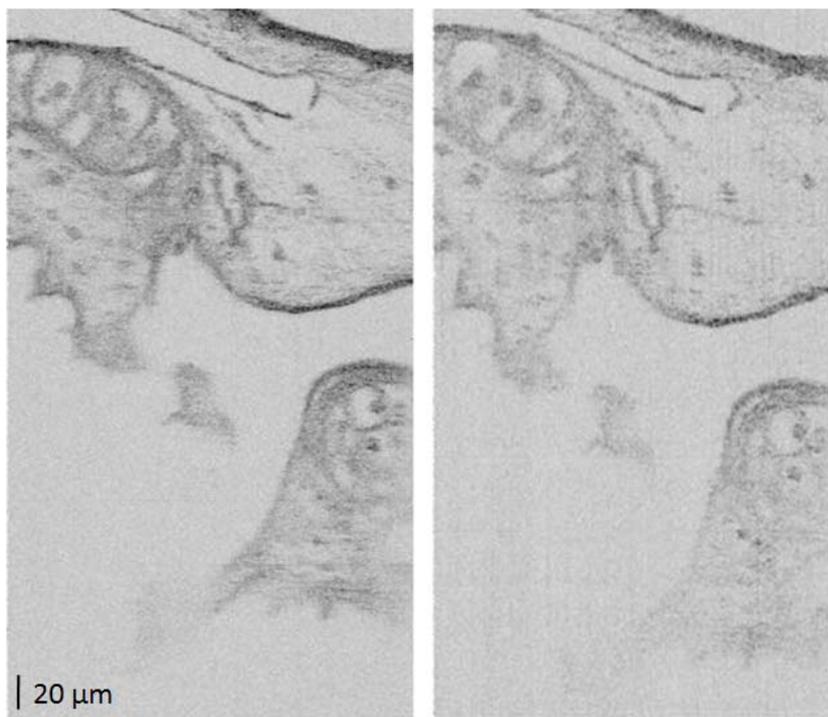


Figure III.34 : Coupes tomographiques (XZ) d'un échantillon *Xenopus Laevis* ex vivo, correspondant à une zone de $250 \times 500 \mu\text{m}^2$, éclairé successivement par une lampe halogène (gauche) et la source de fluorescence Ti-Saphir (droite).

III.2.6 Application à l'imagerie *in vivo* : vers le régime impulsionnel

La réduction du temps d'illumination est un paramètre crucial en OCT. En effet, un temps d'illumination très court, de l'ordre de la milliseconde, permet de figer le mouvement de l'échantillon et donc de s'orienter vers l'observation de spécimens vivants, comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

Pour les lampes thermiques classiques, telles que les ampoules halogènes, le fonctionnement en impulsionnel ne peut être réalisé au niveau de l'alimentation du fait de la grande inertie des phénomènes physiques mis en jeu. Il faut donc couper périodiquement le faisceau d'illumination, par exemple à l'aide d'une roue dentée tournante (ou *chopper optique*). Ce procédé est cependant très coûteux en puissance utile et mécaniquement limité en termes de durée d'impulsions et de taux de répétition. L'utilisation de lampe flash, telle que les ampoules au xénon, est possible malgré leur faible efficacité en termes de rendement de conversion électrique – optique et leur faible durée de vie (typiquement quelques milliers de flashes).

Les matériaux laser peuvent quant à eux produire des impulsions de fluorescence s'ils sont pompés par un faisceau laser impulsionnel. La durée minimale des impulsions de fluorescence est imposée par le temps de vie de fluorescence de l'état excité impliqué dans la transition. En utilisant des lasers de pompe en fonctionnement déclenché, ce passage au régime impulsionnel peut se réaliser à énergie constante¹ donc sans perte pour la qualité d'imagerie. Dans le cas du cristal de Ti :Al₂O₃ le temps de vie de fluorescence de l'état ²E est de 3,15 μs [93], ce qui est largement suffisant pour la plupart des applications biologiques.

¹ Ceci suppose évidemment qu'il n'y a pas saturation de l'absorption et que le laser de pompe est idéal

Les premiers tests en régime impulsionnel ont été réalisés à l'aide d'un *chopper optique* placé sur le trajet du faisceau de pompe et délivrant des impulsions de 1,2 ms à la fréquence de répétition de 200 Hz (synchronisée sur le signal de la caméra). Le signal de fluorescence généré par ce signal de pompe a été enregistré à l'aide d'une photodiode rapide et est présenté sur la Figure III.35. Dans cette configuration, nous avons pu obtenir un régime impulsionnel avec des durées d'impulsion de l'ordre de la milliseconde, tout en ayant des puissances moyennes similaires à celle de la lampe halogène en régime continu.

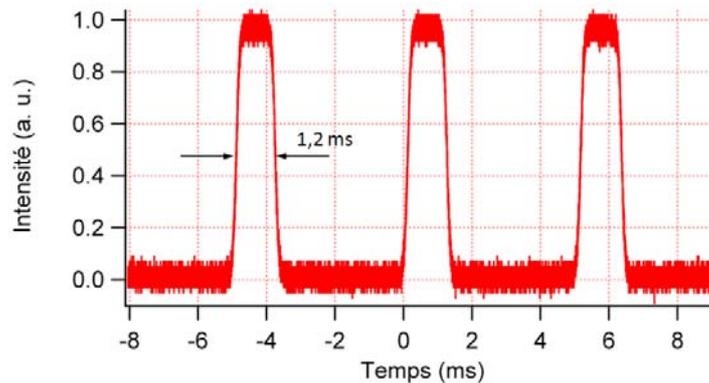


Figure III.35 : Signal temporel de fluorescence généré par le cristal de Ti-Saphir en régime impulsionnel.

III.2.7 Perspectives : fluorescence d'un cristal de Cr:LiSAF

L'utilisation du cristal de $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ présente des limitations en termes de rendement électrique-optique et de compacité du fait de l'utilisation d'un laser solide pompé par diode et doublé en fréquence comme laser de pompe. Cependant, la section efficace d'absorption de la transition ${}^2T_2 \rightarrow {}^2E$ présente son maximum d'absorption dans le vert, gamme spectrale pour laquelle les diodes laser ne sont pas assez performantes pour être utilisées. Une amélioration de notre source de fluorescence serait d'utiliser un autre cristal dopé, présentant des avantages similaires au Ti-Saphir (principalement le spectre de fluorescence et le temps de vie de fluorescence) mais avec un maximum d'absorption dans le rouge : le cristal de Cr:LiSAF.

Nous réalisons dans ce paragraphe une présentation spectroscopique du cristal de Cr:LiSAF dans la perspective d'une utilisation future comme source de fluorescence pour l'OCT plein champ.

• Composition et structure cristalline

La formule chimique de la matrice de LiSAF est LiSrAlF_6 , de structure cubique, les éléments Li, Sr et Al étant insérés dans des sites octaédriques. Dans le cristal de LiSAF, des ions Chrome Cr^{3+} sont insérés comme dopant en se substituant à un élément Aluminium. Le dopage du cristal correspond donc au pourcentage en masse d'ions Chrome insérés dans la maille cristalline.

Le cristal de Cr:LiSAF est biréfringent uniaxe : si l'on considère une propagation de la lumière parallèlement à l'axe optique, il existe deux axes neutres notés π (pour la polarisation parallèle à l'axe cristallin c) et σ (pour la polarisation parallèle à l'axe cristallin a) pour lesquels les propriétés optiques du cristal diffèrent.

• Données spectroscopiques

La structure électronique de l'ion Cr^{3+} est caractérisée par la présence de trois électrons 3d sur la dernière couche électronique. Dans l'espace libre, les niveaux 3d accessibles par l'électron sont dégénérés (en négligeant bien entendu l'effet du spin) mais la dégénérescence est levée par le champ cristallin dans lequel l'ion est inséré. Dans le cas du cristal de LiSAF, les niveaux mis en jeu pour les mécanismes d'absorption et d'émission sont le niveau fondamental 4A_2 et les niveaux excités 4T_2 , ${}^4T_{1a}$ et ${}^4T_{1b}$ (cf. Figure III.36).

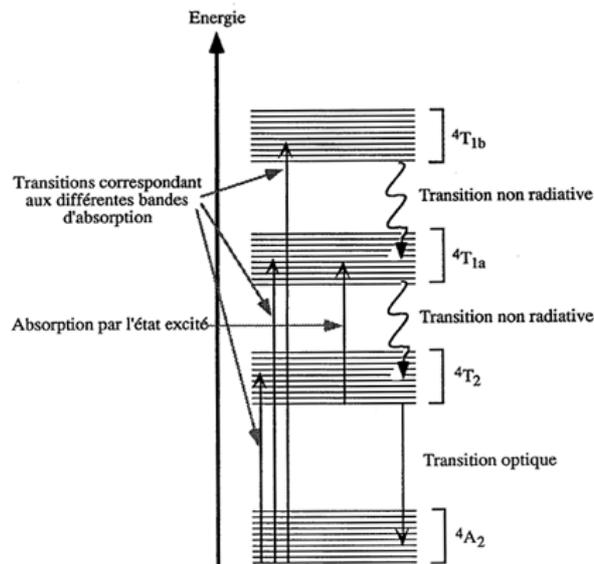


Figure III.36 : Niveaux d'énergie de l'ion Cr^{3+} dans la matrice de LiSAF.

Le spectre d'absorption de l'ion Cr^{3+} dans la matrice de LiSAF pour les deux polarisations est donné sur la Figure III.37 (gauche). Il possède trois bandes distinctes dans l'ultraviolet, le bleu et le rouge correspondant aux transitions vers les trois niveaux excités¹.

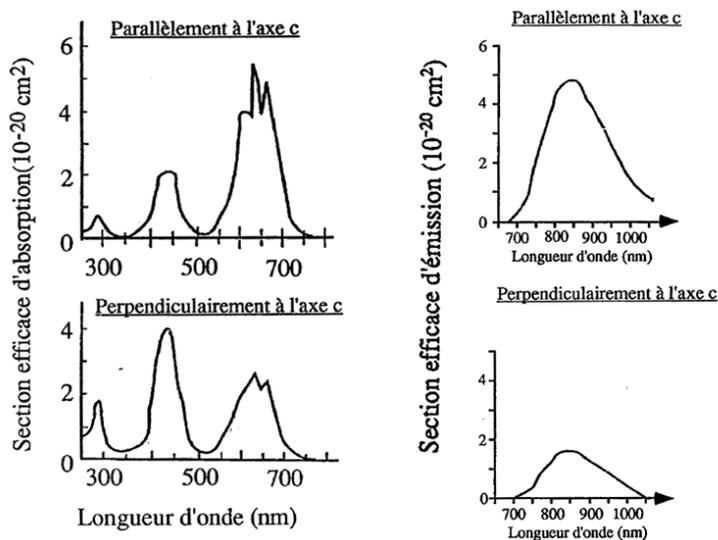


Figure III.37 : Spectre d'absorption (droite) et d'émission de fluorescence (gauche) du cristal de $\text{Cr}:\text{LiSAF}$ pour les polarisations σ (bas) et π (haut).

¹ Le cristal de $\text{Cr}:\text{LiSAF}$ est transparent dans le vert d'où sa couleur vert émeraude.

Notons que les spectres d'absorption obtenus pour les deux polarisations sont très différents. Pour la transition rouge, qui est celle qui va nous intéresser dans la suite, il sera plus intéressant de pomper en polarisation π . Le spectre d'émission de fluorescence, présenté sur la Figure III.37 (droite), s'étend de 700 à 1000 nm avec un maximum d'émission à environ 850 nm, ce qui est très similaire au spectre d'émission du Ti-Saphir, ce qui permettra d'obtenir une résolution axiale équivalente sans changer de détecteur.

III.3 Bilan

Le Tableau III.5 est un bilan comparatif des performances des différentes sources lumineuses utilisées pour l'OCT plein champ au cours de ces travaux.

	Luminance sur le spectre utile (W.m⁻².sr⁻¹)	Résolution axiale dans l'eau (μm)	Sensibilité de détection pour 200 accumulations (dB)	Régime impulsif
Lampe Halogène	16 × 10 ³	0,8	84	Délicat
Combinaison LED	57 × 10 ³	2,2	84	Possible (τ ≥ 100 μs)
Fluorescence du Ti : Saphir	37 × 10 ³	1,4	81	Possible (τ ≥ 5μs)

Tableau III.5 : Tableaux comparatifs des performances des différentes sources lumineuses utilisées pour l'OCT plein champ.

On constate une amélioration significative de la luminance utile (*i.e.* sur la gamme spectrale pour laquelle la caméra est sensible) pour les deux sources lumineuses développées, d'un facteur 2 à 3 fois. La dégradation de la résolution axiale des nouvelles sources lumineuses n'excède pas un facteur 2-3, ce qui est parfaitement acceptable pour les applications souhaitées. Le faible écart en sensibilité de détection est lié au contraste des interférences obtenues avec chaque source, lui-même lié à la cohérence spatiale de la source.

Enfin, chacune des sources développées permet une application nouvelle par rapport à une lampe halogène classique : l'application spectroscopique comme nous l'avons démontré pour la combinaison de diodes électroluminescentes ou le fonctionnement en régime impulsif, qui peut permettre des applications *in vivo* comme nous allons le proposer dans le chapitre suivant.

IV. Amélioration de la vitesse d'acquisition – Etude et suppression des artefacts de mouvement en tomographie par cohérence optique plein champ

Dans les chapitres précédents, nous avons démontré l'intérêt de l'OCT plein champ conventionnelle, à décalage de phase *temporel* (les deux images en opposition de phase sont acquises *successivement* après déplacement du miroir de référence) et sources d'illumination continues (halogène, LED, fluorescence), pour l'imagerie *ex vivo* à haute résolution.

Cependant, d'importants artefacts liés au mouvement de l'échantillon apparaissent dans ce type de dispositif, dégradant considérablement les performances pour l'imagerie *in vivo* en comparaison des autres techniques d'OCT. Ainsi, en OCT conventionnelle (TD-OCT), le temps nécessaire pour acquérir le signal interférométrique en chaque point peut être extrêmement court, de 1 à 10 μs [66, 95]. Cependant, dans le cas de systèmes TD-OCT possédant une haute résolution axiale, il est nécessaire d'augmenter le temps d'acquisition pour atteindre des sensibilités de détection suffisantes, puisque résolution axiale et sensibilité de détection sont inversement proportionnelles [96]. De plus, de par la nécessité du balayage transverse, il existe un délai entre l'acquisition de deux points distants dans l'échantillon, délai qui peut engendrer une déformation de l'image dans le cas de l'imagerie *in vivo*. Dans la technique d'OCT dans le domaine de Fourier (FD-OCT), la suppression du balayage axial réduit le temps d'acquisition de l'image d'un facteur 50-100 [38]. Grâce à cette réduction très importante du temps d'acquisition, les artefacts liés au mouvement sont imperceptibles dans la plupart des applications, faisant du FD-OCT la technique de choix pour l'imagerie *in vivo* [39].

L'OCT plein champ conventionnelle est au contraire une technique peu adaptée à l'imagerie du vivant. En effet, deux problèmes majeurs se posent. Premièrement, le mouvement de l'objet au cours de l'acquisition de chaque image interférométrique peut générer une variation de la phase du signal interférométrique, conduisant à une diminution du contraste de l'image tomographique finale. Ainsi, un mouvement de l'échantillon de l'ordre de la longueur d'onde entre l'acquisition de deux images en opposition de phase brouillerait totalement le signal d'interférences, rendant impossible l'extraction du signal. Ce problème peut être atténué en réduisant le *temps d'intégration du détecteur*, en utilisant par exemple des caméras CMOS (acronyme anglais de *Complementary metal oxide semi-conductor*), généralement plus rapides que les caméras CCD [57, 97], ou le *temps d'illumination par la source lumineuse*, si celle-ci possède une réserve de puissance suffisante pour continuer à utiliser le détecteur proche de saturation en régime impulsionnel [98]. Le second problème provient de l'acquisition séquentielle des différentes images interférométriques nécessaires à la combinaison. En effet, si l'échantillon bouge entre l'acquisition des images interférométriques, l'intensité reçue par les pixels du détecteur varie entre ces images, générant un signal parasite lors du calcul de l'image tomographique. Afin de résoudre ce problème, un certain nombre de méthodes à décalage de phase instantané, c'est-à-dire pour

lesquelles les différentes images interférométriques nécessaires à la combinaison sont acquises simultanément, ont été proposées. Toutes ces techniques nécessitent l'utilisation de lumière polarisée pour produire au moins deux images décalées en phase, qui sont acquises simultanément par une ou plusieurs caméras [98, 99]. Ceci rend délicat l'imagerie d'échantillons biréfringents, tels que la cornée qui présente une biréfringence dont l'amplitude est très variable selon le patient. De plus, ces méthodes nécessitent l'utilisation de lames de phase (lames quart d'onde et demi-onde) sur de larges gammes spectrales, optiques dont les performances sont limitées.

Dans ce chapitre, nous présenterons tout d'abord une étude théorique et expérimentale des artefacts de mouvement en OCT plein champ conventionnelle. Dans le but de supprimer ces artefacts, nous proposerons un nouveau dispositif d'OCT plein champ, insensible à la polarisation, dont nous présenterons le principe de fonctionnement, la mise en place expérimentale ainsi que les performances en termes d'imagerie et de réduction des artefacts, et enfin les images obtenues sur un échantillon *in vivo*.

IV.1 Artefacts de mouvement en OCT plein champ

Etudier et réduire les artefacts de mouvement dans les dispositifs d'imagerie biomédicale a reçu beaucoup d'attention au cours des 40 dernières années puisque ces artefacts peuvent dégrader considérablement la qualité des images, voire même fausser leur interprétation clinique [100-102].

Les performances de l'OCT plein champ en tant que dispositif d'imagerie 3D de haute résolution ont été largement étudiées et démontrées dans le cas d'échantillons *ex vivo*. Mais les dispositifs d'OCT plein champ conventionnels ne sont pas adaptés dans le cas d'échantillons *in vivo* à cause des artefacts induits par les mouvements de l'échantillon, qui dégradent la qualité des images. Très peu d'études ont été réalisées sur la cause et les limitations de ces artefacts et peu de solutions ont été proposées en OCT plein champ pour surmonter ces limitations [98, 99, 103]. Dans ce paragraphe, nous proposons une étude théorique et expérimentale complète des artefacts dus au mouvement dans un dispositif d'OCT plein champ conventionnelle. Nous distinguerons l'effet d'un mouvement axial de l'échantillon (le long de l'axe optique des objectifs de microscope) d'un mouvement transverse (perpendiculaire à l'axe optique des objectifs de microscope), comme schématisé sur la Figure IV.1.

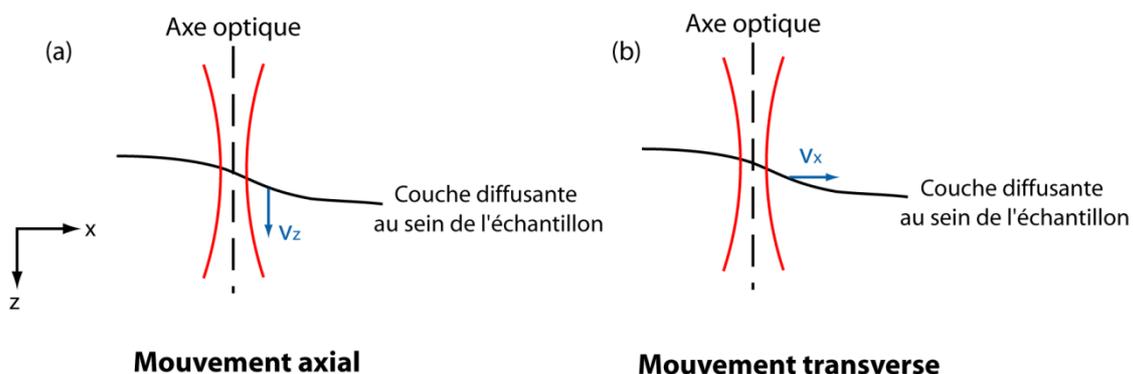


Figure IV.1 : Distinction des mouvements axial et transverse au sein d'un échantillon.

L'étude expérimentale a été réalisée grâce au dispositif d'OCT plein champ conventionnelle présenté dans les chapitres précédents, utilisant un décalage de phase sinusoïdal (par oscillation du miroir de référence au moyen d'un transducteur piézoélectrique) acquérant deux images en opposition de phase et possédant une résolution spatiale de $1.4 \mu\text{m} \times 1.6 \mu\text{m}$ (axial \times transverse). La caméra utilisée pour ces expériences est la caméra Silicium, possédant un temps d'intégration de 5 ms, une taille de pixels de $16 \mu\text{m}$ et une capacité de charge des pixels de $1,2 \times 10^5$ électrons.

IV.1.1 Signal parasite en présence d'un mouvement transverse

En OCT plein champ conventionnelle, l'image tomographique est calculée par combinaison de différentes images interférométriques, acquises séquentiellement dans le temps. Le signal tomographique est généré par la variation d'intensité du signal interférométrique entre les différentes acquisitions, variation induite par le décalage de phase. Ainsi, dans la technique présentée dans les chapitres précédents, le transducteur piézoélectrique entraîne une oscillation sinusoïdale du miroir de référence, induisant ainsi une modulation sinusoïdale de la phase du signal interférométrique. L'acquisition est synchronisée sur l'oscillation du miroir afin d'acquérir au cours d'une oscillation du miroir de référence, deux images interférométriques en opposition de phase, permettant ainsi d'extraire le signal tomographique.

Cependant, l'intensité reçue par chaque pixel du détecteur peut également varier du fait du mouvement de l'échantillon. En effet la position des structures biologiques change entre chaque acquisition, ce qui modifie l'intensité moyenne reçue par chaque pixel sur le temps d'intégration du détecteur. Cette variation d'intensité génère un signal parasite lors du calcul de l'image tomographique, qui se superpose au signal tomographique utile. Ce signal parasite est essentiellement provoqué par un mouvement transverse des structures internes de l'échantillon, quelle soient situées à l'intérieur ou à l'extérieur du volume de cohérence. Un mouvement axial de ces structures a en effet beaucoup moins d'influence sur le signal parasite puisqu'il n'engendre qu'une légère défocalisation, défocalisation qui ne modifie que faiblement l'intensité de la lumière reçue au cours du temps par chaque pixel du détecteur.

Comme le signal parasite se superpose au signal tomographique, il entraîne généralement une interprétation erronée de l'image tomographique finale. Il dégrade également la résolution axiale du système, et plus particulièrement sa capacité à extraire une fine tranche d'information (le volume de cohérence) au sein de l'échantillon, puisque des structures mobiles en dehors du plan de cohérence vont apparaître sur l'image finale.

Pour illustrer ce phénomène, une mire de microscope, composée de bandes de chrome déposée sur un substrat de verre (contraste de $\sim 0,94$), a été montée sur un transducteur piézoélectrique afin de lui imposer un déplacement transverse de vitesse constante ajustable et de direction parallèle aux bandes de la mire (qui ont une largeur de $\sim 0,1$ mm dans la zone imagée). La valeur de la vitesse transverse est ajustable de 0 à 5 mm/s et choisie égale à 2 mm/s pour observer facilement le signal parasite. Des images interférométriques ont été acquises au cours de ce déplacement. La mire a été placée environ $10 \mu\text{m}$ au-delà du plan de cohérence, afin d'étudier le seul effet du signal parasite. L'image tomographique correspondante, obtenue avec le dispositif d'OCT plein champ conventionnelle présenté dans les chapitres précédents, est montrée sur la Figure IV.2 gauche. En principe, aucun signal ne devrait apparaître puisque les structures réfléchissantes sont situées en dehors du volume

de cohérence. Cependant, en pratique, un important signal parasite est observé dans les zones de la mire où l'intensité a varié du fait du déplacement transverse.

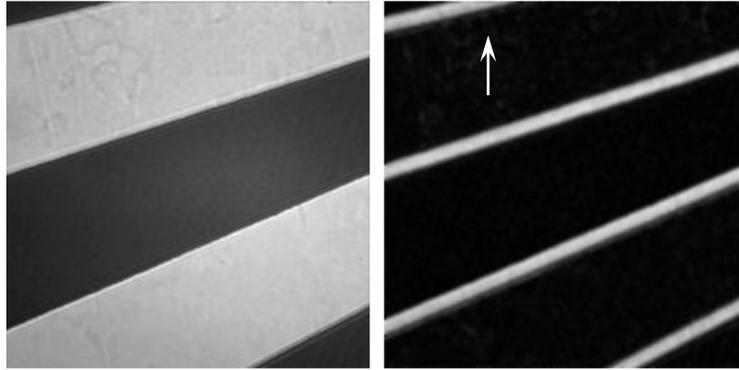


Figure IV.2 : (gauche) Image conventionnelle de la mire de microscope. (droite) Image tomographique obtenue par OCT plein champ conventionnelle de la mire de microscope, placée en dehors du plan de cohérence et animée d'un mouvement transverse (selon la flèche blanche). Taille du champ : $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$.

Nous proposons ici un modèle pour évaluer la vitesse transverse de l'échantillon à partir de laquelle le signal parasite généré devient gênant pour le dispositif d'OCT plein champ conventionnelle. Pour cela, nous considérerons un échantillon possédant un profil de réflectivité le long d'une ligne de la caméra CCD comme celui représenté sur la Figure IV.3. Ce profil représente le passage par une structure moins diffusante/réfléchissante. Notons que le paramètre Δx dépend de l'échantillon considéré mais ne peut être inférieur à la résolution transverse du système d'imagerie.

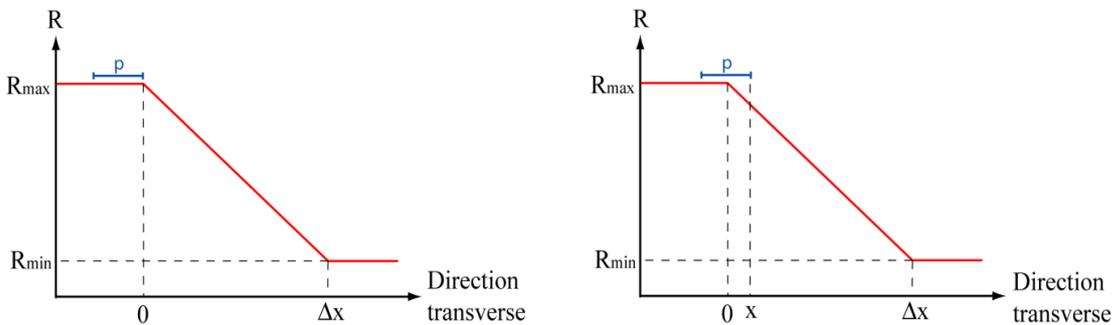


Figure IV.3 : Profil de réflectivité utilisé dans le modèle pour évaluer la vitesse transverse maximale de l'échantillon. R_{max} et R_{min} sont respectivement le maximum et le minimum de réflectivité de l'échantillon et p la largeur d'un pixel (carré) de la caméra.

Le signal délivré par un pixel de surface p^2 imageant une zone conjuguée de l'échantillon possédant une surface $(p/\gamma)^2$ (où γ est le grandissement total du système optique) et une réflectivité R_{max} (cf. Figure IV.3 droite) est :

$$S_1 = k \cdot \left(\frac{p}{\gamma}\right)^2 R_{max} \quad (\text{IV.1})$$

où k est un coefficient de proportionnalité, qui dépend principalement du rendement quantique et du temps d'intégration de la caméra CCD, et γ le grandissement total du système optique.

Après un déplacement transverse de l'échantillon d'une distance x (cf. Figure IV.3 droite), le signal délivré par le même pixel, égal à l'intégral du profil de réflectivité le long de la direction transverse, devient :

$$S_2 = S_1 - k \cdot \frac{p(R_{max} - R_{min})}{\gamma \cdot 2\Delta x} x^2 \quad (IV.2)$$

Cette variation de signal suite au déplacement transverse de l'échantillon peut être détectée si elle est supérieure au bruit. Nous considérerons que la plus petite variation, correspondant au déplacement minimal x_{min} , correspond au bruit¹. En supposant que la caméra fonctionne proche de la saturation et qu'elle est limitée par le bruit de photons, le signal délivré par un pixel est proportionnel à la capacité de charge des pixels ξ_{sat} , alors que le bruit est quant à lui proportionnel à la racine carrée de la capacité de charge des pixels. Par conséquent, le rapport signal sur bruit correspondant est donné par :

$$SNR = \frac{S_1}{(S_2 - S_1)_{min}} = \sqrt{\xi_{sat}} \quad (IV.3)$$

Ce rapport signal sur bruit correspond au déplacement minimal² :

$$x_{min} = \sqrt{\frac{2\Delta x \cdot p}{\gamma \sqrt{\xi_{sat}}} \times \frac{R_{max}}{R_{max} - R_{min}}} \quad (IV.4)$$

En considérant le cas le plus strict où la taille de la marche est limitée par la résolution transverse, $\Delta x = 1,6 \mu\text{m}$, une taille de pixel de $16 \mu\text{m}$, un grandissement de 17, une capacité de charge des pixels de $1,2 \times 10^5$ électrons et un contraste unité de l'échantillon (i.e. $R_{max} = 1$ et $R_{min} = 0$), le déplacement transverse à partir duquel la variation de signal sort du bruit de détection est de $0,1 \mu\text{m}$.

En toute rigueur, le calcul précédent n'est pas valable dans le cas d'un déplacement continu de l'échantillon. Nous avons en effet considéré un déplacement séquentiel de l'échantillon, avec deux positions fixes, sans intégrer le déplacement transverse pendant le temps d'acquisition. L'équation (IV.4) peut tout de même donner un ordre de grandeur de la vitesse transverse maximale de l'échantillon, à partir de laquelle le signal parasite généré devient gênant pour le dispositif d'OCT plein champ conventionnelle. En considérant un temps d'intégration de 5 ms, cette vitesse maximale est de l'ordre de $20 \mu\text{m/s}$. Des simulations numériques ont également été réalisées pour tenir compte du déplacement continu de l'échantillon pendant le temps d'intégration de la caméra. La vitesse transverse maximale obtenue grâce à ces simulations en fonction du contraste de l'échantillon est représentée sur la Figure IV.4. Le contraste a été calculé en prenant une réflectivité maximale $R_{max} = 1$, puisque l'intensité incidente est ajustée selon la nature de l'échantillon pour que la caméra travaille toujours proche de saturation³, et une réflectivité minimale R_{min} ajustable. Comme prévu, la contrainte sur la vitesse maximale n'est pas aussi sévère puisque le mouvement

¹ Cette limite est exagérée par rapport au cas expérimental : en effet, même si la limite ultime est le bruit, un signal n'est en général détectable effectivement que s'il est 2 ou 3 fois supérieur au bruit. Le calcul fait ici est donc le cas le plus strict et le dispositif expérimental sera généralement plus tolérant.

² Notons que ce calcul est fait dans le cas où aucune accumulation d'images tomographiques n'est réalisée, ce qui correspond au cas le plus sévère. En effet, le signal parasite sera différent pour chaque accumulation et se moyennera donc, contrairement au signal tomographique.

³ Notons que les réflectivités calculées selon cette méthode ne sont pas les réflectivités réelles de l'échantillon mais des réflectivités normalisées, correspondant à une saturation des caméras pour les structures les plus réfléchissantes.

transverse de l'échantillon est en partie moyenné pendant le temps d'intégration du détecteur. Ainsi dans le cas du contraste de 100%, la vitesse maximale est de 33 $\mu\text{m/s}$ en considérant un déplacement continu de l'échantillon au lieu de 20 $\mu\text{m/s}$.

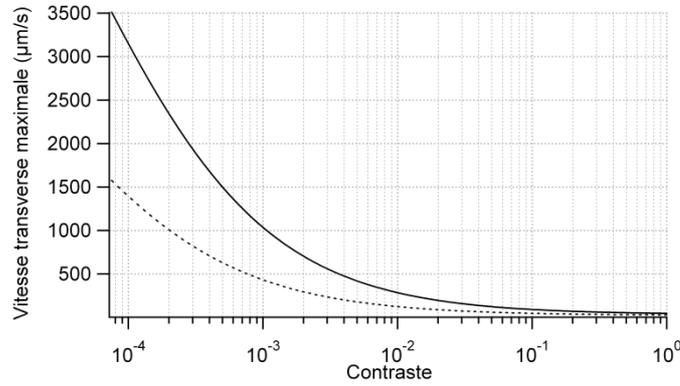


Figure IV.4 : Vitesse transverse maximale acceptable pour l'échantillon en fonction de son contraste. La courbe pleine représente l'équation (IV.4) et la courbe en pointillé les simulations numériques dans le cas d'un déplacement continu linéaire.

IV.1.2 Perte de contraste en présence d'un mouvement axial

En OCT plein champ conventionnelle, le mouvement de l'échantillon crée une variation de l'intensité mais également de la phase du signal interférométrique reçu par les pixels de la caméra CCD. La variation de la phase du signal durant le temps d'acquisition de chaque image interférométrique provoque une perte de contraste des franges d'interférences, un "brouillage", qui entraîne une dégradation du signal tomographique.

Cet effet est principalement dû à un mouvement axial de l'échantillon puisque celui-ci modifie le chemin optique parcouru et donc la phase du signal interférométrique.

Considérons un dispositif d'OCT plein champ conventionnelle, acquérant successivement deux images en opposition de phase. En supposant que la source d'illumination est monochromatique de longueur d'onde λ_0 et que le décalage de phase est séquentiel (*i.e.* on acquiert une première image interférométrique alors que le miroir de référence est fixe, puis on déplace celui-ci pour induire un déphasage de π dans le signal interférométrique et on acquiert la seconde image interférométrique, le miroir de référence étant de nouveau fixe), les deux images acquises en opposition de phase sont données par l'intégrale du signal interférométrique pendant le temps d'intégration T_{int} de la caméra CCD :

$$S_1 \propto \int_0^{T_{int}} \left[1 + \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda_0} vt\right) \right] dt \quad \text{et} \quad S_2 \propto \int_{T_{int}}^{2T_{int}} \left[1 - \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda_0} vt\right) \right] dt, \quad (\text{IV.5})$$

où v est la vitesse axiale de l'échantillon. Le signal tomographique est calculé par le carré de la différence de ces deux images, soit :

$$(S_1 - S_2)^2 \propto \text{sinc}^2\left(\frac{4\pi}{\lambda_0} v T_{int}\right) \quad (\text{IV.6})$$

Ce signal tomographique chute à 0 pour une vitesse axiale, que nous considérerons dans la suite comme une vitesse axiale maximale tolérable par notre dispositif, donnée par :

$$v_{max} = \frac{\lambda_0}{4T_{int}} \quad (\text{IV.7})$$

Pour un temps d'intégration de 5 ms et une source d'émission monochromatique à 800 nm, cette vitesse axiale maximale est de l'ordre de 40 $\mu\text{m/s}$, ce qui correspond aux valeurs typiques observées dans les échantillons biologiques *in vivo*. Des simulations numériques ont également été réalisées pour tenir compte d'une illumination par une source polychromatique de spectre quelconque et d'un décalage de phase sinusoïdal, pour lequel le miroir de référence est animé d'une oscillation sinusoïdale à une fréquence moitié de la fréquence d'acquisition de la caméra (cf. Figure IV.5). La vitesse axiale maximale trouvée à l'aide de ces simulations, dans le cas d'un spectre gaussien de longueur d'onde centrale d'émission $\lambda_0 = 800$ nm et de largeur spectrale totale à mi-hauteur $\Delta\lambda = 300$ nm, est similaire.

Nous avons mesuré l'amplitude du signal interférométrique en fonction de la vitesse axiale de l'échantillon pour le dispositif d'OCT plein champ conventionnelle présenté dans le chapitre II : on a donc réalisé un décalage de phase sinusoïdal acquérant deux images en opposition de phase, grâce à une illumination continue par la lampe halogène et un temps d'intégration de 5 ms (cas de la caméra Silicium). L'objet étudié est un miroir métallique, monté sur un transducteur piézoélectrique afin de lui imposer un déplacement axial de vitesse ajustable. La position axiale du miroir lorsqu'aucune tension n'est appliquée sur le transducteur piézoélectrique coïncide avec le plan de mise au point de l'objectif de microscope du bras objet et un étalonnage préalable permet de relier la fréquence et l'amplitude d'oscillation du piézoélectrique à la vitesse axiale de l'objet. La Figure IV.5 présente les résultats des mesures de la perte du signal tomographique en fonction de la vitesse axiale de l'échantillon, qui sont en très bon accord avec les simulations numériques.

En conclusion, les valeurs typiques des vitesses des structures dans les échantillons biologiques *in vivo* correspondent à la vitesse axiale maximale pour laquelle le signal interférométrique est complètement brouillé. Le mouvement axial est donc une limitation sévère à l'applicabilité de l'OCT plein champ conventionnelle pour l'imagerie *in vivo*. C'est pourquoi une diminution du temps d'intégration est absolument nécessaire pour surmonter cette limitation.

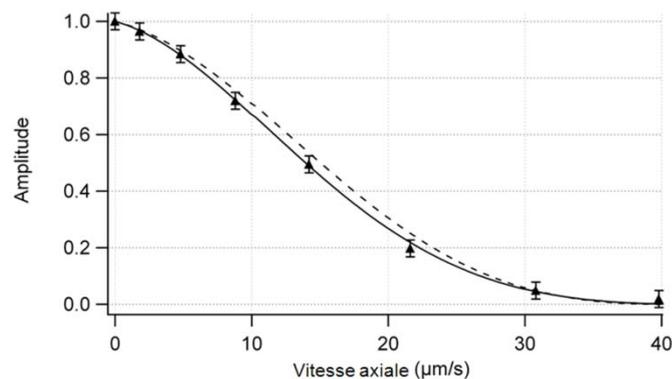


Figure IV.5 : Amplitude du signal tomographique en fonction de la vitesse axiale de l'échantillon dans le cas d'une illumination continue et d'un décalage de phase temporel. Les simulations numériques pour un décalage de phase sinusoïdal sont représentées par la courbe pleine, l'équation (IV.6) par la courbe en pointillée et les mesures par les triangles.

IV.1.3 Solution envisagée

Afin de supprimer les artefacts de mouvement en OCT plein champ, il nous faut résoudre les deux problèmes évoqués précédemment :

- l'apparition d'un signal parasite : ce signal parasite est essentiellement dû à un mouvement transverse des structures de l'échantillon et cela que les structures soient ou non dans le volume de cohérence de l'interféromètre, ce qui réduit la capacité du dispositif d'imagerie à extraire la tranche d'information adéquate. L'apparition du signal parasite est intrinsèquement liée au décalage de phase temporel, c'est-à-dire à l'acquisition successive des différentes images interférométriques. Nous avons donc développé un nouveau dispositif d'OCT plein champ permettant de réaliser l'acquisition simultanée de deux images interférométriques, et cela sans utiliser de lumière polarisée afin de rester insensible à la biréfringence éventuelle de l'échantillon.

- la perte de contraste des franges d'interférences : ce brouillage est dû à un mouvement axial des structures de l'échantillon, et entraîne une perte du signal tomographique. La perte de contraste des franges d'interférences est quant à elle reliée au temps d'acquisition des images interférométriques. Il est assez évident au vu de l'équation (IV.6) que ce second problème peut être considérablement atténué en réduisant le temps d'acquisition des images. Cela peut être réalisé de deux manières : soit en réduisant le temps d'intégration de la caméra, soit en réduisant le temps d'illumination par la source. Cependant, l'utilisation de caméras très rapides, type CMOS, n'est pas judicieux du fait de leur faible dynamique, qui limite la sensibilité de détection [57]. Une meilleure solution est de combiner une caméra possédant une grande capacité de charge des pixels, même si cela implique un long temps d'intégration, et une source d'illumination pulsée pour réduire le temps d'exposition. Le régime impulsionnel peut être envisagé avec une lampe halogène, en disposant d'un *chopper* optique. Cependant, la puissance lumineuse délivrée par la lampe halogène est alors trop faible pour pouvoir couvrir la totalité de la dynamique du détecteur lorsqu'on étudie des échantillons biologiques. C'est pourquoi la source de fluorescence du cristal de Ti-Saphir en régime impulsionnel présentée au chapitre précédent a été utilisée comme source lumineuse pour le nouveau dispositif d'OCT plein champ, du fait de sa luminance supérieure et de sa résolution axiale convenable (cf. Tableau III.5).

IV.2 Dispositif expérimental

Nous présentons dans ce paragraphe le dispositif expérimental développé pour supprimer les artefacts liés au mouvement en OCT plein champ, en particulier le principe général et la mise en place expérimentale du dispositif à décalage de phase instantané.

IV.2.1 Principe général du décalage de phase instantané

Nous souhaitons réaliser un dispositif d'OCT plein champ capable d'acquérir simultanément deux images interférométriques en opposition de phase, et ceci sans utiliser de lumière polarisée. Considérons pour cela un interféromètre de Linnik, élément de base d'un dispositif d'OCT plein champ, éclairé par une intensité incidente I_0 (cf. Figure IV.6).

Si la séparatrice de l'interféromètre est parfaitement 50/50, les amplitudes respectives dans chaque bras de l'interféromètre juste après sont égales (faisceaux représentés en vert sur la Figure IV.6) :

$$A_{réf,in} = A_{éch,in} = \sqrt{\frac{I_0}{2}} \quad (IV.8)$$

Après propagation sur un aller-retour dans chaque bras de l'interféromètre, les amplitudes dans les bras référence et échantillon juste avant recombinaison sur la séparatrice sont respectivement (faisceaux représentés en bleu sur la Figure IV.6) :

$$A_{réf,fin}(x, y) = \sqrt{\frac{R_{éch}(x, y) I_0}{2}} \exp[i\phi_{réf}(x, y)] \quad \text{et} \quad A_{éch,fin}(x, y) = \sqrt{\frac{R_{réf} I_0}{2}} \exp[i\phi_{éch}(x, y)]$$

L'intensité sur la sortie 1 de l'interféromètre est alors :

$$I_1(x, y) = |A_{réf,fin}(x, y) + A_{éch,fin}(x, y)|^2$$

$$I_1(x, y) = \frac{I_0}{4} \left[R_{éch}(x, y) + R_{réf} + 2\sqrt{R_{réf}R_{éch}(x, y)} \cos(\phi_{éch}(x, y) - \phi_{réf}(x, y)) \right] \quad (IV.9)$$

De plus, par conservation de l'énergie, les intensités issues des deux sorties de l'interféromètre (intensités oranges sur la Figure IV.6) doivent être égales à l'intensité incidente moins les pertes. La lame séparatrice étant parfaite (sans pertes), les seules pertes engendrées dans l'interféromètre se font à la réflexion sur les surfaces référence et échantillon, soit :

$$\text{Pertes}(réf) = \frac{I_0}{2} (1 - R_{réf}) \quad \text{et} \quad \text{Pertes}(éch) = \frac{I_0}{2} (1 - R_{éch}) \quad (IV.10)$$

On peut donc en déduire l'intensité sur la sortie 2 de l'interféromètre :

$$I_2(x, y) = \frac{I_0}{2} (R_{réf} + R_{éch}) - I_1(x, y)$$

$$I_2(x, y) = \frac{I_0}{4} \left[R_{éch}(x, y) + R_{réf} - 2\sqrt{R_{réf}R_{éch}(x, y)} \cos(\phi_{éch}(x, y) - \phi_{réf}(x, y)) \right] \quad (IV.11)$$

Les deux sorties de l'interféromètre sont donc en opposition de phase et cela quelle que soit la nature de la polarisation incidente, ce qui permet de réaliser un décalage de phase de π instantanément.

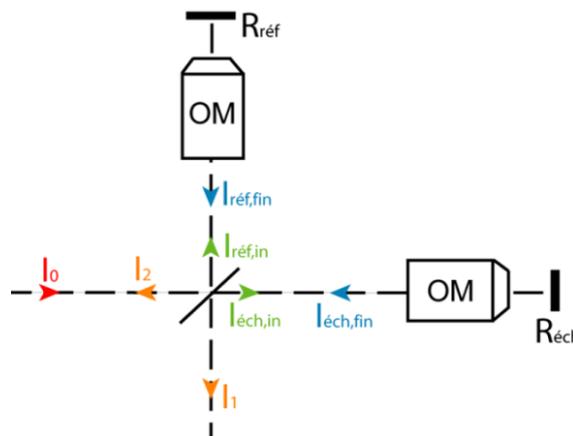


Figure IV.6 : Schéma de principe du calcul des intensités en sortie d'un interféromètre de Linnik.

IV.2.2 Montage expérimental

On souhaite acquérir simultanément le signal issu des deux sorties de l'interféromètre. Pour cela, on utilise le dispositif expérimental représenté sur la Figure IV.7.

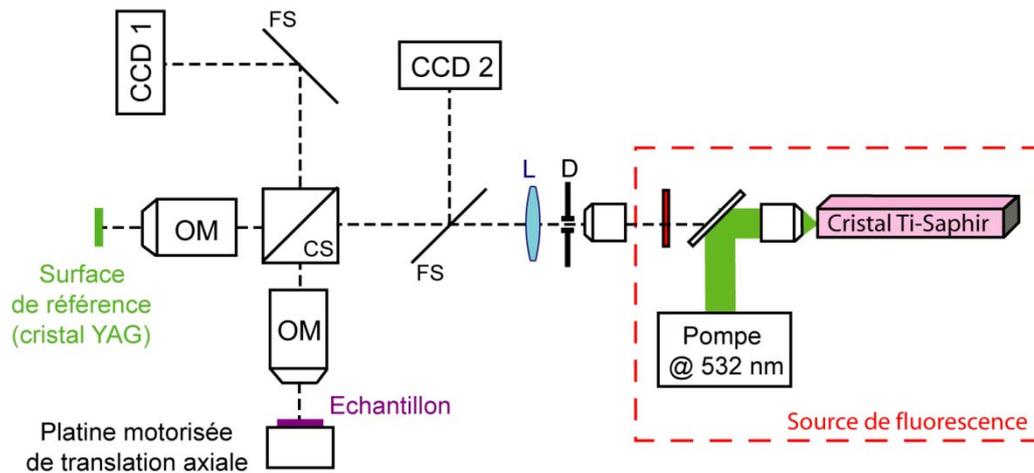


Figure IV.7 : Dispositif expérimental pour la suppression des artefacts liés au mouvement en OCT plein champ. CS : cube séparateur, FS : film pelliculaire séparateur, OM : objectif de microscope, L : lentille de collimation ($f = 80 \text{ mm}$), D : diaphragme.

Les trois éléments du montage (la source lumineuse, l'interféromètre et le système d'acquisition) sont décrits plus en détail ci-dessous.

• La source lumineuse

La source lumineuse utilisée dans ce dispositif est la source de fluorescence du cristal de Ti-Saphir présentée au chapitre précédent, utilisée en régime impulsionnel à l'aide d'un *chopper* optique inséré sur le trajet du faisceau pompe, générant des impulsions de 1 ms à une fréquence de répétition de 200 Hz, d'énergie par impulsion de 72 μJ . Le faisceau de fluorescence émis par le cristal de Ti-Saphir et collecté par l'objectif de microscope est très divergent et présente une structure spatiale similaire à celle d'un guide carré. Afin d'obtenir un éclairage homogène dans le plan de mise au point des objectifs de microscope et de taille adaptée, une collimation et un filtrage spatial du faisceau de fluorescence sont réalisés (cf. chapitre précédent).

• L'interféromètre de Linnik

L'interféromètre de Linnik est identique à celui présenté dans le chapitre II, à l'exception du transducteur piézoélectrique qui a été retiré du bras de référence puisque le décalage de phase n'est plus réalisé de manière temporelle mais par l'acquisition simultanée des deux sorties de l'interféromètre. L'interféromètre est constitué d'un cube séparateur de faisceau non polarisant et de deux objectifs de microscopes identiques, à immersion dans l'eau, d'ouverture numérique 0,3 et de grossissement 10 \times (Olympus, référence UMPLFL 10XW/0.3). La surface de référence est une surface plane d'un barreau d' $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$, présentant une réflectivité de 2% dans l'eau.

• Le système d'acquisition

Comme nous l'avons expliqué précédemment, deux détecteurs, placés aux deux sorties de l'interféromètre, sont nécessaires pour acquérir simultanément deux images

interférométriques en opposition de phase. Les deux caméras doivent bien évidemment être identiques. Notre choix s'est porté sur la caméra CCD au silicium du dispositif d'OCT plein champ à deux longueurs d'onde (modèle CA-D1 de Dalsa) du fait de sa rapidité (capacité d'acquisition de 200 images par seconde), sa grande sensibilité de détection (capacité de charge des pixels de 120 000 électrons) et de son fonctionnement dans le proche infrarouge, domaine spectral d'émission de la source lumineuse et pour lequel les optiques de notre dispositif, en particulier les objectifs de microscope, sont appropriés. Les deux caméras CCD sont synchronisées sur le même signal TTL afin d'acquérir les images aux mêmes instants. Cette acquisition simultanée ainsi que le traitement éventuel des images sont réalisés à l'aide d'un programme en Visual C++ développé au laboratoire.

L'une des deux sorties de l'interféromètre étant également l'entrée, une séparatrice doit être disposée avant l'entrée de l'interféromètre de Linnik pour pouvoir séparer le signal interférométrique I_2 du faisceau incident. Cependant, avec cette séparatrice seulement 50% du signal I_2 n'est effectivement envoyé sur la caméra CCD 2. Les deux caméras devant détecter exactement la même intensité en l'absence d'interférences (correspondant au signal tomographique nul souhaité en l'absence d'information structurelle), il faut également n'envoyer que 50% du signal interférométrique I_1 sur la caméra CCD 1. C'est pourquoi une seconde séparatrice non polarisante, identique à la précédente, est ajoutée à la sortie de l'interféromètre. On a choisi pour ces deux séparatrices des films pelliculaires, qui présentent l'avantage de ne pas posséder de réflexion parasite sur leurs faces d'entrée et de sortie et une réflectivité/transmission plate sur l'ensemble de la région spectrale d'intérêt (cf. Figure IV.8).

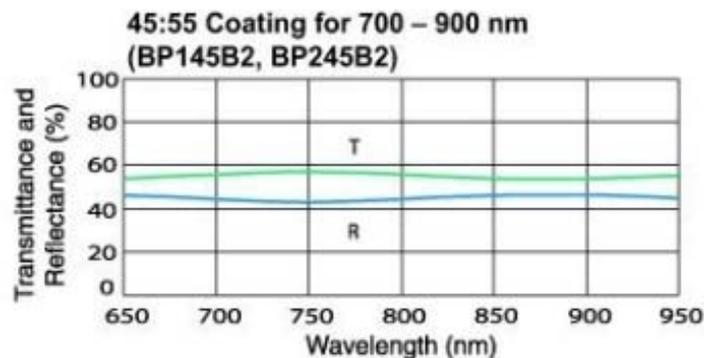


Figure IV.8 : Courbe de transmission des films pelliculaires (données Thorlabs).

En comparaison d'un dispositif d'OCT plein champ conventionnel, l'ajout de deux séparatrices réduit la luminance d'un facteur 50% au niveau de l'échantillon et 75% au niveau des caméras. Cependant, la luminance délivrée par la source de fluorescence est suffisamment importante pour compenser ces pertes et utiliser les caméras proche de saturation, l'énergie effective par impulsion au niveau de l'échantillon étant de l'ordre de 2 μJ , soit une luminance de $\sim 6 \mu\text{J}/\text{cm}^2$.

Dans ce dispositif, nous avons décidé de ne pas utiliser de lentilles pour projeter les images interférométriques sur les capteurs des caméras CCD, comme nous avons pu le faire dans le dispositif d'OCT plein champ à deux longueurs d'onde. La raison principale de ce choix est de simplifier au maximum la procédure d'alignement des caméras. Les objectifs de microscope ne sont donc plus utilisés dans la configuration infini - foyer pour laquelle ils sont optimisés,

ce qui peut entraîner l'apparition d'aberrations (principalement courbure de champ et aberration sphérique). Cependant, la distance objectifs de microscope - caméras a été choisie suffisamment grande devant la distance focale des objectifs (environ 200 mm contre 18 mm) pour que très peu d'aberrations soient effectivement observées dans cette configuration.

Le choix de cette distance objectifs de microscope - caméras est un compromis entre :

- la taille du champ observé, qui augmente lorsque cette distance décroît (environ $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ pour une distance de 500 mm et $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ pour une distance de 200 mm)
- le flux lumineux reçu par les capteurs des caméras CCD, qui augmente lorsque cette distance diminue
- les aberrations introduites par les objectifs, qui augmentent lorsque cette distance diminue.

IV.2.3 Alignement et calibration des caméras

Dans ce dispositif d'OCT plein champ, les deux images interférométriques en opposition de phase sont acquises simultanément par deux caméras CCD et leur différence conduit à l'image tomographique. Il est donc essentiel que :

- les pixels de mêmes coordonnées sur les deux capteurs soient conjugués avec la même zone de l'échantillon observé (alignement des caméras)
- les pixels de mêmes coordonnées sur les deux capteurs aient la même réponse en intensité (calibration des caméras).

• Alignement des caméras

Les pixels de mêmes coordonnées sur les deux caméras doivent, aussi précisément que possible, être conjugués avec la même zone de l'échantillon observé. Dans le cas contraire, la différence de deux images identiques mais spatialement décalés fera apparaître un signal parasite dans l'image tomographique. Ce signal ne contient aucune information pour l'image tomographique et doit donc être supprimé par un alignement rigoureux de la position relative des deux capteurs CCD.

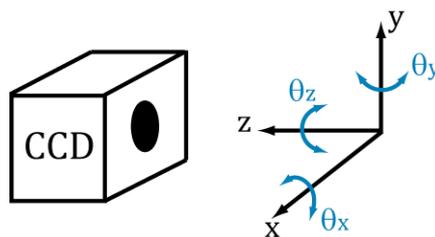


Figure IV.9 : Différents degrés de liberté nécessaires pour régler l'alignement relatif des deux caméras du dispositif d'OCT plein champ rapide.

Pour réaliser la superposition exacte des deux capteurs CCD, il faut régler les six degrés de liberté existants (trois degrés de liberté de translation¹ et trois degrés de liberté de rotation comme représenté sur la Figure IV.9). Notons que le réglage des deux capteurs étant relatif, il n'est pas nécessaire d'avoir ces six réglages pour les deux caméras. Une procédure

¹ Pour les degrés de translations x et y, un décalage se corrige simplement par traitement informatique, mais limite le champ utiles. C'est pourquoi nous avons préféré réaliser un alignement complet des 6 degrés de liberté.

d'alignement permettant de régler ces six paramètres de façon aussi indépendante que possible a été mise en place :

1) On place les capteurs orthogonalement à l'axe optique du système : en utilisant le faisceau laser d'alignement, on superpose la réflexion sur chaque capteur CCD¹ avec la direction incidente du faisceau laser. Cette première étape permet de régler les rotations θ_x et θ_y des caméras.

2) L'effet de la rotation θ_z autour de l'axe z est facilement discriminable à l'aide d'un programme de *morphing*² avec le logiciel ImageJ en imageant un objet structuré type mire de microscope.

3) La mire de microscope permet également de régler la translation axiale z responsable de la défocalisation entre les deux images. Ce réglage dépend de la profondeur de champ du système {objectif de microscope + pixel du capteur CCD}, de l'ordre du millimètre dans notre dispositif.

4) Un réseau de diffraction de 1500 traits/mm (correspondant à une trentaine de traits pour le champ des caméras) est enfin placé afin de régler précisément les deux translations transverses. En plaçant les traits du réseau successivement parallèles à la direction x puis à la direction y (en réalité, on réalise l'alignement plusieurs fois pour converger vers le réglage optimal), on peut dissocier complètement l'effet des deux translations. Ce réglage est le plus critique : un déplacement de quelques dixièmes de pixels suffit à faire apparaître un fort signal parasite. Afin de quantifier la dégradation du signal tomographique due à un décalage transverse entre les deux caméras, nous avons enregistré sur la même caméra deux images successives, en introduisant entre elles un décalage transverse réglable à l'aide d'une translation de précision micrométrique (la taille d'un pixel étant de 16 μm , nous avons donc une précision de réglage de 1/16 de pixel !). On en déduit alors un rapport entre la moyenne sur une des deux images (correspondant au signal) et la moyenne de l'image différence (correspondant au bruit) en fonction du décalage transverse. La Figure IV.10 montre que l'apparition d'un fond ne devient pas négligeable devant le signal dès quelques dixièmes de pixels, ce qui correspond à la précision requise pour nos alignements.

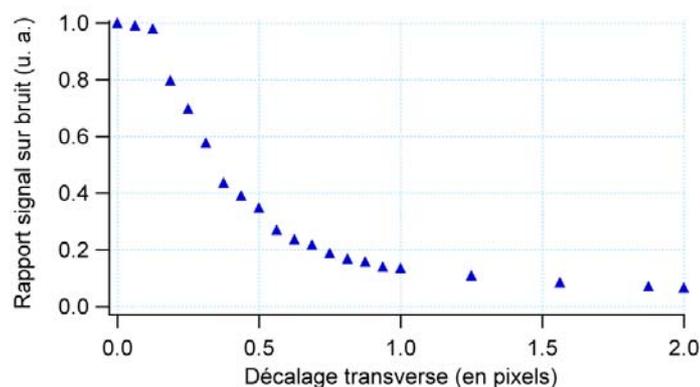


Figure IV.10 : Effet d'une translation d'une des deux images sur le rapport signal bruit de la différence de deux images identiques.

¹ En réalité, la réflexion sur la matrice de pixels des capteurs crée un réseau de diffraction et c'est l'ordre (0,0) que l'on aligne avec la direction du faisceau laser incident.

² Le principe du *morphing* est de faire correspondre un à un les points de deux images distinctes de façon à pouvoir définir une matrice de transformation entre ces deux images.

Pour optimiser les ajustements précédents, un calcul des positions relatives des deux capteurs est effectué en temps réel, à partir des images d'un même objet délivrées par les deux caméras. Ce calcul se base sur des mesures de corrélations de paires d'images. Il est possible de montrer que pour avoir un maximum de précision sur l'orientation et la position relative de deux images d'un même motif, il faut que celui-ci soit aléatoire et contienne des variations de contraste à l'échelle de quelques pixels. Une surface granuleuse et réfléchissante, imagée par un seul bras de l'interféromètre, permet en pratique de réaliser l'optimisation finale au dixième de pixel près, sur toute la surface de la matrice.

Cet alignement des caméras est indépendant de la nature de l'objet contenu dans le bras de l'interféromètre. En pratique, il n'est donc réalisé qu'une seule fois avant chaque série d'expériences.

• Calibration des caméras

La linéarité de la réponse des caméras a été vérifiée par la mesure de leur réponse pour différentes intensités incidentes, obtenues à l'aide d'une série de densités neutres étalonnées placées devant la source de fluorescence. Les résultats expérimentaux présentés sur la Figure IV.11 démontrent que les pentes des réponses des deux caméras sont légèrement différentes. Cette différence de pente peut s'expliquer par une légère différence de réponse spectrale d'un modèle de caméra à l'autre, mais surtout par l'imperfection du cube et des films séparateurs, qui ne sont pas rigoureusement 50/50 et n'envoient donc pas le même flux sur les deux caméras.

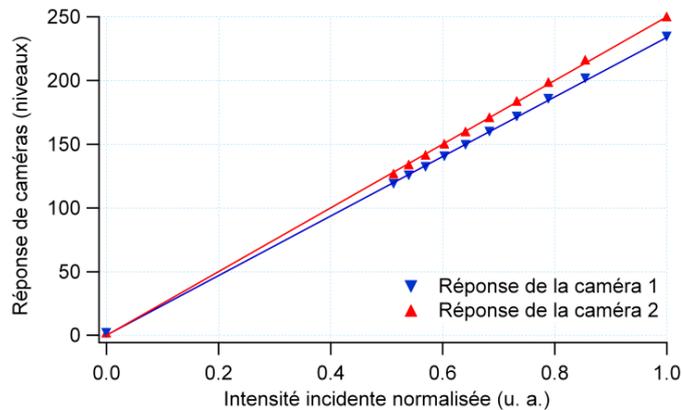


Figure IV.11 : Mesure de la linéarité de la réponse des caméras utilisées.

Il semble que la mesure précédente soit suffisante pour calibrer la réponse relative des caméras : il suffit de multiplier toutes les images acquises par la caméra 1 par le rapport des pentes des réponses linéaires caméra 2/caméra 1 pour que les réponses des deux caméras soient identiques. Cependant, cela suppose que la mesure des pentes soit indépendante de la nature de l'objet étudié. Or, l'intensité reçue par chacune des caméras est donnée par (cf. Figure IV.7) :

$$\begin{cases} I_1 = \eta_1 [TR (T'R' R_{ref} + T'R' R_{obj})] \\ I_2 = \eta_2 [TR (T'^2 R_{ref} + R'^2 R_{obj})] \end{cases} \quad (IV.12)$$

où T et R sont respectivement la transmission et la réflexion des films pelliculaires (que l'on supposera identiques pour les deux), T' et R' sont respectivement la transmission et la réflexion du cube séparateur de l'interféromètre, R_{ref} est la réflectivité de la surface de

référence, R_{obj} la réflectivité de l'objet et η_1 et η_2 sont les pentes des réponses linéaires des caméras 1 et 2.

Le rapport des intensités détectées par les deux caméras n'est donc pas strictement égal au rapport des pentes des réponses linéaires mais dépend également des réflectivités de l'objet et du miroir de référence :

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{\eta_1(T'R' R_{ref} + T'R' R_{obj})}{\eta_2(T'^2 R_{ref} + R'^2 R_{obj})} \quad (IV.13)$$

Au vu de l'équation (IV.13), le facteur de calibration dépend de la réflectivité de l'objet étudié, donc de sa nature mais aussi de la profondeur de pénétration à laquelle il est imagé. En effet, le flux rétrodiffusé par l'objet dépend des structures présentes dans le plan de mise au point de l'objectif et donc de la profondeur de pénétration. Une calibration *in situ* est donc très difficile à réaliser et nous lui avons préféré une calibration numérique réalisée *a posteriori* sous ImageJ. Au cours de ce traitement, une égalisation des intensités moyennes (comprendre moyennes sur la totalité des pixels de chaque caméra) des images interférométriques reçues par chaque caméra est réalisée et ceci pour chaque profondeur de pénétration. Cette calibration étant réalisée pour la totalité de l'image et non pixel à pixel, elle nécessite que l'éclairage soit uniforme et que les réflectivités de l'objet n'est pas de grande variation (typiquement inférieures à 5%) sur la totalité du champ.

IV.2.4 Performances du dispositif d'imagerie

Nous présentons dans ce paragraphe les performances du nouveau dispositif d'OCT plein champ, à savoir sa résolution spatiale (axiale et transverse), sa sensibilité de détection et le temps d'acquisition des coupes tomographiques.

• Résolution axiale

La résolution axiale du dispositif d'imagerie est imposée par le spectre effectif du dispositif. Les composants optiques étant large bande, on peut considérer avec une bonne approximation que le spectre effectif est le produit du spectre de la source de fluorescence par la réponse spectrale de chaque caméra. La résolution axiale est donc la même que celle mesurée dans le Section III.2.5, à savoir 1,4 μm dans l'eau.

• Résolution transverse

La résolution transverse d'un dispositif d'imagerie est définie comme la largeur totale à mi-hauteur de la PSF du système optique. Elle ne dépend pas de la source d'illumination mais de l'ouverture numérique des objectifs de microscope et de l'éventuel échantillonnage par les pixels des caméras.

La résolution transverse a déjà été mesurée dans la Section II.1.4, mais pourrait être ici légèrement différente du fait de l'absence de lentille de projection. Nous l'avons donc remesurée expérimentalement en enregistrant le profil d'intensité le long d'une marche (typiquement le bord d'un miroir de silicium cassé net). Les résultats de ces mesures pour les deux caméras sont présentés sur la Figure IV.12. Les résultats expérimentaux ont été ajustés par un profil d'intensité théorique, correspondant à la convolution entre une fonction de Heaviside, modélisant la marche parfaite, la fonction d'Airy, approximation de la PSF du système optique, et une fonction porte de largeur égale à la taille objet des pixels de la

caméra (égal dans cette configuration à $\sim 0,78 \mu\text{m}$), modélisant l'échantillonnage par les pixels de la caméra. Cet ajustement nous a permis de déterminer la PSF du système optique et donc la résolution transverse du système, de l'ordre de $1,5 \mu\text{m}$ pour les deux caméras. Cette valeur est très proche de la résolution transverse théorique de $1,3 \mu\text{m}$ calculée à partir de l'équation (I.1).

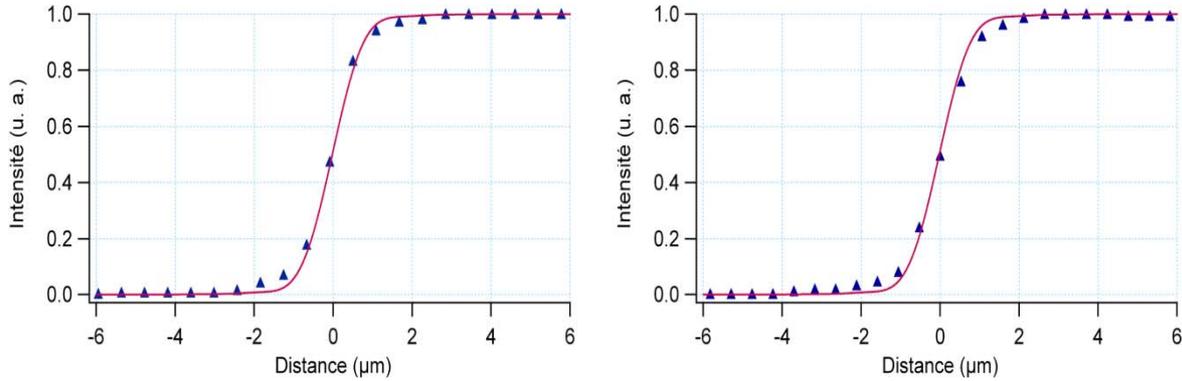


Figure IV.12 : Résolution transverse dans l'eau des caméras 1 (droite) et 2 (gauche). Les points bleus correspondent aux mesures expérimentales et la courbe rouge à l'ajustement théorique.

• Sensibilité de détection

La sensibilité de détection de notre système d'imagerie correspond au plus petit coefficient de réflexion détectable. Il dépend du bruit de détection, qui est ici le bruit de détection corrélé des deux caméras.

La sensibilité de détection a déjà été mesurée pour la caméra Silicium dans la Section II.1.4, mais la situation est complètement différente ici puisque nous utilisons deux détecteurs et une calibration numérique. La sensibilité de détection a donc été remesurée dans le cas du dispositif d'OCT plein champ à deux caméras selon la procédure suivante :

- on enregistre l'image tomographique d'un échantillon de réflectivité R connue (dans notre cas, une lame de verre dans l'eau de réflectivité 0,4%) pour un nombre N d'accumulations donné et avec un flux tel que les caméras travaillent proche de la saturation. On extrait le maximum S_{max} de cette image après calibration de la réponse des caméras.

- on enregistre l'image tomographique sans interférence en défocalisant légèrement l'échantillon (ainsi le flux détecté demeure quasiment inchangé). On extrait la moyenne S_{min} de cette image, après calibration de la réponse des caméras, qui correspond au bruit de fond propre à notre dispositif.

La sensibilité de détection est alors donnée par :

$$R_{min} = R \frac{S_{min}}{S_{max}} \quad (\text{IV.14})$$

En utilisant cette méthode, nous avons mesuré la sensibilité de détection du dispositif d'OCT plein champ à deux caméras en fonction du nombre d'images accumulées. Les mesures, représentées sur la Figure IV.13, sont très proches de la valeur théorique, donnée par l'équation (II.14) avec une capacité de charge des pixels de $1,2 \times 10^5$ électrons.

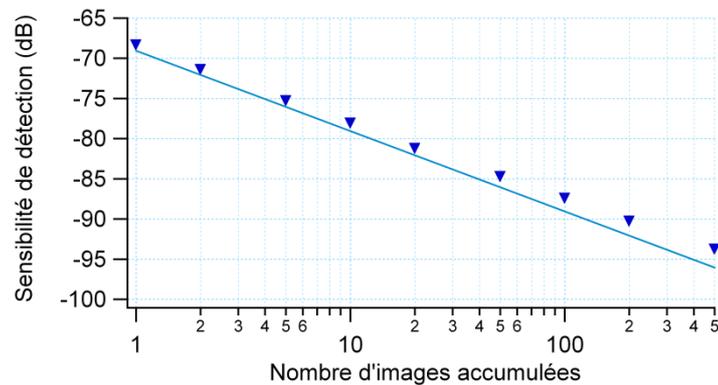


Figure IV.13 : Sensibilité de détection du dispositif d'OCT plein champ. Les points correspondent aux mesures expérimentales et la courbe à l'équation (II.15).

Une sensibilité de détection de l'ordre de 90 dB, correspondant à un coefficient de réflexion minimal détectable de 10^{-9} , est facilement accessible. Cependant, cette valeur de sensibilité de détection nécessite l'accumulation de 200 images interférométriques, ce qui n'est pas très réaliste pour l'imagerie *in vivo* et contradictoire avec le principe de décalage de phase instantané. C'est pourquoi, il est nécessaire de ne pas accumuler d'images interférométriques. Dans ce cas, on atteint une sensibilité de détection de 60 dB, correspondant à un coefficient de réflexion minimal détectable de 10^{-6} , valeur modeste mais néanmoins suffisante pour imager des structures biologiques à de faible profondeur de pénétration ($\sim 100 \mu\text{m}$) dans des milieux faiblement diffusants.

Notons également que la sensibilité de détection peut être augmentée sans accumuler d'images, en effectuant du *binning* de pixels, méthode qui consiste à combiner entre eux une zone de plusieurs pixels (généralement une zone de 2×2 ou 4×4 pixels) pour former des "super pixels" possédant une capacité de charge et donc une sensibilité de détection plus élevées (dans les exemples précédents 4 ou 16 fois plus importantes). Cependant, cette technique nécessite l'utilisation de caméras possédant un grand nombre de pixels, ce qui n'était pas le cas dans cette expérience, les caméras possédant en effet seulement 256×256 pixels.

• Temps d'acquisition des coupes tomographiques

Dans le cas où l'on ne réalise pas d'accumulation, le temps d'acquisition d'une image tomographique est de 1 ms (imposé par le temps d'exposition de la source impulsionnelle), avec une période de répétition de 5 ms (imposée par le temps d'intégration des caméras).

Les coupes tomographiques résultent de l'acquisition de ces images tomographiques pour différentes profondeurs de pénétration dans l'échantillon biologique, grâce au déplacement de la platine axiale motorisée. Le pas de cette platine étant de $1 \mu\text{m}$, une image 3D de $240 \times 240 \times 500 \mu\text{m}^3$ ($X \times Y \times Z$) prend environ 2,5 s. Notons ici le gain considérable réalisé sur le temps d'acquisition des coupes tomographiques, par rapport au dispositif précédent (environ 20 minutes pour le même volume).

• Bilan

Représentons de nouveau les quatre grandeurs sur le diagramme type diagramme radar (cf. Figure IV.14). La résolution spatiale est similaire au dispositif précédent, la profondeur

de pénétration et la sensibilité de détection dégradées de ~ 30 dB par l'absence d'accumulation d'images interférométriques et le temps d'acquisition amélioré d'un facteur ~ 500 .

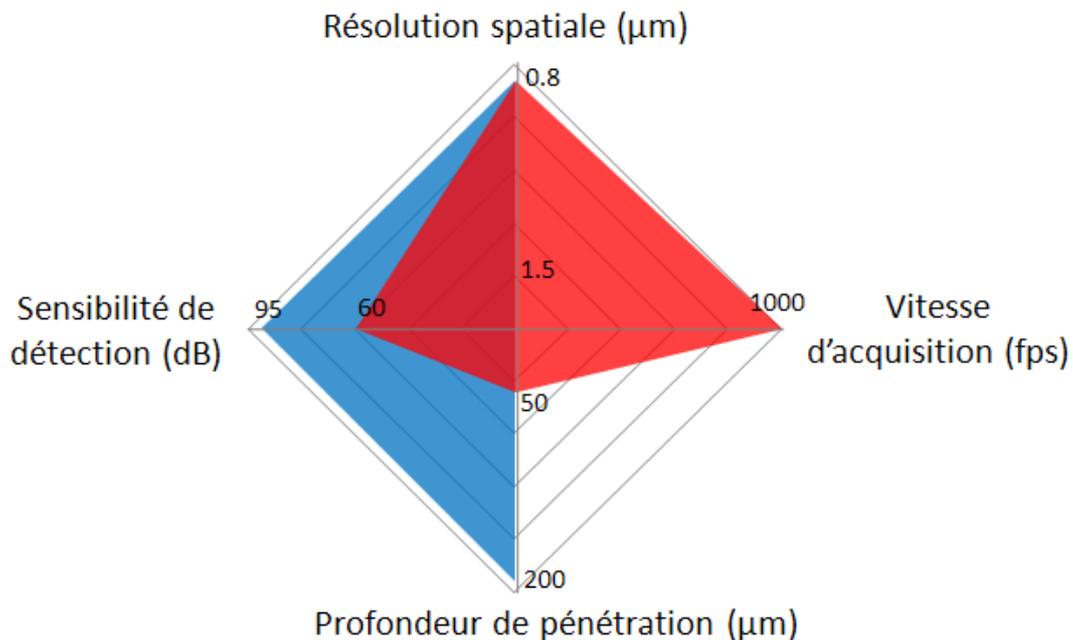


Figure IV.14 : Diagrammes radars comparatifs des dispositifs d'OCT plein champ conventionnel (diagramme bleu) et dispositif pour supprimer les artefacts de mouvement (diagramme rouge).

Remarquons de nouveau l'interdépendance des différents paramètres : il a fallu réaliser un compromis sur la sensibilité de détection en n'accumulant pas d'images interférométriques afin d'augmenter la vitesse d'acquisition. Ce système ne sera donc pas adapté à tous les échantillons biologiques du fait de sa sensibilité de détection modeste, mais semble particulièrement prometteur pour l'imagerie *in vivo* puisque nous avons atteint un temps d'acquisition de 1 ms par image tomographique.

IV.3 Suppression des artefacts de mouvement

Nous présentons dans ce paragraphe la capacité de notre dispositif d'OCT plein champ à supprimer les artefacts de mouvement étudiés précédemment, à savoir la suppression du signal parasite induit par les mouvements transverses de l'échantillon et la réduction de la perte de contraste liée aux mouvements axiaux de l'échantillon.

IV.3.1 Suppression du signal parasite lié au mouvement transverse

En OCT plein champ conventionnelle, l'apparition du signal parasite est principalement liée à l'acquisition séquentielle des différentes images interférométriques. Dans le cas d'un décalage de phase instantané, ce signal parasite est complètement supprimé puisque les deux images en opposition de phase sont acquises simultanément.

Pour illustrer ce phénomène, nous avons repris la mire de microscope, composée de bandes de chrome déposées sur un substrat de verre. Elle a été montée sur un transducteur piézoélectrique afin de lui imposer un déplacement transverse de vitesse ajustable et des images interférométriques de la mire ont été acquises au cours de son déplacement. La mire a été placée environ $10\ \mu\text{m}$ au-delà du plan de cohérence, afin d'étudier le seul effet du signal parasite. Les images tomographiques obtenues avec un dispositif d'OCT plein champ conventionnel et le dispositif d'OCT plein champ à décalage de phase développé précédemment sont présentées sur la Figure IV.15.

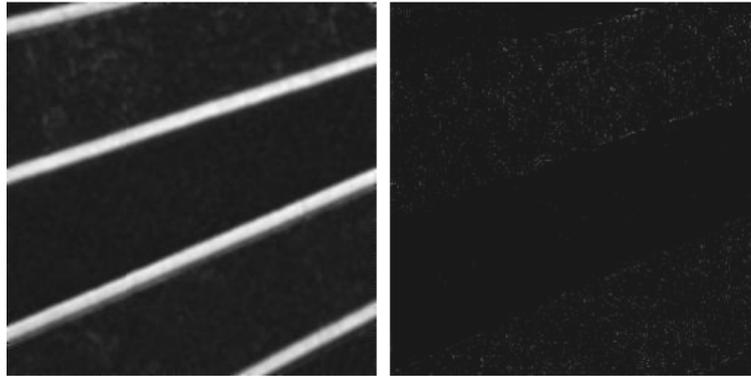


Figure IV.15 : Image tomographique obtenue par OCT plein champ conventionnelle (gauche) et à décalage de phase instantané (droite) d'une mire de microscope, placée en dehors du plan de cohérence et animée d'un mouvement transverse. Taille du champ : $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$.

Comme prévu, la comparaison entre la méthode à décalage de phase temporel (figure de gauche) et la méthode à décalage de phase instantané (figure de droite) démontre la complète suppression du signal parasite dans le second cas¹.

IV.3.2 Réduction de la perte de contraste liée au mouvement axial

En OCT conventionnelle, le mouvement de l'échantillon crée une variation de l'intensité mais également de la phase du signal interférométrique reçu par les pixels de la caméra CCD. La variation de la phase du signal durant le temps d'acquisition de chaque image interférométrique provoque une perte de contraste des franges d'interférences, un « brouillage », qui entraîne une diminution de l'intensité du signal tomographique.

Nous avons simulé numériquement l'effet d'une réduction du temps d'exposition des images interférométriques sur l'amplitude du signal tomographique, dans le cas d'un dispositif d'OCT plein champ à décalage de phase instantané. La comparaison entre un régime d'illumination impulsif possédant un temps d'exposition de 1 ms et un régime d'illumination continue, possédant un temps d'exposition limité à 5 ms par le temps d'intégration des caméras, est présentée sur la Figure IV.16. Comme attendu, la réduction du temps d'exposition par un facteur 5 a un effet considérable sur la vitesse axiale maximale tolérable. Nous avons également réalisé les mesures expérimentales de l'amplitude du signal

¹ La légère différence de niveaux qui fait tout de même apparaître la structure en bandes de la mire dans l'image tomographique acquise par la méthode à décalage de phase instantané provient d'une différence de nature de bruits entre les parties très réfléchissantes (limitées par le bruit de photons) et les parties peu réfléchissantes (limitées par le bruit électronique des caméras) de la mire.

interférométrique en fonction de la vitesse axiale de l'objet dans les deux cas (régimes impulsionnel et continu de la source d'illumination). L'objet étudié est un miroir métallique, monté sur un transducteur piézoélectrique afin de lui imposer un pur déplacement axial de vitesse ajustable. La position axiale du miroir lorsqu'aucune tension n'est appliquée sur le transducteur piézoélectrique coïncide avec le plan de focalisation de l'objectif de microscope du bras objet et un étalonnage préalable permet de relier la fréquence et l'amplitude d'oscillation du piézoélectrique à la vitesse axiale de l'objet. La Figure IV.16 présente les résultats des mesures de la perte du signal tomographique en fonction de la vitesse axiale de l'échantillon, qui sont en très bon accord avec les simulations numériques.

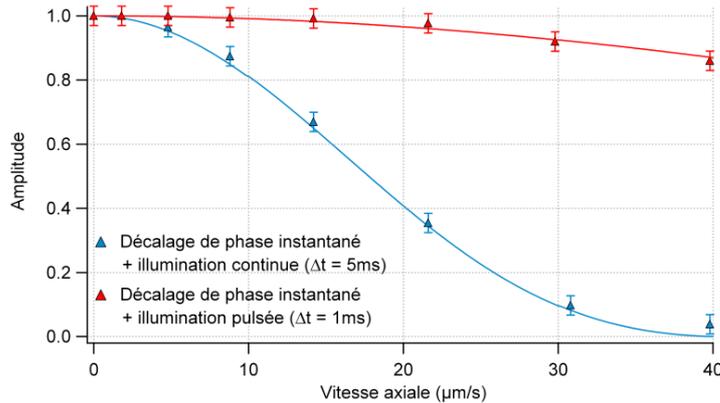


Figure IV.16 : Amplitude du signal tomographique en fonction de la vitesse axiale de l'échantillon pour un décalage de phase instantané et une illumination continue (courbe bleue) ou pulsée (courbe rouge). Les simulations numériques sont représentées par la courbe pleine, et les mesures expérimentales par les triangles.

IV.4 Exemple d'images *in vivo*

Nous allons comparer ici les images tomographiques d'un échantillon *in vivo* obtenues avec notre dispositif d'OCT plein champ à celles obtenues avec un dispositif de référence pour l'imagerie *in vivo*, un dispositif de SS-OCT (*Swept-Source OCT*) commercial.

• Principe du dispositif de SS-OCT commercial

Le dispositif SS-OCT de référence utilisé est commercialisé par Thorlabs. Il comprend une diode laser accordable en longueur d'onde (sur une largeur spectrale d'environ 120 nm). La sortie principale du laser est couplée dans un interféromètre de Michelson fibré, qui sépare le faisceau en un faisceau de référence et un faisceau objet. Dans le bras de référence de l'interféromètre, le faisceau est réfléchi dans la fibre par un miroir fixe dont la réflectivité est contrôlée par un atténuateur optique variable. Dans le bras objet, le faisceau est envoyé sur des miroirs galvanométriques afin de réaliser le balayage transverse.

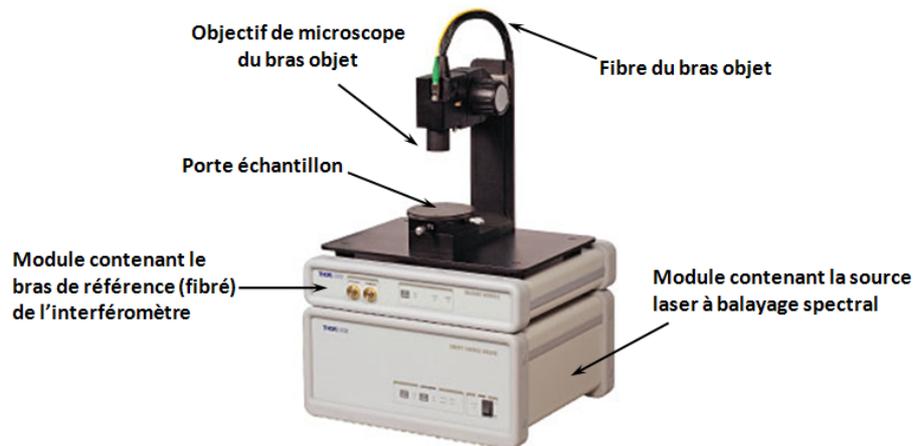


Figure IV.17 : Présentation du dispositif de SS-OCT Thorlabs.

Les performances de ce dispositif sont regroupées dans le Tableau IV.1.

Longueur d'onde centrale	1325 nm
Largeur spectrale	> 120 nm
Puissance optique moyenne	> 10 mW
Vitesse d'imagerie	25 images/s
Résolution axiale dans l'air	12 μm
Profondeur de champ axiale	3 mm
Résolution transverse dans l'air	25 μm
Taille maximale du champ transverse	10 mm
Echantillonnage 3D	1024 (X) \times 1024 (Y) \times 512 (Z)

Tableau IV.1 : Paramètres du dispositif de SS-OCT Thorlabs.

• Résultats expérimentaux

Pour démontrer la faisabilité de l'imagerie 3D *in vivo* grâce au dispositif d'OCT plein champ, nous avons étudié les structures internes d'un ongle humain, *in vivo*, à faible profondeur de pénétration ($\sim 50 \mu\text{m}$). Une goutte de sérum physiologique a été insérée entre l'ongle et l'objectif de microscope. La procédure expérimentale consistait à acquérir une pile de 100 images tomographiques, en bougeant l'échantillon par pas de $1 \mu\text{m}$ à l'aide de la platine de translation axiale motorisée. La durée d'acquisition totale pour le volume 3D de $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ a été de 2 s.

La Figure IV.18 présente les coupes tomographiques (XZ) obtenues avec les deux dispositifs, en échelle logarithmique, le noir correspondant au signal le plus faible et le blanc au signal le plus fort. La coupe tomographique obtenue avec le dispositif de SS-OCT (Figure IV.18 gauche), représentant une section de $1660 \mu\text{m} \times 690 \mu\text{m}$, laisse clairement apparaître la jonction entre l'ongle et la peau, mais avec une résolution spatiale de $12 \mu\text{m}$ (Z) par $25 \mu\text{m}$ (X). Grâce au dispositif d'OCT plein champ, nous avons pu réaliser un zoom de cette jonction (représenté par le rectangle blanc sur la coupe de gauche) avec une résolution spatiale d'imagerie environ 10 fois meilleure. Aucun artefact de mouvement n'apparaît sur cette

coupe tomographique, qui permet d'obtenir une qualité d'imagerie *in vivo* comparable à celle obtenue avec le dispositif de SS-OCT.

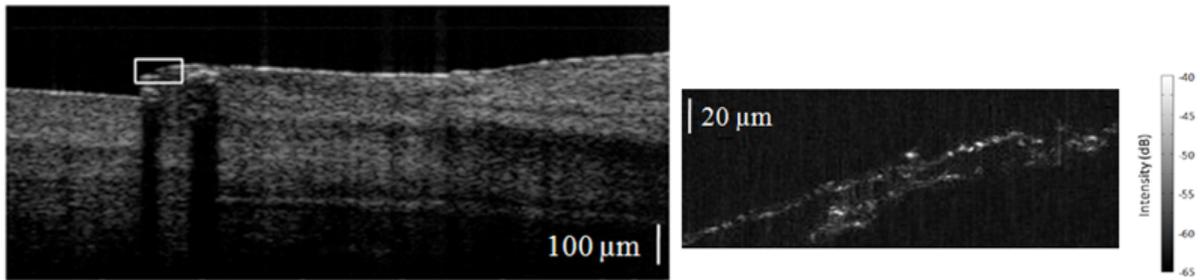


Figure IV.18 : Coupes tomographiques (XZ) d'un ongle humain *in vivo* obtenues avec le dispositif de SS-OCT de Thorlabs (droite) et notre dispositif d'OCT plein champ à 2 caméras, représentant un zoom de la coupe de gauche au niveau du rectangle blanc (droite).

IV.5 Conclusion

L'ensemble des simulations numériques et expériences effectuées a permis de valider le potentiel de notre dispositif d'OCT plein champ pour la suppression des artefacts de mouvement en OCT plein champ, tout en restant insensible à la polarisation de la lumière incidente et donc aux éventuelles propriétés de biréfringence des échantillons étudiés. Des images de haute résolution spatiale (échelle micrométrique dans les trois directions) ont ainsi pu être acquises sur un échantillon *in vivo* et comparées à celle d'un dispositif commercial de FD-OCT.

Le dispositif s'est avéré particulièrement efficace pour supprimer les artefacts de mouvement inhérents au dispositif d'OCT plein champ conventionnel, qui freinaient jusqu'à présent les applications *in vivo*.

Il serait cependant intéressant de pouvoir augmenter la sensibilité de détection de notre dispositif, en réalisant par exemple du *binning* de pixels grâce à des caméras possédant davantage de pixels (typiquement 1024×1024).

V. Couplage de l'OCT plein champ et de la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons

Dans les chapitres précédents, nous avons vu que la tomographie par cohérence optique plein champ est une technique d'imagerie permettant de produire de manière non invasive des images tomographiques de résolution micrométrique d'échantillons biologiques *ex vivo* ou *in vivo*, images dont le contraste résulte des inhomogénéités d'indice de réfraction au sein de l'échantillon. Toutefois, les différences des propriétés optiques de réflexion et rétrodiffusion entre tissus sains et tissus pathologiques sont généralement très faibles à un stade précoce de la maladie et donc très difficiles à détecter. C'est pourquoi l'OCT n'est pas à ce jour une technique de diagnostic qui se suffit à elle-même. Pour surmonter ce problème et améliorer le contraste des images, de nombreuses extensions ont été proposées. Citons entre autres :

- *OCT Doppler*, dispositif couplant OCT et vélocimétrie laser : cette technique permet d'obtenir simultanément les informations structurales de l'échantillon par OCT et une mesure du flux sanguin [22].

- *OCT spectroscopique* (SOCT), dispositif combinant OCT et analyse spectroscopique : cette technique permet d'obtenir les spectres d'absorption et/ou de diffusion des tissus [72].

- *OCT en lumière polarisée* (PS-OCT), dispositif utilisant l'état de polarisation de la lumière rétrodiffusée par l'échantillon pour extraire des informations sur la biréfringence [29-31].

- OCT couplée à une *technique pompe-sonde*, permettant une imagerie moléculaire spécifique [104].

Des *microsphères* contenant des agents de contraste exogènes ont été utilisées en OCT afin d'exalter les propriétés optiques d'absorption et de diffusion des tissus dans certaines zones spécifiques de l'échantillon [105]. Cependant, la plupart de ces techniques permettant d'ajouter un contraste spécifique (technique pompe-sonde, microsphères...) nécessitent l'utilisation d'agents exogènes, qui peuvent modifier les propriétés des tissus, voire les dégrader. Une alternative à l'utilisation d'agents de contraste exogènes est d'exploiter la réponse non-linéaire des tissus à une excitation lumineuse. De nombreuses techniques d'imagerie exploitant cette réponse non linéaire des tissus ont ainsi été développées : on parle alors de microscopie multi-photonique. Citons par exemple :

- la *microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons*, qui repose sur l'excitation non linéaire de molécules fluorescentes. Certaines structures biologiques, telles que le nicotinamide, l'adénine, les flavines ou l'élastine, présentent de l'auto-fluorescence sous excitation à deux photons et sont donc révélées spécifiquement.

- la *microscopie de second harmonique*, pour laquelle deux photons d'un faisceau exciteur infrarouge interagissent simultanément avec le milieu pour produire un unique photon à une fréquence double. Seules les structures non centro-symétriques peuvent générer un signal

de second harmonique au sein de l'échantillon. La microscopie de second harmonique permet donc d'obtenir une information sur l'organisation des structures au sein d'un échantillon.

- la *microscopie de troisième harmonique*, pour laquelle trois photons d'un faisceau exciteur infrarouge interagissent simultanément avec le milieu pour produire un unique photon à une fréquence triple. Cette technique de microscopie permet d'ajouter un contraste supplémentaire (par exemple, un signal de troisième harmonique autour de cellules indique la présence d'eau), qui se combine très facilement aux deux techniques précédentes [106].

Dans ce chapitre, nous proposons de coupler l'OCT plein champ à une technique de microscopie multi-photonique, la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons, afin d'ajouter un nouveau contraste à notre technique d'imagerie. Nous présenterons tout d'abord le principe de la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons, ainsi que la mise en place expérimentale et la caractérisation d'un tel microscope. Nous couplerons ensuite les deux dispositifs d'imagerie et nous testerons le système complet sur différents échantillons.

V.1 Microscopie de fluorescence sous excitation à 2 photons

V.1.1 Le processus d'émission de fluorescence

Historiquement, le terme de fluorescence a été introduit pour la première fois par G. G. Stokes au début du 19^{ème} siècle, dans le cadre d'une étude sur les processus de désexcitation d'une molécule.

Nous décrirons dans ce paragraphe le principe et les caractéristiques du processus d'émission de fluorescence.

• Le processus de photoluminescence

La *photoluminescence* est l'émission de photons par une molécule suite à son excitation par absorption d'un faisceau lumineux. La photoluminescence englobe deux processus : la *fluorescence* et la *phosphorescence*. Ces deux processus se distinguent par la nature des états fondamentaux et excités de la molécule émettrice.

Le diagramme de Jablonski, représenté sur la Figure V.1, illustre l'absorption et l'émission de photons par une molécule. L'excitation de la plupart des molécules en solution s'effectue par absorption de photons dans une gamme de longueur d'onde s'échelonnant du proche infrarouge à l'ultraviolet, amenant la molécule dans un état d'énergie excité supérieur (S_1 ou S_2). A température ambiante, la molécule retombe rapidement vers l'état vibrationnel le plus bas, à savoir S_1 , par un processus de *conversion interne*. La fluorescence est alors l'émission de photons résultant de la transition de l'état excité singulet S_1 vers l'état fondamental singulet S_0 . La molécule est dans ce cas appelé *fluorophore*. La durée de vie de l'état excité singulet S_1 du fluorophore varie de quelques dizaines de picosecondes à quelques nanosecondes. Dans le cas de la phosphorescence, la molécule passe vers un état triplet par une transition non radiative (conversion interne) puis la transition donnant lieu à l'émission de phosphorescence s'effectue entre deux états de multiplicité de spin différente (notamment de l'état excité triplet T_1 vers l'état fondamental singulet S_0). La durée de vie de

la phosphorescence varie typiquement de quelques centaines de microsecondes à quelques secondes.

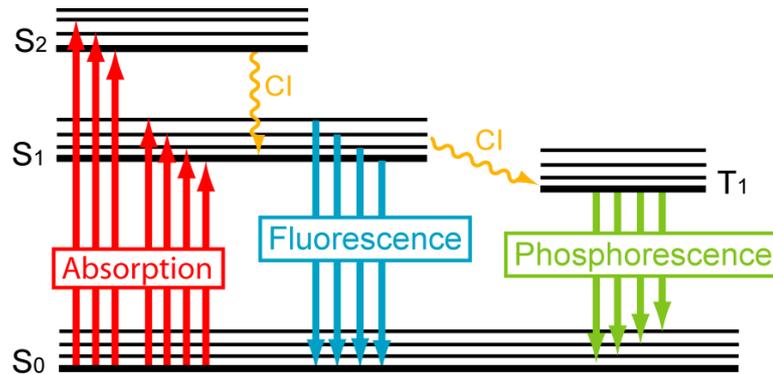


Figure V.1 : Diagramme de Jablonski.

S_0 , S_1 , S_2 et T_1 désignent respectivement l'état fondamental singulet, le premier et le deuxième état excité singulet et le premier état excité triplet, pour lesquels plusieurs états vibrationnels peuvent exister. CI : conversion interne.

• Caractéristiques des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence sont caractéristiques de la structure énergétique et des probabilités de transition entre les différents niveaux énergétiques de la molécule. Chaque fluorophore peut ainsi être défini par des spectres d'absorption et d'émission qui lui sont propres.

Les conversions internes qui se produisent au cours des processus de photoluminescence sont à l'origine de la perte d'énergie entre les photons d'excitation et les photons d'émission. C'est pourquoi la longueur centrale d'émission est toujours supérieure à la longueur d'onde d'absorption : ce phénomène est appelé *déplacement de Stokes* (cf. Figure V.2). Le déplacement de Stokes est une caractéristique importante en imagerie biologique : si ce déplacement est faible, il sera difficile de séparer optiquement les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence et une détection efficace du signal sera alors délicate. En effet, expérimentalement, on utilise des miroirs dichroïques pour séparer l'émission de fluorescence de l'excitation résiduelle, mais ces miroirs ne permettent de séparer efficacement que des longueurs d'onde au moins distantes d'une vingtaine de nanomètres. De plus, pour un faible déplacement de Stokes, le recouvrement entre les deux spectres est important et il peut y avoir réabsorption des photons de fluorescence et donc une distorsion du spectre d'émission de fluorescence.

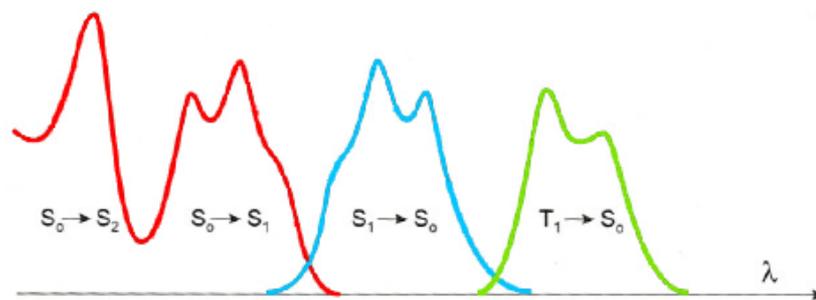


Figure V.2 : Spectres d'absorption (rouge), d'émission de fluorescence (bleu) et de phosphorescence (vert) d'une molécule, illustrant le phénomène de déplacement de Stokes.

Il est à noter cependant que les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence sont caractéristiques d'une molécule mais dépendent aussi fortement de l'environnement local de la molécule (pH, température, présence ou non d'un potentiel électrique, d'oxygène, interactions intermoléculaires...).

Certains fluorophores sont ainsi connus pour leur affinité spécifique ou pour leur réaction à un état physico-chimique de l'environnement. Ces fluorophores sont grandement utilisés en biologie pour l'étude des structures et la compréhension des métabolismes cellulaires.

• Grandeurs caractéristiques de l'émission de fluorescence

Les grandeurs caractéristiques de l'émission de fluorescence sont, outre les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence du fluorophore dans son environnement, le *temps de déclin de fluorescence*, le *rendement quantique* et le *coefficient d'extinction molaire*.

Le *temps de déclin* τ_f , ou *durée de vie de fluorescence*, correspond à la durée de vie de l'état excité S_1 . Le *rendement quantique* Q représente quant à lui l'efficacité de l'émission de fluorescence. Il est défini comme la proportion entre le nombre de photons de fluorescence émis sur le nombre de photons incidents absorbés. Ce rendement quantique sera compris entre 0 et 1.

Considérons un fluorophore dans l'état excité singulet S_1 suite à l'absorption d'un photon incident. Ce fluorophore peut retourner à l'état fondamental par émission de fluorescence $S_0 \rightarrow S_1$, processus caractérisé par une constante de réaction k_0 (temps caractéristiques 10^{-10} à 10^{-7} s), ou par un certain nombre de processus non radiatifs (conversion interne, conversion intersystème), caractérisés par une constante de réaction k_{nr} (temps caractéristiques 10^{-11} à 10^{-8} s). La durée de vie de fluorescence et le rendement quantique sont alors donnés par les relations suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l} \tau_f = \frac{1}{k_0 + k_{nr}} \\ Q = \frac{k_0}{k_0 + k_{nr}} = \frac{\tau_f}{\tau_r} \end{array} \right. \quad (V.1)$$

où τ_r est la durée de vie radiative de l'état excité.

La dernière grandeur caractéristique, le *coefficient d'extinction molaire* ε , reflète la probabilité pour une molécule d'absorber un photon de longueur d'onde donnée. Sa valeur peut constituer un critère pour le choix des fluorophores car plus ε est élevée, plus l'émission de fluorescence sera importante à intensité d'excitation incidente égale.

• Problèmes rencontrés lors de l'excitation de fluorescence

De nombreux problèmes de photo-dégradation peuvent être rencontrés lors de l'excitation de fluorophores. Les plus importants d'entre eux sont le photo-blanchiment, la saturation de l'absorption et les effets thermiques.

Suite à leur excitation, les molécules ont tendance à être plus réactives d'un point de vue chimique que dans leur état fondamental [107]. Des réactions irréversibles (polymérisation, oxydation, dissociation, isomérisation...) peuvent alors se produire et donner naissance à des photo-produits, souvent non fluorescents ou caractérisés par des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence très différents de la molécule initiale. Ces réactions photochimiques collectives se traduisent donc par une perte progressive de l'intensité de fluorescence émise par l'échantillon : c'est le processus de *photo-blanchiment*.

Un autre problème rencontré lors de l'excitation des fluorophores est la *saturation* de l'état excité. Ce processus n'est pas destructif pour les molécules étudiées mais peut conduire à des interprétations erronées puisque l'intensité de fluorescence ne varie plus linéairement avec l'intensité incidente.

Enfin, l'excitation des molécules par un rayonnement intense est à l'origine d'*effets thermiques*, générés lors des différents processus de conversion interne. Ils ont évidemment un effet destructif sur la molécule et son environnement.

L'excitation de la fluorescence des molécules peut donc conduire à une dégradation progressive des fluorophores et de leur environnement. Ces processus de photo-dégradation dépendent des densités d'énergie incidente et de la durée d'irradiation mais aussi des fluorophores utilisés. Les conditions d'excitation de la fluorescence sont donc à déterminer précisément pour limiter au maximum ces effets.

V.1.2 Emission de fluorescence sous excitation à deux photons

Les ondes électromagnétiques interagissant avec la matière induisent une polarisation :

$$P = \chi^{(1)}E + \chi^{(2)}EE + \chi^{(3)}EEE + \dots \quad (\text{V.2})$$

où $\chi^{(1)}$ est la susceptibilité linéaire du milieu, $\chi^{(2)}$ et $\chi^{(3)}$ respectivement les susceptibilités non linéaires du deuxième et troisième ordre et E le champ électrique incident sur le milieu.

En 1931, Göpper-Mayer démontra que la susceptibilité non linéaire du troisième ordre était le premier terme non linéaire capable de produire des combinaisons de fréquences correspondant à des transitions moléculaires [108]. C'est la partie imaginaire de la susceptibilité non linéaire d'ordre 3 qui est ainsi à l'origine du processus d'absorption à deux photons¹ (la partie réelle de la susceptibilité non linéaire d'ordre 3 est quant à elle responsable de la génération de troisième harmonique et de l'effet Kerr optique).

Le processus d'absorption à deux photons se traduit par l'absorption *simultanée* de deux photons d'énergie $h\nu_1$ et $h\nu_2$, via un niveau virtuel. La somme des énergies $h(\nu_1 + \nu_2)$ devant évidemment être supérieure ou égale à l'énergie de transition $h\nu_s$ dans la bande d'absorption (cf. Figure V.3).

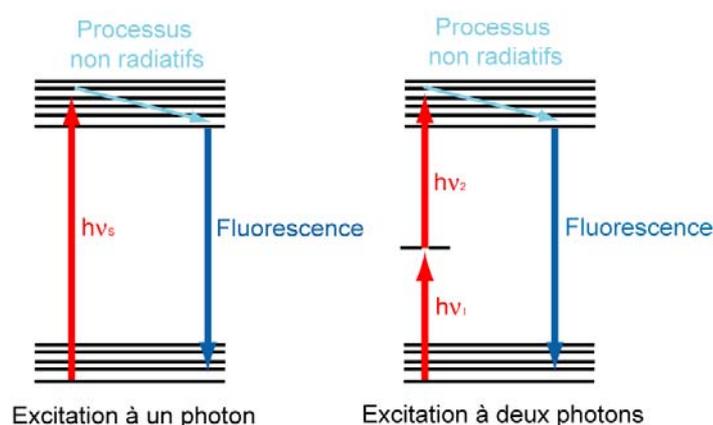


Figure V.3 : Emission de fluorescence sous excitation à un et deux photons.

¹ Notons que des transitions multi-photoniques mettant en jeu des susceptibilités non linéaires d'ordres plus élevés sont également possibles, mais les probabilités de transition sont dans ces cas extrêmement faibles : section efficace d'absorption à trois photons typiquement de l'ordre de 10^{-83} $\text{cm}^4 \cdot \text{s} / \text{molécule} / \text{photon}$.

Dans le cas d'une excitation à deux photons (EDP), il a été démontré que le nombre de photons absorbés par les fluorophores par unité de temps et de volume varie quadratiquement avec l'intensité incidente sur l'échantillon [109], selon la relation suivante :

$$N_{abs} = \sigma_a C F^2 \quad (V.3)$$

où σ_a est la section efficace d'absorption à deux photons des fluorophores (en $\text{cm}^4 \cdot \text{s} / \text{molécule} / \text{photon}$), C la concentration en fluorophores (en $\text{molécule} / \text{cm}^3$) et F le flux de photons incidents (en $\text{photons} / \text{cm}^2 / \text{s}$).

Les sections efficaces d'absorption à deux photons sont généralement très faibles, de l'ordre de $10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} / \text{molécule} / \text{photon}$ [110]. Par conséquent, au regard de l'équation (V.3), le flux de photons incidents doit être élevé afin d'obtenir une bonne efficacité d'excitation de fluorescence. L'utilisation de sources lasers continues n'est donc pas optimale pour ce genre d'expériences, pour lesquelles l'utilisation de sources lasers impulsionnelles (femtosecondes ou picosecondes) sera préférée.

Le flux de photons de fluorescence sous EDP émis (en $\text{photons} / \text{cm}^2 \cdot \text{s}$) est donné par :

$$F_l = C \frac{Q}{2} \sigma_a d F^2 = \frac{Q}{2} d N_{abs} \quad (V.4)$$

où Q est le rendement quantique de fluorescence et d la distance sur laquelle l'échantillon absorbe (en cm).

V.1.3 La microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons

La possibilité de transitions à deux photons, démontrée théoriquement dès 1931, n'a pu être vérifiée expérimentalement qu'en 1961, suite à l'apparition des premières sources lasers impulsionnelles [111]. Le rendement de fluorescence sous EDP, comme tout autre phénomène non-linéaire, dépend en effet fortement de la densité de photons incidents sur l'échantillon (équation V.3). L'obtention de fluorescence sous EDP nécessite donc une concentration de l'énergie incidente dans les domaines temporel et spatial, condition satisfaite par les sources lasers impulsionnelles. Et ce n'est que dans les années 90, avec l'apparition des premiers lasers femtosecondes à base de saphir dopé au titane, que l'on associe l'EDP avec la microscopie de fluorescence, ce qui révolutionna l'étude des milieux biologiques par imagerie de fluorescence [112].

Le principe de la microscopie de fluorescence sous EDP est très similaire à celui de la microscopie de fluorescence confocale. Le laser visible ou proche UV du microscope confocal de fluorescence est remplacé par un laser impulsionnel femtoseconde émettant dans le proche infrarouge (gamme de longueurs d'onde peu absorbées par la plupart des composants biologiques, ce qui permet d'optimiser la profondeur de pénétration dans le milieu tout en limitant les phénomènes de photo-dégradation) et la fluorescence émise est séparée de l'excitation résiduelle à l'aide d'un miroir dichroïque. De plus, aucun trou de filtrage n'est ici nécessaire. En effet, du fait des faibles probabilités de transition à deux photons, seuls les fluorophores situés au voisinage du point focal de l'objectif, lieu où la densité de photons est la plus importante, seront excités. L'émission de fluorescence est donc naturellement confinée au voisinage du point focal (cf. Figure V.4).

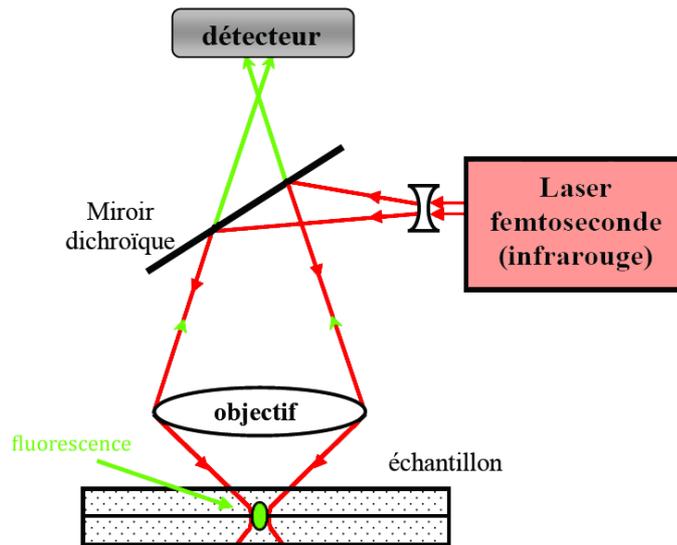


Figure V.4 : Schéma de principe du microscope de fluorescence sous excitation à deux photons.

La localisation de l'émission de fluorescence sous EDP au voisinage du point de focalisation est illustrée sur la Figure V.5. Dans le cas d'une excitation mono-photonique, l'émission de fluorescence a lieu sur la totalité du faisceau laser alors que dans le cas d'une excitation bi-photonique, l'émission de fluorescence est confinée au voisinage du point de focalisation.

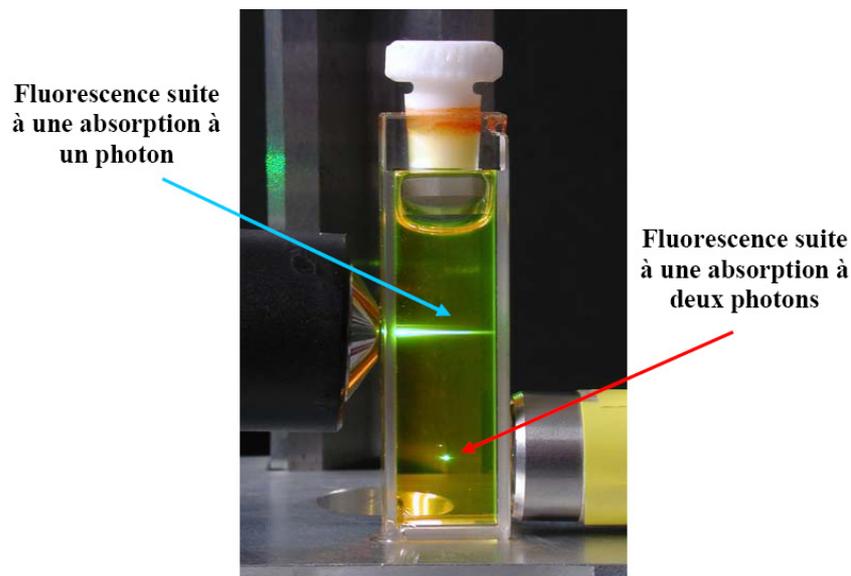


Figure V.5 : Illustration du confinement naturel de l'émission de fluorescence sous excitation à deux photons. L'échantillon est une solution de fluorescéine, excitée à un photon par une lampe à vapeur de mercure et à deux photons par un laser Ti-Saphir femtoseconde.

V.1.4 Intérêt pour l'étude des milieux biologiques

La microscopie de fluorescence sous EDP est une technique d'imagerie relativement simple à mettre en œuvre, qui possède de plus de nombreux intérêts que nous développons dans ce paragraphe.

• Résolution spatiale

La propriété fondamentale du microscope de fluorescence sous EDP est sa grande résolution spatiale selon les trois directions, puisque l'excitation utile est confinée au voisinage du point de focalisation de l'objectif de microscope.

Selon la direction axiale, l'émission de fluorescence sous EDP n'aura donc lieu que sur une distance d_z égale à la longueur de Rayleigh du faisceau laser focalisé par l'objectif de microscope, longueur inversement proportionnelle au carré de l'ouverture numérique ON de l'objectif [113] :

$$d_z = 1,169 \frac{n\lambda}{ON^2} \quad (V.5)$$

où λ est la longueur d'onde centrale d'excitation et n est l'indice de réfraction de l'échantillon étudié.

Selon la direction transverse, la résolution transverse est limitée par la taille minimale de la tache de focalisation, *i.e.* le diamètre de la tache d'Airy ϕ_{Airy} du système :

$$d_x = d_y = \frac{\phi_{Airy}}{2} = 0,61 \frac{\lambda}{ON} \quad (V.6)$$

Le volume d'excitation total V est alors donné par :

$$V = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{3/2} d_x d_y d_z = 0,856 \frac{n\lambda^3}{ON^4} \quad (V.7)$$

Nous avons calculé les résolutions axiale et transverse accessibles théoriquement pour les différents objectifs de microscope à notre disposition (objectif à immersion dans l'eau, $n = 1,33$). Ces résultats sont regroupés dans le Tableau V.1.

ON	d_z (μm)	d_x (μm)	V (μm^3)
0,3	13,8	1,6	69,5
0,5	5,0	1,0	9,8
0,8	1,9	0,6	1,3

Tableau V.1 : Résolutions axiale et transverse et volume d'excitation théoriques accessibles avec différents objectifs de microscope à immersion dans l'eau.

• Longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence facilement séparables

La longueur d'onde d'émission de fluorescence suite à un processus d'excitation bi-photonique est souvent assez proche de la moitié de la longueur d'onde d'excitation (aux conversions internes près). Optiquement, il est donc très facile de séparer le signal d'émission de fluorescence du signal d'excitation résiduelle, par exemple à l'aide de miroirs dichroïques. De plus, cette propriété permet de s'affranchir du bruit qui provient de la lumière diffusée par l'échantillon, puisque cette diffusion a lieu à la longueur d'onde d'excitation.

• Peu de bruit de fond

Le principal avantage de la microscopie de fluorescence sous EDP est le confinement de l'excitation au voisinage du foyer de l'objectif de microscope, ce qui permet notamment de détecter la fluorescence émise avec très peu de bruit de fond, puisque aucun signal parasite à

la longueur d'onde de fluorescence ne provient des plans inférieurs ou supérieurs au plan focal.

- **Profondeur de pénétration**

Les coefficients d'absorption et de diffusion de la plupart des composants biologiques sont plus faibles dans l'infrarouge que dans le visible ou l'ultraviolet. En microscopie de fluorescence sous EDP, l'excitation par un laser infrarouge implique donc une meilleure profondeur de pénétration au sein des échantillons biologiques [114, 115].

- **Limitation des problèmes de photo-dégradation**

En microscopie de fluorescence sous EDP, l'excitation est confinée au voisinage du point focal de l'objectif. Par conséquent, tous les problèmes rencontrés lors de l'excitation de fluorophores (photo-blanchiment, saturation de l'absorption, effets thermiques...) seront limités au volume de focalisation (de l'ordre de quelques μm^3). Cependant, les très fortes densités de puissance utilisées en régime femtoseconde à haute cadence (puissance crête typique de l'ordre du TW/cm^2) peuvent être plus destructives localement. Il y a donc des conditions d'excitation à respecter. Ces conditions sont difficiles à estimer, puisqu'elles dépendent de nombreux paramètres tels que la concentration et le type de fluorophore utilisé, la longueur d'onde d'excitation, le type d'échantillon étudié, et demeurent aujourd'hui encore un vaste domaine de recherche. Des études ont ainsi démontré que la puissance moyenne des faisceaux lasers excitateurs au niveau de l'échantillon ne doit pas dépasser quelques mW pour éviter tous phénomènes de saturation ou dégradation thermique [116, 117]. Selon une étude récente, il apparaît qu'à faible intensité d'excitation, les taux de photo-blanchiment suite à des excitations mono et bi-photoniques sont comparables [118]. Néanmoins, en microscopie de fluorescence sous excitation mono-photonique, l'excitation induit des effets de photo-blanchiment sur la quasi-totalité du trajet du faisceau. Une dégradation progressive de l'échantillon lors d'acquisition dans des plans focaux successifs est ainsi induite, dégradant la qualité et la fiabilité des images obtenues.

V.2 Dispositif expérimental de microscopie de fluorescence sous excitation à 2 photons

V.2.1 Etude de la source lumineuse

Comme nous l'avons vu précédemment, le rendement de fluorescence par excitation à deux photons, comme tout autre phénomène non-linéaire, dépend fortement de la densité de photons incidents sur l'échantillon. L'obtention de fluorescence sous EDP nécessite donc une concentration de l'énergie incidente dans les domaines temporel et spatial, condition satisfaite par les sources lasers impulsives femtosecondes.

Le laser à Saphir dopé au titane est une source lumineuse de choix pour ce genre d'applications [119, 120]. En effet, ce laser est à ce jour la seule source capable de générer des impulsions de durée inférieure à 100 fs, à une fréquence de répétition élevée (~ 100 MHz) et accordable de 690 à 1000 nm [121]. Cette large plage d'accordabilité permet l'excitation d'un grand nombre de fluorophores. Nous avons utilisé deux lasers à saphir dopé

au titane commerciaux au cours des expériences de microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons : le modèle MIRA 900-F de Coherent .

Dans ce paragraphe, nous présentons le principe de fonctionnement de ce laser, ainsi que les caractéristiques expérimentales du MIRA-900-F.

• Principe de fonctionnement

Le principe d'incertitude de Heisenberg stipule que la durée Δt des impulsions d'un laser est inversement proportionnelle à la largeur du spectre en fréquence $\Delta \nu$ de ces impulsions :

$$\Delta t \Delta \nu \geq 1 \quad (\text{V.8})$$

La génération d'impulsions ultra-brèves nécessite donc l'utilisation de matériaux possédant un large spectre d'émission de fluorescence. Ainsi, le cristal de saphir dopé au titane (TiAl_2O_3) est caractérisé par une large bande de fluorescence, entre 650 et 1100 nm, avec un maximum d'émission à 750 nm, comme présenté sur la Figure V.6 [93].

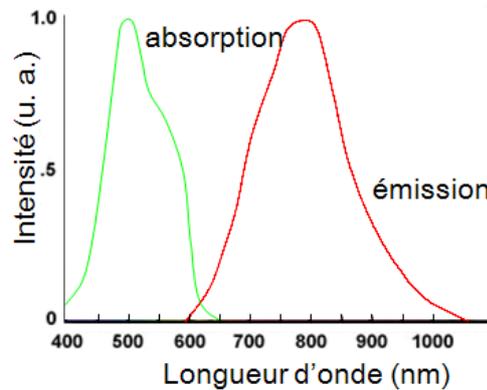


Figure V.6 : Spectre d'absorption et d'émission du cristal de saphir dopé au titane

Le schéma de principe du fonctionnement de l'oscillateur laser femtoseconde à saphir dopé au titane est présenté sur la Figure V.7.

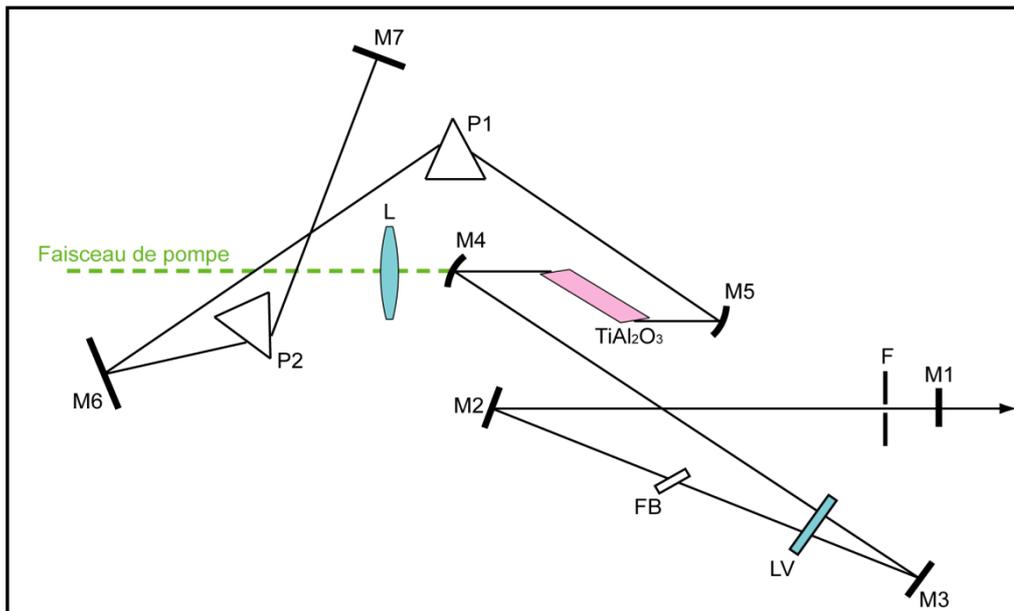


Figure V.7 : Schéma de principe de l'oscillateur laser femtoseconde à saphir dopé au titane. *M* miroirs, *F* fente, *FB* filtre biréfringent, *LV* lame de verre vibrante, TiAl_2O_3 cristal de saphir dopé au titane, *L* lentille convergente de focalisation du faisceau de pompe, *P* prismes

Le milieu à gain de l'oscillateur laser est un cristal de saphir dopé au titane. L'inversion de population nécessaire à l'effet laser est réalisée en pompant ce cristal dans sa bande d'absorption par un laser tout solide pompé par diode, continu à 532 nm et de puissance nominale 6W (modèle Millennia Pro de Spectra Physics), focalisé sur le cristal à l'aide d'une lentille convergente L. L'utilisation d'un laser de pompe solide présente de nombreux intérêts par rapport au pompage par laser à argon : source compacte, stable et nécessitant peu d'entretien.

La production des impulsions femtosecondes est basée sur le verrouillage de modes passifs par effet Kerr [121]. L'effet Kerr est un effet d'optique non-linéaire du troisième ordre qui se produit lorsqu'une onde électromagnétique se propage dans un milieu non linéaire. Cette onde d'intensité I induit une variation de l'indice de réfraction du milieu :

$$n = n_0 + n_2 I \quad (\text{V.9})$$

où n_0 est l'indice linéaire du milieu et n_2 est l'indice non linéaire du milieu.

Suite à cette variation d'indice, le cristal se comporte comme une lentille convergente (car l'indice non-linéaire du cristal de saphir dopé au titane est positif) qui focalise le faisceau laser : c'est le phénomène d'auto-focalisation de la lumière. Dans le cas du cristal de saphir dopé au titane, l'indice linéaire vaut $n_0 = 1,76$ alors que l'indice non linéaire est de l'ordre de $n_2 = 10^{-12} \text{ m}^2/\text{W}$. L'effet Kerr n'est donc significatif que pour des hautes densités d'énergie. C'est pourquoi l'auto-focalisation de la lumière se produit pour le régime impulsionnel (densité de puissance crête élevée dans la cavité) mais pas pour le régime continu. En sortie du cristal, la section du faisceau laser est donc plus grande pour le régime continu que pour le régime impulsionnel (cf. Figure V.8). Une fente dans la cavité laser, dont l'ouverture est plus grande que la section du faisceau impulsionnel mais plus petite que celle du faisceau continu, introduit alors des pertes plus importantes pour le régime continu, ce qui favorise le fonctionnement en régime impulsionnel.

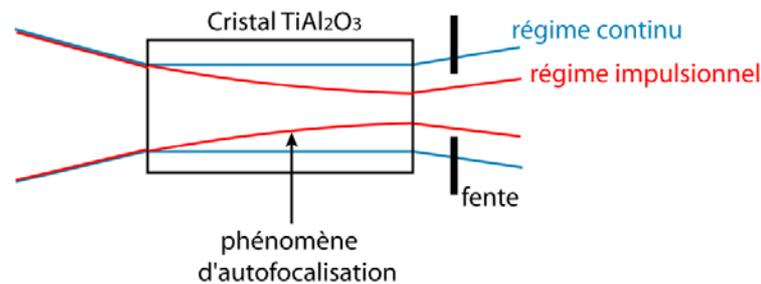


Figure V.8 : Principe du verrouillage de modes passifs par effet Kerr.

Cependant, un oscillateur Ti:Saphir est stable en régime continu et les non-linéarités du cristal ne sont pas suffisantes pour démarrer le verrouillage de modes par effet Kerr. Un dispositif d'amorçage du régime impulsionnel est donc nécessaire. On utilise pour cela une lame de verre (LV) montée sur un galvanomètre. L'oscillation de la lame induit des variations rapides de la longueur de la cavité laser, qui permettent au régime impulsionnel de s'imposer.

Par ailleurs, lorsqu'une impulsion laser traverse un milieu, ses différentes composantes spectrales ne sont pas sensibles au même indice de réfraction, donc se propagent à des vitesses différentes. C'est le phénomène de dispersion de la vitesse de groupe (cf. encadré Dispersion de la vitesse de groupe). Les différents composants optiques de la cavité laser, en particulier le cristal de saphir dopé au titane, introduisent ainsi une dispersion de la vitesse

de groupe positive, conduisant à un élargissement temporel des impulsions. Pour obtenir les impulsions les plus courtes possibles, il faut donc compenser cette dispersion de la vitesse de groupe. La technique utilisée dans notre cavité laser est un système de deux prismes identiques, P1 et P2, utilisés en aller-retour, ce qui revient à considérer un système de quatre prismes identiques (cf. Figure V.9). Si l'impulsion laser a subi une dispersion de la vitesse de groupe positive, les longueurs d'onde les plus courtes (λ_b) sont donc en retard par rapport aux longueurs d'onde les plus grandes (λ_r). A l'aller, le prisme P1 a pour rôle de disperser angulairement les différentes composantes spectrales de l'impulsion laser. Comme les longueurs d'onde les plus courtes sont plus déviées par P1, elles traversent ensuite une épaisseur de verre plus faible dans P2, de telle sorte que leur chemin optique est plus court. Elles rattrapent donc en partie le retard qu'elles avaient accumulé par rapport aux longueurs d'onde les plus grandes. Le retour permet de doubler cet effet et donc de compenser des dispersions de vitesse de groupe plus importantes. Ainsi, en translatant un prisme par rapport à l'autre, on peut compenser la dispersion de la vitesse de groupe introduite par les composants optiques de la cavité, et donc contrôler la largeur temporelle de l'impulsion.

Notons que ce système ne permet de compenser que des effets de dispersion positive d'ordre 2. Ce système a cependant l'avantage d'être très efficace par rapport aux autres systèmes existants (réseaux, miroirs chirpés, Dazzler...).

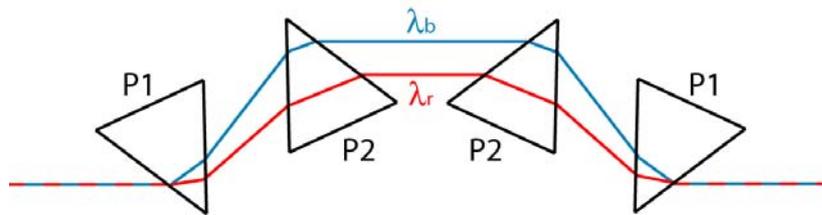


Figure V.9 : Principe du système de quatre prismes, ou deux prismes en aller-retour, utilisé pour compenser la dispersion de la vitesse de groupe positive

Enfin, un filtre biréfringent, ou filtre de Lyot, est présent dans la cavité laser. Sa rotation permet une accordabilité en longueur d'onde entre 690 et 1000 nm.

A propos du filtre biréfringent de Lyot ...

Le filtre biréfringent de Lyot est un filtre monochromatique polarisant qui doit son nom au physicien français Bernard LYOT (1897 – 1952), qui voulait isoler les raies du spectre de la basse atmosphère du soleil et en étudier ainsi la structure.



Le principe du filtre de Lyot est basé sur l'interférence entre les ondes ordinaire et extraordinaire à la sortie d'un cristal biréfringent (typiquement du spath). Il est constitué de plusieurs étages, comportant chacun un cristal de spath entre deux polariseurs linéaires, les axes du cristal étant à 45° des axes des polariseurs. Chaque étage donne ainsi naissance à un spectre cannelé. Si l'épaisseur du cristal de chaque étage est double de la précédente, une cannelure sur deux s'éteint. Un nombre suffisant d'étages permet ainsi d'obtenir un filtre très sélectif spectralement.



Dispersion de la vitesse de groupe

Considérons une impulsion de forme gaussienne :

$$E(t) = E_0 \exp\left(-2\ln 2 \frac{t^2}{\Delta t^2}\right) \exp(i\omega_0 t)$$

où Δt est la largeur à mi-hauteur du profil temporel en intensité de l'impulsion et ω_0 est la pulsation centrale de son spectre

Par transformée de Fourier, on détermine la répartition spectrale du champ électrique :

$$\tilde{E}(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} E(t) \exp(-i\omega t) dt = \frac{E_0 \Delta t}{\sqrt{8\ln 2}} \exp\left(-\frac{(\omega - \omega_0)^2 \Delta t^2}{8\ln 2}\right)$$

Lorsqu'une impulsion traverse un milieu isotrope et transparent, elle subit un déphasage $\varphi(\omega)$, dont on peut faire un développement de Taylor autour de la pulsation centrale :

$$\varphi(\omega) = \varphi_0 + (\omega - \omega_0) \frac{\partial \varphi}{\partial \omega} + \frac{(\omega - \omega_0)^2}{2} \frac{\partial^2 \varphi}{\partial \omega^2}$$

où $\varphi_0 = \varphi(\omega_0)$ et φ'' correspond à la dispersion de la vitesse de groupe

Le champ électrique à la sortie du milieu s'écrit en fonction du champ à l'entrée :

$$E_S(t) = \frac{E_0}{|\sqrt{1 - i2a\varphi''}|} \left[\exp i(\omega_0 t' + \varphi_0) \exp\left(-\frac{at'^2}{1 + 4a^2\varphi''^2}\right) \exp\left(-i\frac{2a^2\varphi''t'^2}{1 + 4a^2\varphi''^2}\right) \right]$$

$$\text{où } t' = t + \varphi' \text{ et } a = \frac{2\ln 2}{\Delta t^2}$$

$$\text{soit } E_S(t) = E_{0S} \exp\left(-2\ln 2 \frac{t'^2}{\Delta t_S^2}\right) \exp[i(\omega_0 t' + \varphi_S(t))]$$

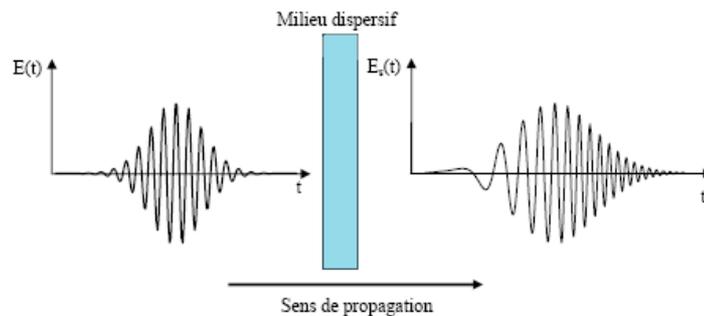
$$\text{où } \varphi_S(t) = \varphi_0 - \frac{2a^2\varphi''t'^2}{1 + 4a^2\varphi''^2} \text{ et } \Delta t_S = 2\ln 2 \sqrt{1 + 4a\varphi''^2}$$

La dispersion de la vitesse de groupe φ'' introduit donc un élargissement du profil temporel d'un facteur :

$$\frac{\Delta t_S}{\Delta t} = \sqrt{1 + \frac{\varphi''^2}{4\Delta t^4} (8\ln 2)^2}$$

Cet élargissement s'accompagne d'une dérive de fréquence, appelée chirp, le long du profil temporel de l'impulsion :

$$\omega(t) = \frac{\partial \varphi_S}{\partial \omega} = \omega_0 - \frac{4a^2\varphi''t'}{1 + 4a^2\varphi''^2}$$



Après optimisation des différents réglages de la cavité, le laser à saphir dopé au titane génère des impulsions de puissance moyenne d'environ 1 W à un taux de répétition de 77 MHz, c'est-à-dire une énergie par impulsion d'environ 13 nJ.

• Mesure de la durée des impulsions : auto-corrélation optique

Nous avons cherché à mesurer la durée des impulsions laser, qui doit être de l'ordre de 100 fs. La mesure de la durée de telles impulsions ne peut se faire directement, puisque les systèmes électroniques actuels ne sont pas suffisamment rapides (par exemple, les photodiodes les plus performantes ont des temps de réponse de l'ordre de la picoseconde et les caméras à balayage de fente de quelques centaines de femtosecondes). Il est par conséquent nécessaire de réaliser une mesure indirecte de la durée des impulsions laser, par exemple en transformant l'information temporelle en information spatiale, plus facile à enregistrer. La méthode utilisée ici est la plus facile à mettre en œuvre : l'auto-corrélation optique par génération du second harmonique non colinéaire.

Le schéma de principe de l'auto-corrélateur optique par génération de second harmonique non colinéaire, constitué d'un interféromètre de Michelson dont les miroirs ont été remplacés par des coins de cube, est présenté sur la Figure V.10.

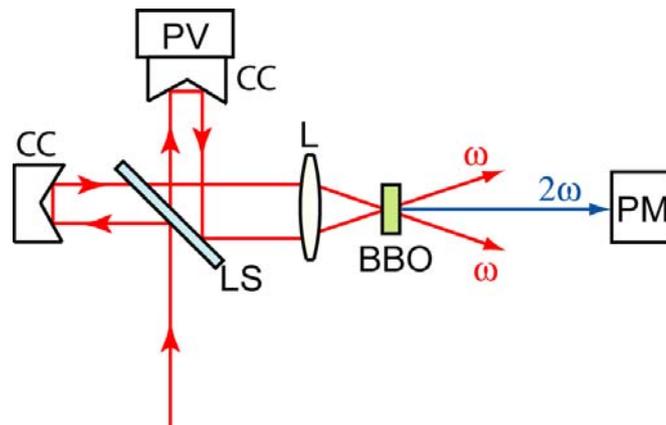


Figure V.10 : Principe d'un auto-corrélateur optique. LS : lame séparatrice, CC : coin de cube, PV : platine vibrante, L : lentille et PM : photomultiplicateur

Une impulsion incidente sur l'interféromètre est séparée par une lame séparatrice LS en deux impulsions d'égales intensités, se propageant chacune dans un bras de l'interféromètre. Elles sont ensuite réfléchies par les coins de cube CC, afin qu'à la sortie de l'interféromètre les faisceaux soient colinéaires mais non superposés. Une lentille L permet alors de focaliser ces deux faisceaux dans un cristal non-linéaire, orienté pour réaliser les conditions d'accord de phase pour la somme de fréquence. Ainsi, si deux impulsions sont superposées spatialement et temporellement au sein du cristal, il y a génération d'une onde de second harmonique se propageant, par conservation du vecteur d'onde, selon la bissectrice des faisceaux. Une telle onde est ensuite détectée à l'aide d'un photomultiplicateur PM, générant un signal fonction du champ électrique de ces deux impulsions :

$$S(\tau) = \int_{\tau} |E_1(t)E_2(t - \tau)|^2 dt \quad (\text{V.10})$$

où τ est le retard accumulé par une impulsion par rapport à l'autre, du fait de la différence de marche entre les deux bras de l'interféromètre et T le temps de réponse du

photomultiplicateur. L'un des coins de cube est monté sur une platine vibrante, permettant de visualiser à l'oscilloscope le signal du photomultiplicateur en fonction du retard τ .

Comme les deux impulsions ont des intensités égales, le signal délivré par le photomultiplicateur peut se simplifier sous la forme :

$$S(\tau) = \int_T |E(t)E(t - \tau)|^2 dt \quad (\text{V.11})$$

$$\text{avec } E(t) = \xi(t)\text{expi}(\omega t + \phi(t)) \quad (\text{V.12})$$

où $\xi(t)$ représente la forme de l'impulsion. Dans le cas d'une architecture d'oscillateur femtoseconde telle que celle du laser à saphir dopé au titane, la forme des impulsions peut être considérée avec une très bonne approximation comme gaussienne ou séchante hyperbolique au carré. Nous ne considérerons donc dans la suite que ces deux cas.

D'après l'équation (V.11), le signal délivré par le photomultiplicateur est proportionnel à la fonction d'auto-corrélation $g(\tau)$ [122]. Ainsi, par mesure directe de la largeur totale à mi-hauteur de la fonction d'auto-corrélation $\Delta\tau_{\text{autoco}}$, on peut déduire la durée $\Delta\tau$ des impulsions laser d'après les données du tableau V.2 [123] : $\Delta\tau = 1.414 \Delta\tau_{\text{autoco}}$ pour une impulsion de forme gaussienne et $\Delta\tau = 1.543 \Delta\tau_{\text{autoco}}$ pour une impulsion de forme séchante hyperbolique au carré.

Expérimentalement, nous avons enregistré le signal d'auto-corrélation par génération de second harmonique afin de mesurer la durée des impulsions du laser à saphir dopé au titane (cf. Figure V.11). L'auto-corrélateur utilise un cristal de BBO ($\beta\text{-BaB}_2\text{O}_4$, Béta Baryum Borate) taillé pour un accord de phase de type I maximal à 800 nm. Les mesures ont donc été effectuées principalement à la longueur d'onde centrale de 800 nm. On a également ajusté la translation du prisme P1 pour minimiser la durée d'impulsion, en contrôlant directement avec le signal d'auto-corrélation. L'ajustement par les fonctions d'auto-corrélation théoriques calculées pour un profil gaussien ou en séchante hyperbolique au carré donne respectivement une durée d'impulsion de 103 fs et 93 fs. Cependant, cet ajustement ne permet pas de discriminer la forme éventuelle des impulsions et pour la suite nous considérerons donc des impulsions de durée d'environ 100 fs. Nous avons également vérifié expérimentalement que le laser délivre des impulsions de durée 100 fs sur une plage d'accordabilité d'environ 50 nm (de 770 à 820 nm). Cela nécessite cependant de retoucher aux réglages de la cavité, en particulier en optimisant la position des prismes intra-cavité P1 et P2.

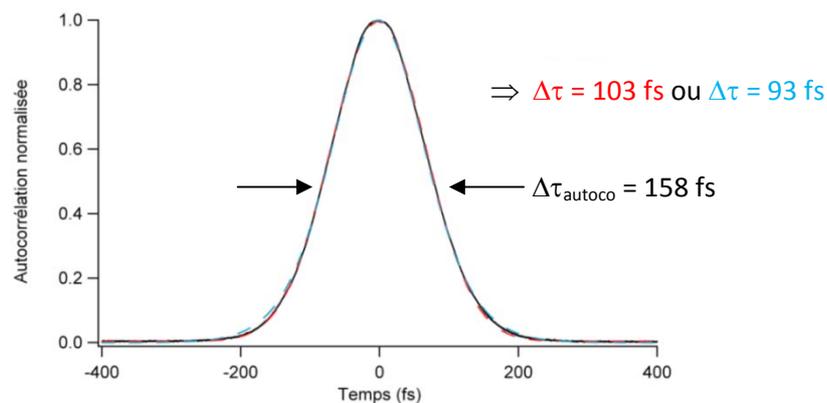


Figure V.11 : Fonction d'auto-corrélation en intensité expérimentale (en noir) et ajustement par les fonctions d'auto-corrélation théoriques pour un profil gaussien (en rouge) et séchante hyperbolique au carré (en bleu)

Cette méthode permet ainsi simplement de mesurer la durée des impulsions d'un laser femtoseconde. Son inconvénient principal est de ne pas être sensible à la phase de l'impulsion, donc de ne pas pouvoir nous informer sur des distorsions ou dissymétries éventuelles de l'impulsion ainsi que sur les dérives de fréquences.

• Mesure du spectre des impulsions

Nous avons également mesuré le spectre des impulsions produites par l'oscillateur à l'aide d'un analyseur de spectre optique (Ando, modèle AQ6317). Les mesures ont été effectuées dans une configuration de cavité identique à celle des mesures de durée d'impulsion (mêmes réglages du filtre de Lyot et des prismes intra-cavité) et sont présentées sur la Figure V.12. On obtient ainsi un spectre d'impulsion centré autour de 793 nm et de largeur totale à mi-hauteur $\Delta\lambda=9.4$ nm.

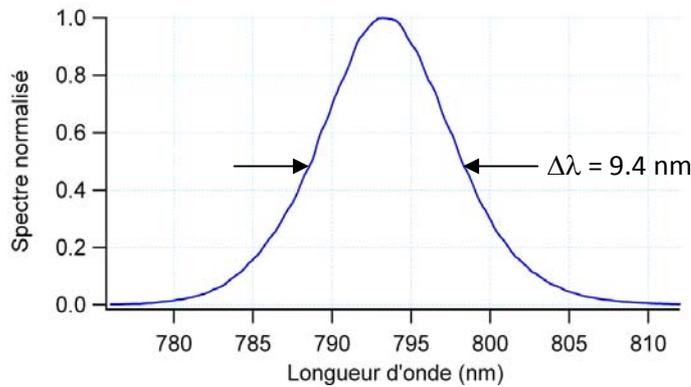


Figure V.12 : Spectre expérimental des impulsions laser générées par le laser à saphir dopé au titane

En considérant la valeur du produit $\Delta\nu\Delta\tau$, on peut ainsi vérifier que les impulsions générées sont proches de la limite imposée par transformée de Fourier, donc d'un profil gaussien (cf. Tableau V.2).

Forme	$\Delta\tau$	$(\Delta\tau\Delta\nu)_{\text{exp}}$	$(\Delta\tau\Delta\nu)_{\text{th}}$
Gaussienne	103	0.457	0.441
Séchante hyperbolique	93	0.412	0.315

Tableau V.2 : Valeurs expérimentales et théoriques (cas de la limite par transformée de Fourier) du produit $\Delta\tau\Delta\nu$ pour les deux formes d'impulsion possibles

V.2.2 Mise en place du microscope de fluorescence à deux photons

Nous décrivons dans ce paragraphe le dispositif expérimental du microscope de fluorescence sous EDP, les principaux choix effectués pour la mise en place du système ainsi que les caractéristiques expérimentales et la méthode d'acquisition des images 2D de fluorescence sous EDP. Des images de fluorescence sous EDP seront enfin présentées.

• Montage expérimental

Le schéma de principe du microscope de fluorescence sous EDP, que nous avons entièrement construit au cours de ces travaux, est présenté sur la Figure V.13.

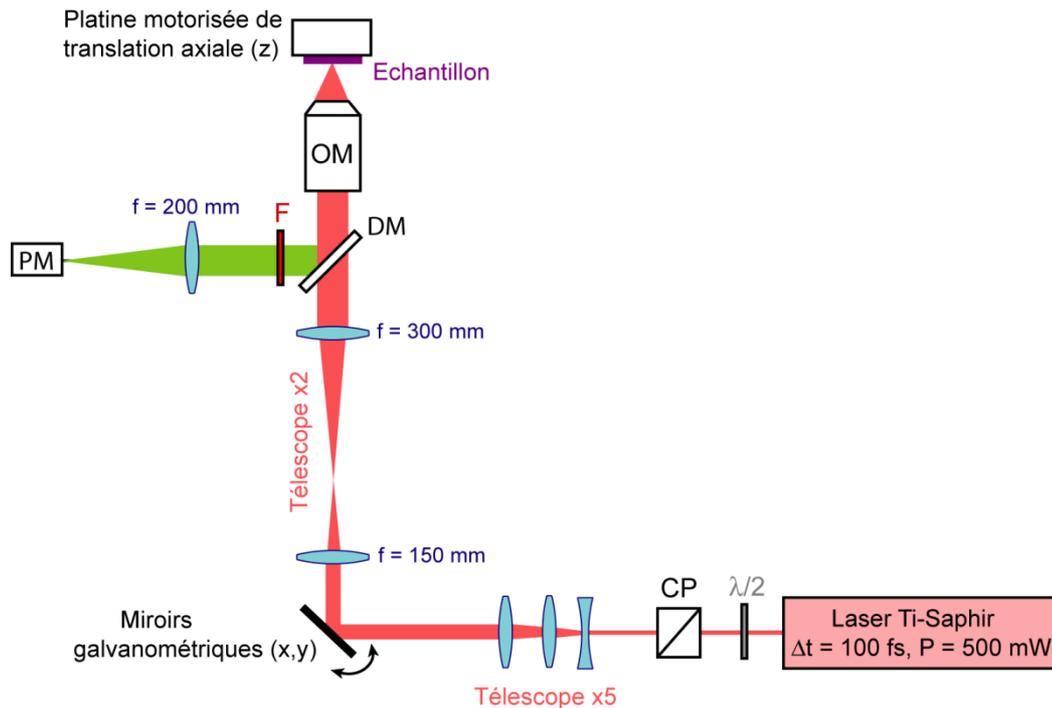


Figure V.13 : Dispositif expérimental de microscopie de fluorescence sous EDP. CP : cube polarisant ; DM : miroir dichroïque ; F : filtre ; PM : photomultiplicateur.

La source d'excitation, présentée dans le paragraphe précédent, est un laser Titane:Saphir, délivrant des impulsions d'une centaine de femtosecondes à une cadence ~ 80 MHz avec une puissance moyenne de 500 mW (modèle MIRA 900-F de Coherent), pompé par un laser solide Neodymium Vanadate (Nd:YVO_4) pompé par diode et doublé en fréquence par un cristal de LBO, émettant 6W en continu à 532 nm (modèle Millenia de Spectra Physics). En sortie du laser, un montage {lame demi-onde + cube polariseur} permet de contrôler la puissance laser envoyée sur l'échantillon. Pour les mesures effectuées aux cours de ces travaux, nous avons choisi de nous placer à une longueur d'onde d'excitation de $\lambda = 810$ nm, longueur d'onde qui permet une émission de fluorescence satisfaisante pour tous les échantillons étudiés. Afin que la section du faisceau laser soit suffisamment large pour couvrir totalement la pupille d'entrée de l'objectif de microscope et ainsi bénéficier de l'ouverture numérique totale de cet objectif, deux télescopes sont placés successivement sur le trajet du faisceau d'excitation. Le premier télescope, de grandissement transverse $G = 5$, est constitué d'un ensemble de trois doublets achromatiques de distances focales -100 mm, 300 mm et 300 mm. Nous avons choisi d'utiliser un télescope à trois doublets plutôt qu'un télescope classique à deux doublets pour réduire l'encombrement. Le second télescope, de grandissement transverse $G = 2$, est un système afocal, constitué de deux doublets achromatiques de distances focales 150 mm et 300 mm. Les grandissements transverses effectifs, mesurés pour les deux télescopes, sont regroupés dans le Tableau V.3.

	Taille de faisceau en entrée (mm)	Taille de faisceau en sortie (mm)	Grandissement transverse effectif
Télescope 1	0,75	3,5	4,7
Télescope 2	3,5	7,1	2,0

Tableau V.3 : Caractérisations expérimentales des deux télescopes utilisés pour l'élargissement du faisceau laser d'excitation.

Un système de deux miroirs galvanométriques perpendiculaires (Cambridge Technology) permet de réaliser le balayage transverse du faisceau laser d'excitation sur l'échantillon afin de réaliser l'acquisition d'images 2D. Le positionnement de ces miroirs est assez critique. Ils doivent en effet être conjugués de la pupille d'entrée de l'objectif de microscope via le second télescope pour que le faisceau d'excitation soit toujours centré sur l'objectif de microscope et que seul son angle d'incidence varie avec la tension appliquée aux miroirs (cf. Figure V.14).

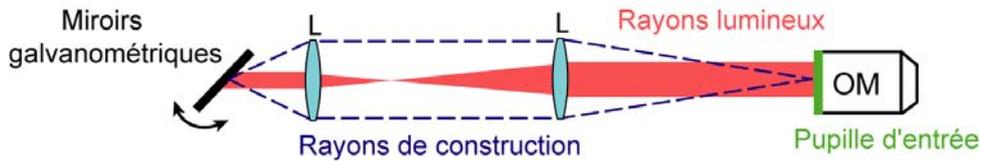


Figure V.14 : Conjugaison des miroirs galvanométriques et de la pupille d'entrée de l'objectif de microscope.

La fluorescence sous EDP émise par l'échantillon en réponse à l'excitation est collectée par le même objectif de microscope et est ensuite séparée de l'excitation résiduelle à l'aide d'un miroir dichroïque, caractérisé, pour une incidence à 45° , par une transmission moyenne de 85% dans pour la gamme de longueur d'onde 750-850 nm et d'une réflexion supérieure à 98% dans pour la gamme de longueur d'onde 400-600 nm.

• Acquisition des images de fluorescence

Le signal de fluorescence sous EDP est détecté par un photomultiplicateur (modèle H9305-03 de Hamamatsu) à l'aide d'un doublet achromatique de distance focale 200 mm. Deux miroirs de haute réflectivité à la longueur d'onde d'excitation (99,9%) permettent de supprimer l'excitation résiduelle réfléchi par le miroir dichroïque ($\sim 15\%$). Le photomultiplicateur (PM) est caractérisé par un fort gain (supérieur à 10^7), un temps de réponse de 1,4 ns pour chaque photon reçu et un courant d'obscurité très faible (typiquement de l'ordre de 2 nA). Sa réponse spectrale permet également la détection de la fluorescence émise par la plupart des fluorophores (cf. Figure V.15).

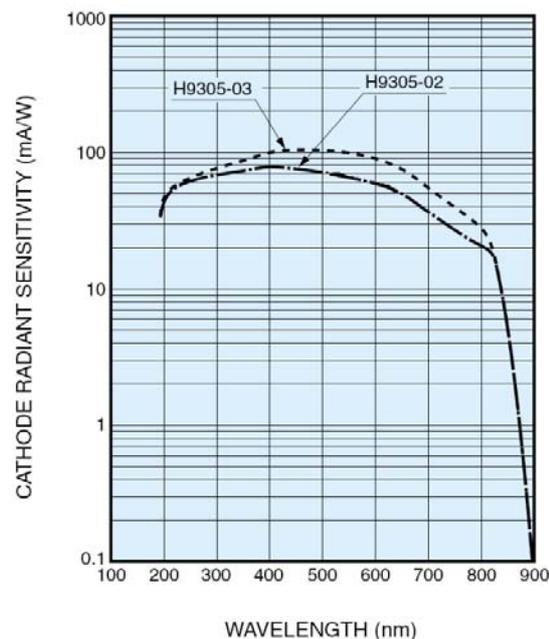


Figure V.15 : Réponse spectrale du photomultiplicateur Hamamatsu H9305-03.

Le signal délivré par le PM est envoyé dans un préamplificateur de courant faible bruit (modèle SR570 de Stanford Research Systems), afin de pouvoir appliquer un seuil et un filtrage à la détection ainsi qu'une amplification du signal de fluorescence. Une carte d'acquisition (PCI-6110E) et un programme développé sous LabView permettent finalement la gestion du déplacement des miroirs galvanométriques ainsi que l'acquisition par le PM, fournissant des images de 512×512 pixels.

V.2.3 Performances

Nous présentons dans ce paragraphe les performances du dispositif expérimental de microscopie de fluorescence sous EDP, en particulier la vérification des conditions d'excitation à deux photons, l'effet de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope et la résolution spatiale (axiale et transverse) du dispositif.

• Vérification des conditions d'excitation à deux photons

Pour vérifier les conditions d'excitation à deux photons, nous avons mesuré la variation de l'intensité de fluorescence émise par nos différents échantillons en fonction de la puissance laser incidente. La Figure V.16 représente les résultats typiques que nous avons pu observer pour différents échantillons (solution de Rhodamine 6G, billes fluorescentes, fluorescence d'un Stabilo® jaune...). La variation du flux de photons de fluorescence émis en fonction du flux de photons excitateurs incidents est une droite de pente ~ 2 en échelle logarithmique. Ceci confirme bien que le processus à l'origine de l'émission de fluorescence est une absorption à deux photons. De plus, aucun effet de saturation ni de photo-blanchiment n'a été observé sur toute la gamme de puissance du laser.

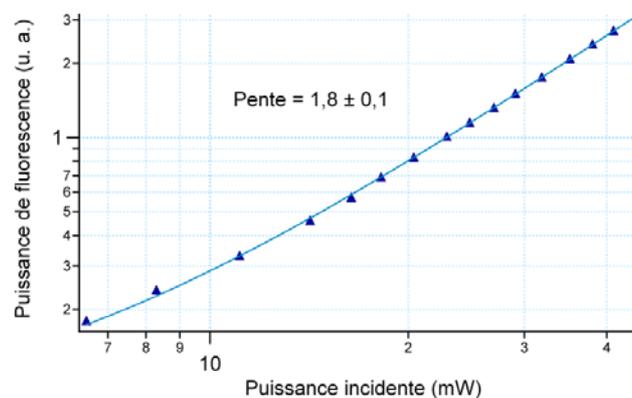


Figure V.16 : Variation de l'intensité de fluorescence émise par un échantillon de Rhodamine 6G en fonction de la puissance laser incidente.

• Effet de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope

L'ouverture numérique de l'objectif de microscope est un paramètre crucial pour optimiser les performances d'un dispositif de microscopie de fluorescence sous EDP. En effet, l'ouverture numérique détermine le degré de focalisation du faisceau laser exciteur, et donc l'efficacité d'émission de fluorescence, la profondeur de champ, et donc la résolution axiale du dispositif. Afin de bien comprendre l'effet de l'ouverture numérique sur ces différents paramètres, nous avons imagé à différentes profondeurs de pénétration la même zone d'un morceau de papier optique imbibé de Stabilo® jaune (émettant un signal à deux photons entre 510 et 545 nm lorsqu'il est excité à 810 nm, cf. Figure V.17) avec trois

objectifs de microscope différents d'ouvertures numériques (ON = 0,2 ou ON = 0,5 ou ON = 0,8).

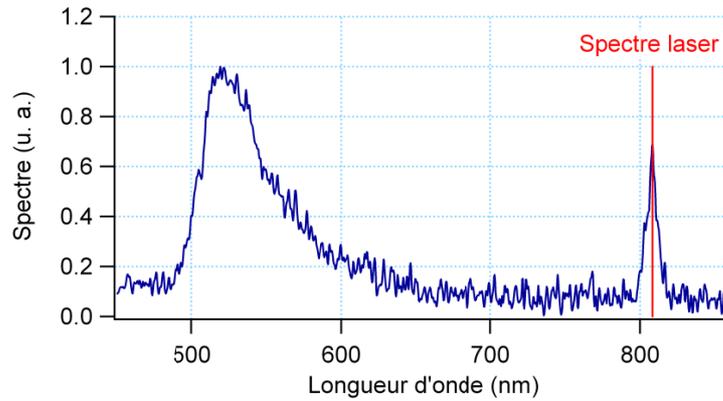
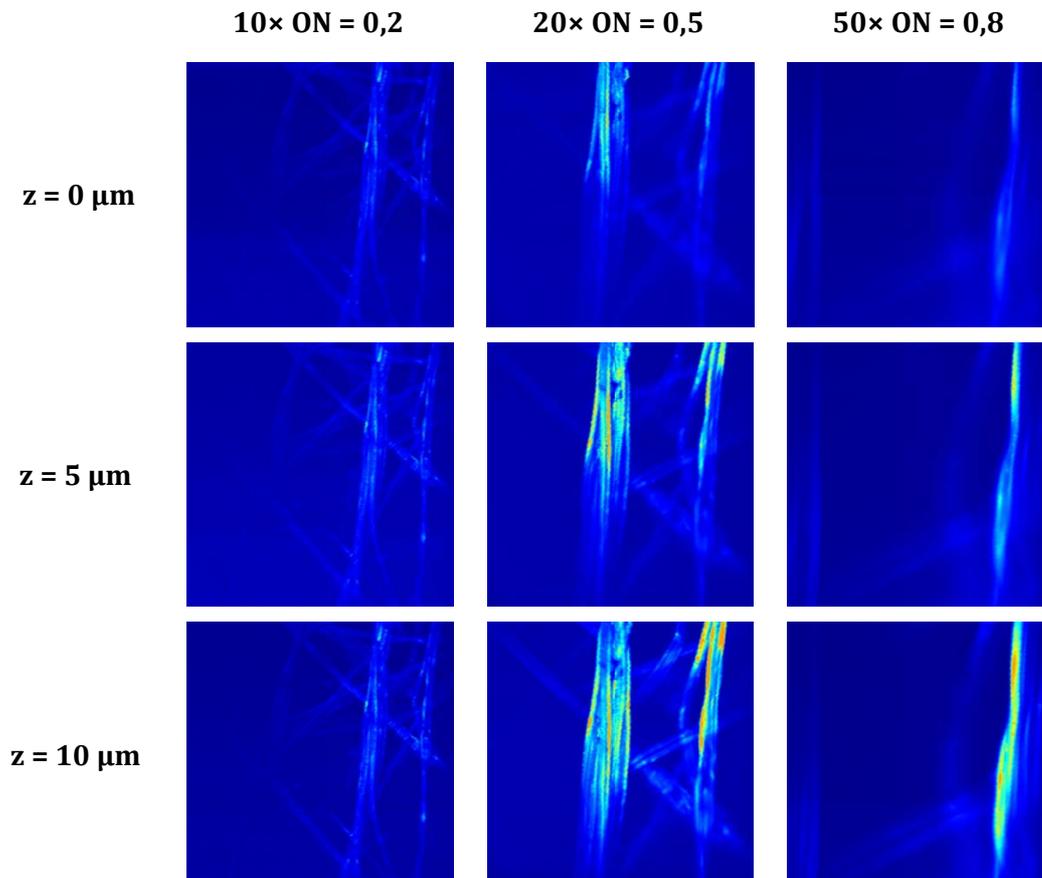


Figure V.17 : Spectre d'excitation laser et d'émission de fluorescence à deux photons de fibres de papier optique imbibées de fluo jaune.

Les différentes mesures, regroupées dans le Tableau V.4, ont été réalisées à puissance du laser d'excitation et à sensibilité du PM constantes, afin de pouvoir comparer les efficacités d'émission de fluorescence, et à tension appliquée aux miroirs galvanométriques constante, afin de pouvoir comparer les tailles de champs observés.



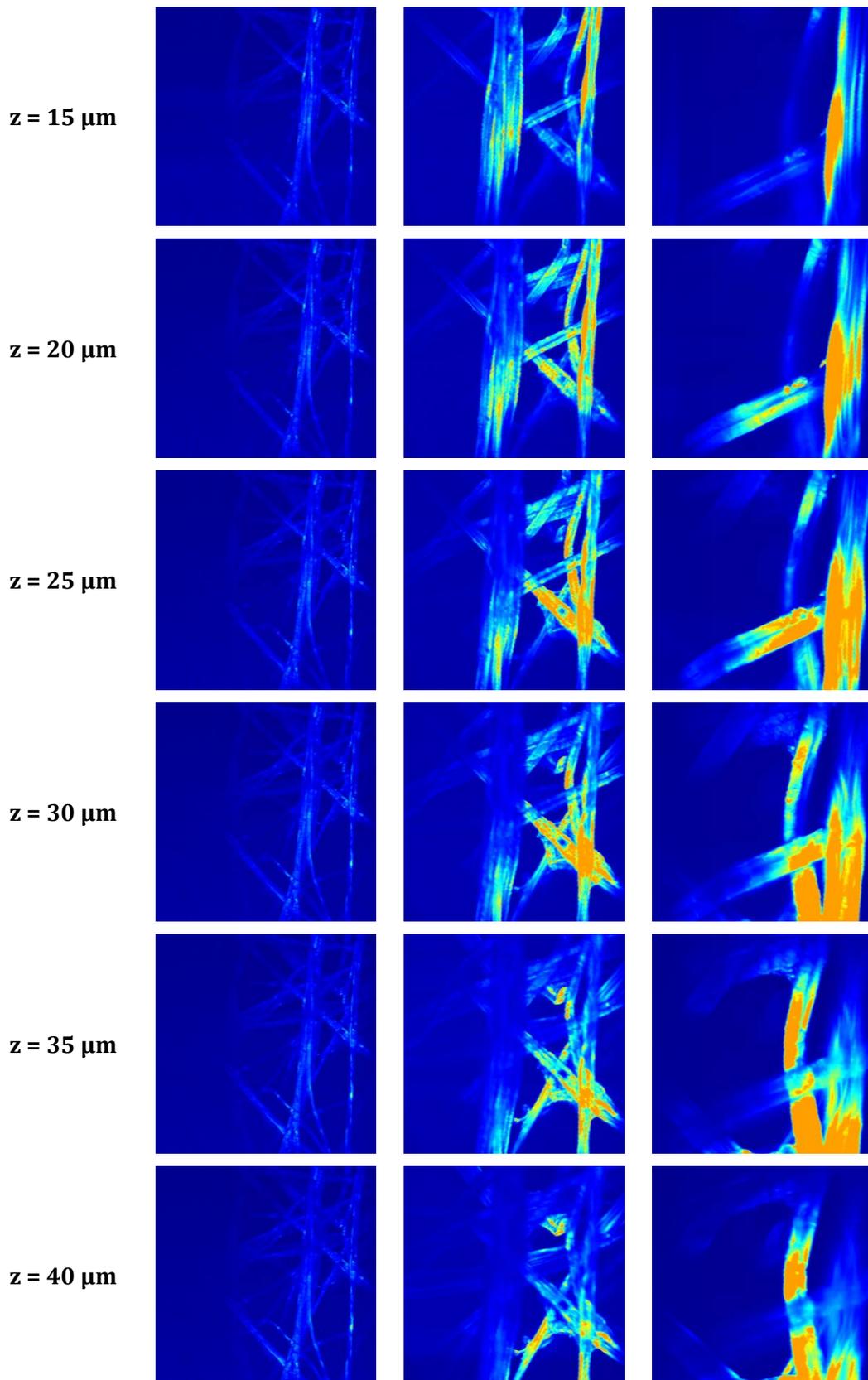


Tableau V.4 : Effet de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope sur les images de fluorescence sous excitation à deux photons de fibres de papier optique réalisées à différentes profondeurs.

Cette étude démontre l'influence de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope sur deux paramètres cruciaux du dispositif d'imagerie :

- l'*efficacité de fluorescence* : plus l'ouverture numérique de l'objectif est élevée, plus le volume de focalisation est faible et donc plus l'efficacité de fluorescence sous EDP est élevée (à puissance laser d'excitation constante).

- le *sectionnement axial* : plus l'ouverture numérique de l'objectif est élevée, plus la profondeur de champ est faible et donc plus le sectionnement axial est efficace.

• Résolution axiale

On mesure la résolution axiale de notre dispositif de microscopie de fluorescence sous EDP en mesurant par déplacement de la platine de translation axiale le profil d'émission de fluorescence sous EDP d'une interface air/solution de Rhodamine 6G. Les résultats obtenus pour trois objectifs de microscope d'ouvertures numériques distinctes sont représentés sur la Figure V.18.

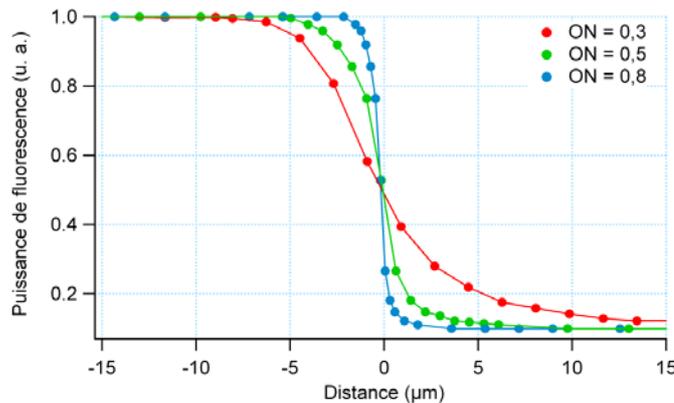


Figure V.18 : Profil d'émission de fluorescence sous excitation à deux photons d'une interface air/solution de Rhodamine 6G pour différentes ouvertures numériques (ON).

A partir des mesures expérimentales, on peut ajuster la réponse axiale mesurée par le profil du faisceau en utilisant la longueur de Rayleigh, et donc la résolution axiale, comme paramètre d'ajustement. Les résolutions axiales expérimentales ainsi obtenues sont dans l'ensemble cohérentes avec les résolutions axiales théoriques, données par l'équation (V.5).

	Résolution axiale expérimentale (μm)	Résolution axiale théorique (μm)
ON = 0,3	17,9	13,8
ON = 0,5	5,5	5,0
ON = 0,8	2,0	1,9

Tableau V.5 : Comparaison des résolutions axiales expérimentales et théorique du microscope de fluorescence sous EDP.

• Résolution transverse

La mesure de la résolution transverse du dispositif de microscopie de fluorescence sous EDP a été réalisée en imageant l'intensité de fluorescence émise par des billes de latex fluorescentes de 100 nm de diamètre piégée dans un gel d'acrylamide, en utilisant un objectif

d'ouverture numérique 0,8¹. Les billes de latex fluorescentes sont des microsphères de polystyrène dans lesquelles des molécules fluorescentes ont été introduites (carboxylate-modified microspheres red fluorescent fournies par Molecular Probes). Les molécules fluorescentes possèdent un large spectre d'absorption, centré autour de $\lambda_{max} = 580$ nm, et un spectre d'émission de fluorescence centré sur $\lambda_{em} = 605$ nm. Le gel est préparé avec les composés suivants :

- 4 μ L de TEMED (tétraméthyléthylènediamine) à 10% qui joue le rôle de catalyseur
- 30 μ L d'Acrylamide Bis - Acrylamide à 30%
- 60 μ L d'eau contenant les billes diluées pour que la concentration de billes à l'intérieur du gel soit d'environ une bille par élément de volume de $10 \mu\text{m}^3$
- 10 μ L de persulfate d'ammonium à 10%.

Une cartographie de fluorescence émise par les billes est réalisée sur un volume de $60 \times 60 \times 60 \mu\text{m}^3$ par déplacement axial par pas de $1 \mu\text{m}$. Cette cartographie donne accès aux profils transverse et axial de l'intensité de fluorescence émise par une bille (cf. Figure V.19 pour le profil transverse), conduisant à une résolution transverse $d_x = 640 \pm 20$ nm et une résolution axiale $d_z = 2,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$. La résolution transverse théorique de notre dispositif de microscopie de fluorescence sous EDP, donnée par l'équation (V.6), est de 618 nm ($ON = 0,8$ et $\lambda = 810$ nm), ce qui est en très bon accord avec la valeur expérimentale. Cela signifie entre autre que le faisceau excitateur couvre totalement la pupille d'entrée de l'objectif de microscope. La résolution axiale est quant à elle en très bon accord avec les mesures présentées précédemment.

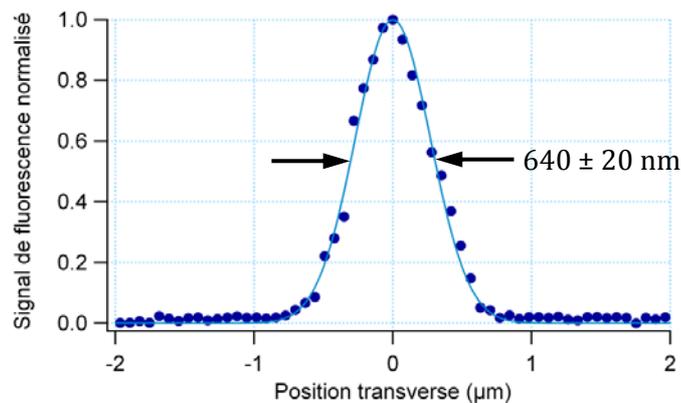


Figure V.19 : Résolution transverse du dispositif de microscopie de fluorescence sous EDP obtenue en imageant des billes fluorescentes de 100 nm de diamètre.

• Limitations et solutions technologiques envisageables

L'utilisation de miroirs galvanométriques pour le balayage 2D du faisceau d'excitation s'avère peu rapide dans notre cas (le balayage d'une image de 512×512 pixels requiert 1,28 s) et impose des temps morts pour ne pas imposer de brusques sauts accélération/décélération aux miroirs galvanométriques. De nombreuses stratégies ont déjà été développées pour améliorer la vitesse d'acquisition, par exemple en remplaçant les miroirs galvanométriques par un disque de microlentilles tournant [124] ou un déflecteur acousto-optique [125]. Le couplage d'un miroir polygonal, qui assure le déplacement selon

¹ Le signal de fluorescence sous EDP émis par les billes fluorescentes de 100 nm n'est pas suffisant pour pouvoir être observé avec les objectifs d'ouvertures numériques 0,3 et 0,5. C'est pourquoi la mesure de résolution transverse n'a été effectuée que pour une ouverture numérique de 0,8.

une direction, avec un miroir galvanométrique, pour le déplacement selon l'autre direction, est une autre possibilité [126]. Ces améliorations en termes de vitesse d'acquisition se basent sur un balayage point par point du faisceau d'excitation. Cette excitation monopoint de l'échantillon n'est néanmoins pas dans l'esprit de la technique d'OCT plein champ à laquelle nous souhaitons nous coupler, puisque l'OCT plein champ ne nécessite pas de balayage transverse du faisceau d'illumination. Le développement d'un dispositif permettant d'exciter simultanément plusieurs points de l'échantillon serait pertinent dans le cadre d'une amélioration de la technique de microscopie de fluorescence sous EDP.

Deux approches sont possibles pour créer une matrice d'excitation : par division du front d'onde de l'impulsion ou par division de son amplitude. Leur principe, leurs avantages et inconvénients majeurs sont résumés dans le Tableau V.6.

	Division du front d'onde	Division de l'amplitude
Principe	Support de microlentilles, séparant le faisceau laser en 25 faisceaux secondaires [127] ou Réseau rectangulaire de microlentilles + balayage [113] ou Utilisation d'éléments diffractifs [128]	Cascade de lames séparatrices + balayage par miroirs galvanométriques [129] ou Une lame séparatrice encadrée de miroirs + balayage par miroirs galvanométriques [130, 131]
Transmission	☹️ 25% de l'intensité incidente	😊 90% de l'intensité incidente
Homogénéité du champ	☹️ Mauvaise homogénéité, (faisceaux en périphérie)	😊 Bonne homogénéité sur tout le champ
Vitesse de balayage	😊 > 1000 images/s	☹️ Limitée par le déplacement des miroirs galvanométriques

Tableau V.6 : Principe, avantages et inconvénients des deux méthodes permettant de créer une matrice d'excitation.

V.2.4 Imagerie de fluorescence sous excitation à deux photons

Le dispositif de microscopie de fluorescence sous EDP va nous permettre d'acquérir des images 3D d'émission de fluorescence en parallèle des images d'OCT plein champ. Avant de réaliser le couplage entre les deux techniques d'imagerie, la qualité d'imagerie du dispositif de microscopie de fluorescence sous EDP est validée sur des échantillons simples (billes de latex fluorescentes et grains de pollen).

• Billes fluorescentes

Les premiers tests ont été réalisés à l'aide de billes de latex fluorescentes de 4 μm de diamètre (carboxylate-modified microspheres red fluorescent fournies par Molecular Probes) piégées dans un gel d'acrylamide à une concentration d'environ 0,01 molécule/ μm^3 . Les images de microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons à la longueur d'onde

de 810 nm sont présentées sur la Figure V.20. Le champ total couvert par le balayage des miroirs galvanométriques est de $110 \times 110 \mu\text{m}^2$ et une pile de 130 images a été acquise par déplacement axial de l'échantillon par pas de $1 \mu\text{m}$, représentant une profondeur totale de $130 \mu\text{m}$ (pour une durée d'acquisition totale de 4 minutes).

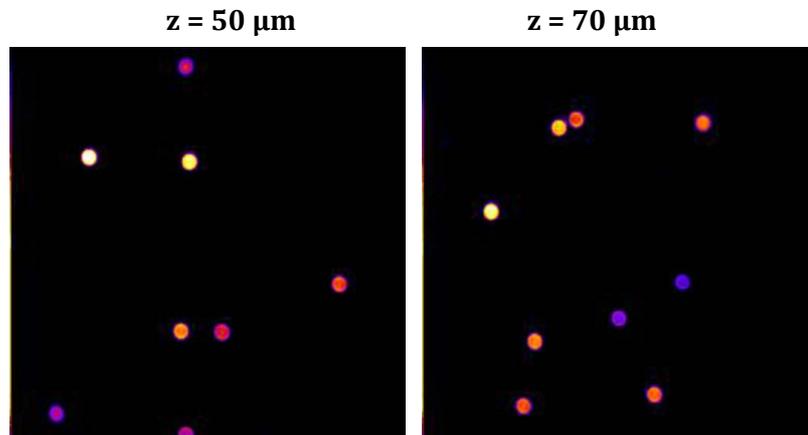


Figure V.20 : Images de microscopie de fluorescence sous EDP de billes de latex fluorescentes de diamètre $4 \mu\text{m}$ dans deux plans de mise au point différents.

A l'aide de cette acquisition, nous avons pu constater que l'émission de fluorescence est homogène sur toute la surface d'excitation (l'intensité de fluorescence varie de moins de 10% sur le champ) avec un rapport signal sur bruit de l'ordre de 35.

• Grains de pollen

Les grains de pollen sont un échantillon test intéressant pour notre dispositif de microscopie de fluorescence sous EDP, du fait de leur taille (les grains mesurent en général quelques dizaines de micromètres de diamètre et sont de forme plus ou moins ovoïde selon les espèces de fleur dont ils sont issus) et de leur fluorescence naturelle ou *auto-fluorescence*. L'imagerie se fera donc sans marquage. Pour notre étude, nous avons utilisé des grains de pollen issus de fleurs de lys blanc (*Lilium Helvetia*). Une photographie des pistils utilisés pour les expériences est présentée sur la Figure V.21.



Figure V.21 : Fleur de Lys Blanc (*Lilium Helvetia*) dont sont issus les grains de pollen utilisés pour tester le dispositif de microscopie de fluorescence sous EDP.

Une image de microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons à la longueur d'onde de 810 nm, extraite d'une pile de 30 μm de profondeur, est présentée sur la Figure V.22 (droite). Nous avons également réalisée une image au microscope électronique à balayage (MEB) au Laboratoire Matériaux et Surface de l'Ecole Polytechnique (Figure V.22 gauche). Les deux images présentent la même structure en alvéoles.

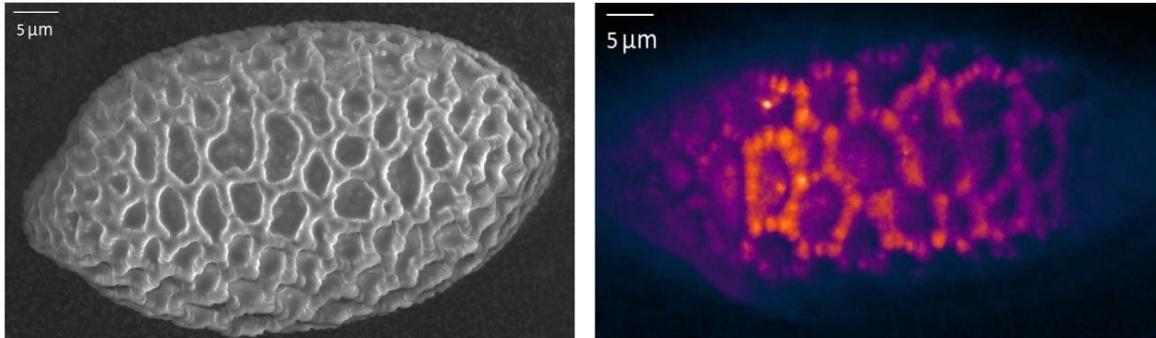


Figure V.22 : Images de microscopie électronique à balayage (gauche) et de microscopie de fluorescence sous EDP obtenue par projection d'une pile de 30 images (droite) d'un grain de pollen de *Lilium Heveltia*.

V.3 Couplage de l'OCT plein champ et de la microscopie de fluorescence sous excitation à 2 photons

Les dispositifs d'OCT plein champ et d'imagerie de fluorescence sous EDP ayant fait leurs preuves séparément, il reste désormais à coupler ces techniques d'imagerie. Notons que des tentatives de couplage OCT classique/microscopie de fluorescence multiphotonique ont déjà été réalisées, mais seulement en OCT à balayage [132, 133].

Ce paragraphe présente la réalisation expérimentale du couplage des deux techniques d'imagerie, les choix auxquels nous avons été confrontés ainsi que les résultats obtenus sur des grains de pollen.

V.3.1 Montage expérimental

Pour que le couplage des deux techniques d'imagerie que nous souhaitons proposer présente un attrait par rapport à la simple juxtaposition de techniques existantes, on doit pouvoir réaliser, avec le même instrument, les deux images au *même endroit* de l'échantillon, et pratiquement au *même instant*. Le bras échantillon du dispositif d'OCT plein champ doit donc également permettre de réaliser l'imagerie de fluorescence sous EDP. Le caractère simultané de l'imagerie impose quant à lui l'utilisation d'un unique objectif de microscope, commun aux deux dispositifs, dont l'ouverture numérique est fixée par les contraintes respectives des deux dispositifs d'imagerie :

- En microscopie de fluorescence sous EDP, la résolution axiale et l'efficacité de fluorescence sont d'autant meilleures que l'ouverture numérique de l'objectif utilisé est élevée. En pratique, il est ainsi quasiment impossible de détecter l'auto-fluorescence sous EDP d'échantillons biologiques (cornée, *Xenopus Laevis* ...) avec une ouverture numérique inférieure à 0,8. La tendance est donc d'utiliser une grande ouverture numérique.

- En OCT plein champ comme en microscopie classique, la résolution transverse est d'autant meilleure que l'ouverture numérique des objectifs de microscope utilisés est élevée. De plus, d'après l'équation (I.8), une ouverture numérique élevée (typiquement supérieure à 0,5) peut permettre d'améliorer la résolution axiale imposée par la longueur de cohérence. Enfin, une grande ouverture numérique permet d'accroître le flux de photons collectés, et donc la sensibilité de détection à puissance incidente constante. En OCT plein champ, la tendance serait donc également d'utiliser des objectifs de microscope possédant une grande ouverture numérique. Ceci est illustré par la Figure V.23, représentant une coupe tomographique (XZ) d'une larve *ex vivo* de *Xenopus Laevis* imagée successivement avec des objectifs 0,3 et 0,5, et sur lesquelles on peut voir le gain en résolution transverse et en sensibilité de détection. Nous verrons cependant dans la suite que l'utilisation d'objectifs de forte ouverture numérique pose d'autres problèmes.

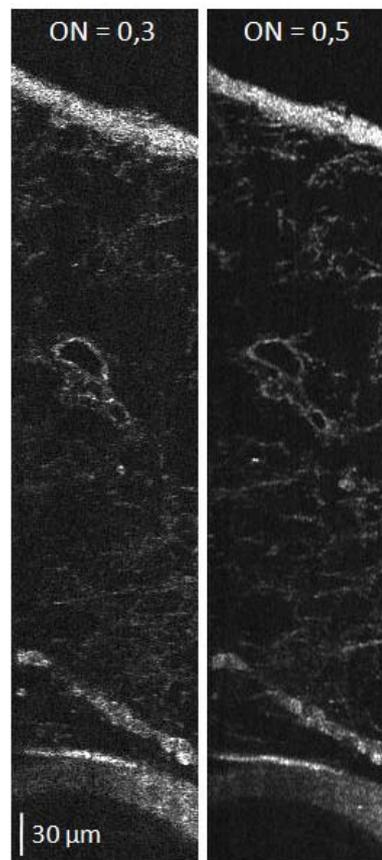


Figure V.23 : Coupes tomographiques (XZ) d'un échantillon *Xenopus Laevis ex vivo*, correspondant à une zone de $120 \times 600 \mu\text{m}^2$, successivement avec des objectifs 0,3 et 0,5.

• Montage expérimental et acquisition des données

Le dispositif expérimental utilisé pour le couplage de l'OCT plein champ et de la microscopie de fluorescence sous EDP est présenté sur la Figure V.24.

Les sources lumineuses utilisées sont la lampe halogène incorporée dans un dispositif d'illumination Köhler pour l'OCT plein champ et le laser à Saphir dopé au titane pour la microscopie de fluorescence sous EDP. Les deux sources sont injectées chacune sur une entrée de l'interféromètre et alignées pour entrer à incidence normale et au centre des objectifs de microscope. On s'assure ainsi d'observer la même région de l'échantillon avec les deux techniques d'imagerie. L'interféromètre de Linnik est identique à celui présenté dans le

chapitre II. Les objectifs de microscope sont des objectifs à immersion dans l'eau possédant une ouverture numérique de 0,8 et un grossissement $40\times$ (Nikon, CFI Apo $40\times$ W NIR, NA 0.8). La surface de référence est la surface plane d'un barreau d' $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$, de réflectivité 2% dans l'eau, placé sur un transducteur piézoélectrique afin de réaliser le décalage de phase. Dans le bras objet de l'interféromètre, se trouvent deux platines de translation micrométrique permettant de déplacer l'objet dans les deux directions du plan transverse, ainsi qu'une platine de translation axiale, motorisée et commandée par ordinateur, permettant d'effectuer les piles d'images tomographiques et de fluorescence.

Un cube séparateur de faisceaux, identique à celui de l'interféromètre de Linnik, est placé avant l'entrée de l'interféromètre afin de pouvoir imager, à l'aide d'un doublet achromatique de focale 300 mm, le signal interférométrique sur la caméra CCD. L'acquisition du signal de fluorescence est identique à ce qui a été présenté dans la section V.2.2.

Le photomultiplicateur étant très sensible dans le visible et le proche infrarouge, il est délicat d'acquérir simultanément le signal interférométrique et le signal de fluorescence sous EDP, du fait qu'une partie du faisceau utilisé pour l'OCT plein champ est focalisé sur le PM. A chaque pas d'une pile, les images *en-face* d'OCT plein champ et de microscopie de fluorescence sous EDP sont donc acquises successivement, deux obturateurs commandés permettant de sélectionner la source lumineuse à utiliser.

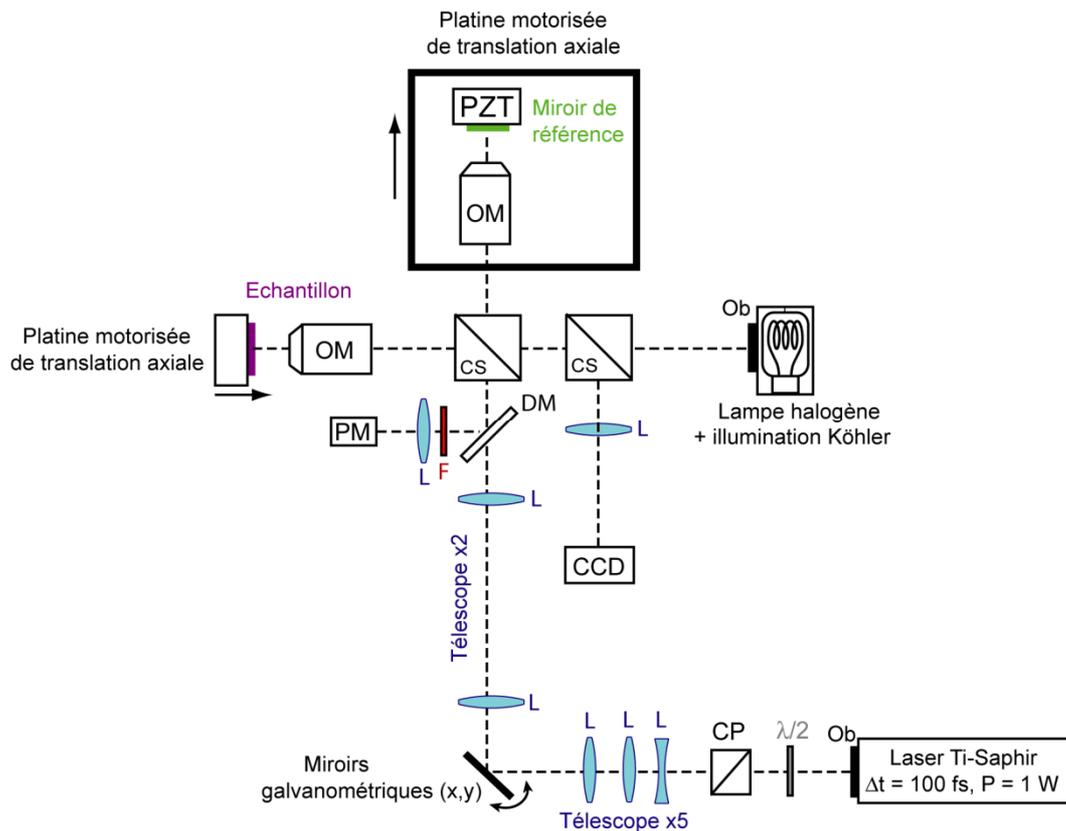


Figure V.24 : Dispositif expérimental pour le couplage de l'OCT plein champ et la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons.

Ob : obturateur, CS : cube séparateur, OM : objectif de microscope, PZT : transducteur piézoélectrique, L doublets achromatiques, CP : cube polarisant, DM : miroir dichroïque, F : filtre, PM : photomultiplicateur.

Un programme spécifique développé sous LabView permet de gérer la commande des deux obturateurs, le déplacement des miroirs galvanométriques pour réaliser le balayage du

faisceau femtoseconde sur la totalité du champ vu par la caméra CCD, l'acquisition successive par la caméra CCD des images tomographiques et par le photomultiplicateur des images de fluorescence sous EDP et le déplacement axial de la platine motorisée par pas de $1\ \mu\text{m}$, ainsi que de l'optimisation éventuelle de la différence de marche par translation du bras de référence, qui devient nécessaire dans le cas de l'imagerie OCT avec de fortes ouvertures numériques.

• Utilisation d'objectifs de grande ouverture numérique en OCT plein champ

Malgré le gain en résolution et en flux collecté, l'utilisation d'objectifs de fort grossissement et de grande ouverture numérique pose deux problèmes majeurs pour l'OCT plein champ :

- Le fort grossissement ($40\times$) réduit considérablement la taille du champ observable en OCT plein champ. Ainsi, si on utilise la caméra Dalsa CA-D1 (256×256 pixels de $16\ \mu\text{m}$ conduisant à une surface sensible de $4,1\times 4,1\ \text{mm}^2$) et la lentille de focale $300\ \text{mm}$, le champ observé sera seulement de $60\times 60\ \mu\text{m}^2$, ce qui en pratique est souvent insuffisant. Les solutions à ce problème sont d'utiliser une caméra possédant une matrice de détection plus grande ou une lentille de projection possédant une plus courte focale. En choisissant la seconde solution, on risque cependant de sous-échantillonner le signal par les pixels du détecteur et donc de perdre en résolution transverse. La première solution a donc été retenue et le dispositif d'OCT a été réalisé à l'aide d'une nouvelle caméra CCD Si possédant 1024×1024 pixels de taille $14\ \mu\text{m}$, conduisant à une surface sensible de $14,3\times 14,3\ \text{mm}^2$ (modèle 1M15 de Dalsa, 12 bits, 15 Hz, capacité de charges des pixels de 250 000 électrons).

En utilisant cette caméra et une lentille de projection de $300\ \text{mm}$, le champ observable est alors de $210\times 210\ \mu\text{m}^2$ (ce qui comparable au champ obtenu avec la caméra précédente et les objectifs d'ouverture numérique 0,3) et nous avons mesuré une résolution transverse expérimentale de $0,6\ \mu\text{m}$, ce qui est comparable à la valeur théorique calculée à partir de l'équation (I.2) en utilisant une ouverture numérique de 0,8.

Le spectre de la nouvelle caméra Si possède une longueur d'onde centrale et une largeur spectrale (FWHM) de détection de $700\ \text{nm}$ et $300\ \text{nm}$ respectivement, conduisant à une résolution axiale théorique de $0,55\ \mu\text{m}$ dans l'eau.

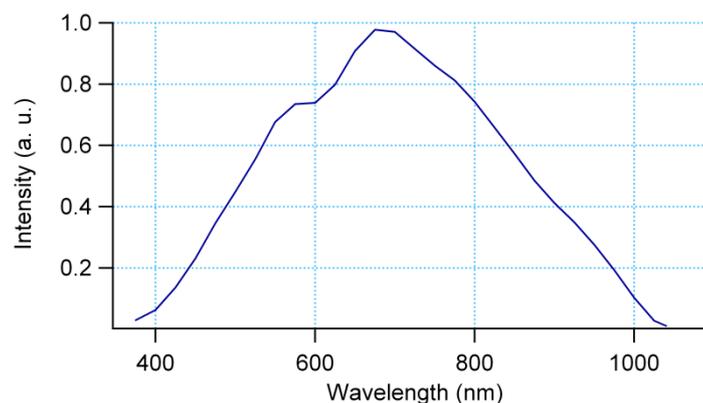


Figure V.25 : Réponse spectrale de la caméra DALSA 1M15 (données constructeur).

La sensibilité de détection mesurée avec cette caméra en fonction du nombre d'images accumulées est présentée sur la Figure V.26. Des sensibilités de détection de l'ordre de 90 dB, correspondant à un coefficient de réflexion minimal détectable de 10^{-9} , sont facilement accessibles (accumulation de 50 images). Une comparaison à la courbe donnée

par l'équation (II.14) avec la valeur constructeur de la capacité de charge des pixels ($2,5 \times 10^5$ électrons) confirme que la statistique des photoélectrons obéit bien à une loi de Poisson, donc que la détection est limitée par le bruit de grenaille.

Notons ici que les sensibilités de détection obtenues avec ce détecteur sont meilleures que celles obtenues avec le détecteur précédent à nombre d'accumulations identique (environ 10 dB de gain), du fait de la plus grande capacité de charges des pixels de ce détecteur. La contrepartie est une fréquence de travail beaucoup plus lente (15 Hz contre 200 Hz pour le modèle CA-D1).

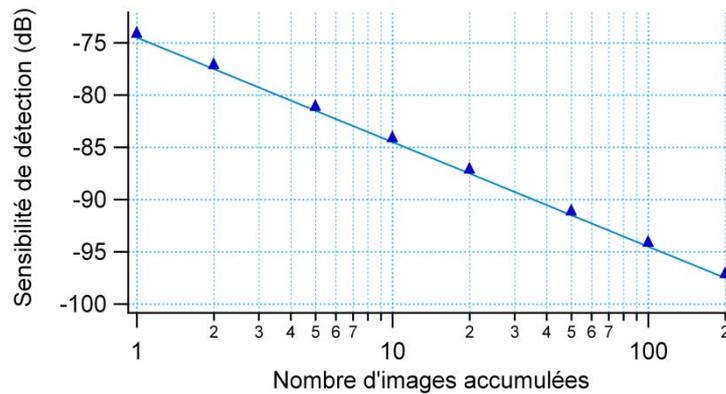


Figure V.26 : Sensibilité de détection du dispositif d'OCT avec caméra 1M15. Les points correspondent aux mesures et les courbes à l'équation (II.14).

- Le second problème rencontré est lié à l'imagerie d'échantillons biologiques possédant un indice de réfraction n' différent de l'indice de réfraction n du milieu d'immersion. C'est le cas par exemple de la cornée, qui possède un indice moyen $n' = 1,377$, supérieur à celui de l'eau. Dans ce cas, lorsqu'on translate axialement l'échantillon d'une distance e , le plan de cohérence Π_c et le plan de focalisation Π_f se décalent d'une quantité (cf. Figure V.27) :

$$\Delta = \Pi_c(e) - \Pi_f(e) = \frac{n'^2 - n^2}{n n'} e \quad (\text{V.13})$$

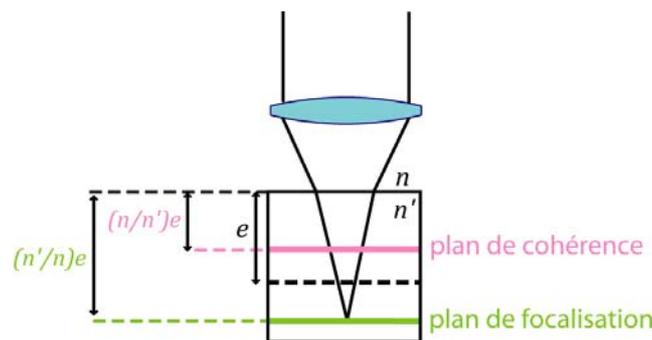


Figure V.27 : Décalage entre les plans de focalisation et de cohérence lorsqu'on image avec un objectif à immersion dans l'eau (indice n) un échantillon possédant un indice de réfraction n' translaté d'une distance e .

Ce décalage a peu d'incidence sur la qualité des images tomographiques tant qu'il demeure inférieur à la profondeur de champ des objectifs de microscope. Dans le cas contraire, on constate une nette diminution du contraste du signal interférométrique, ce qui engendre une perte significative sur l'image tomographique finale au-delà d'une certaine profondeur de pénétration. Cette profondeur de pénétration limite est d'autant plus faible que la

profondeur de champ de l'objectif de microscope utilisé est faible et donc que son ouverture numérique est élevée. A titre indicatif, le Tableau (V.7) indique, en fonction de l'ouverture numérique, la profondeur d'imagerie limite (donnée par la position du plan de cohérence) au-delà de laquelle le décalage entre plan de cohérence et plan de focalisation devient supérieur à la profondeur de champ de l'objectif de microscope (évaluée par la largeur de la réponse axiale d'un objectif de microscope entre ces deux zéros). Ces calculs ont été réalisés dans le cas de l'imagerie de la cornée (indice de réfraction moyen $n' = 1,377$) avec des objectifs à immersion dans l'eau ($n = 1,33$).

ON	Profondeur de champ (μm)	Profondeur d'imagerie limite (μm)
0,3	11,8	164
0,5	4,3	60
0,8	1,6	22

Tableau V.7 : Profondeur de champ et profondeur d'imagerie limite théoriques d'un dispositif d'OCT plein champ pour différentes ouvertures numériques.

La profondeur limite d'imagerie étant très critique pour des objectifs de forte ouverture numérique, il faut donc compenser l'effet de décalage entre plan de cohérence et plan de focalisation. Pour cela, deux options se présentent :

- changer la mise au point dans l'échantillon pour faire coïncider le plan de focalisation avec celui de cohérence
- changer la différence de marche du bras de référence pour faire coïncider le plan de cohérence avec le plan de focalisation.

Nous avons retenu la seconde solution qui permet de conserver la mise au point au sein de l'échantillon inchangée entre l'image de microscopie de fluorescence sous EDP et l'image d'OCT plein champ. Dans ce cas là, lorsque la platine de translation axiale est déplacée d'une quantité physique e , on image des structures dans l'échantillon qui se trouvent en réalité à une profondeur d donnée par la position du plan de cohérence, soit :

$$d = \frac{n'}{n} e \quad (\text{V.14})$$

Le plan de cohérence est quant à lui situé à une profondeur $\Pi_c(e)$. Pour pouvoir faire coïncider ce plan de cohérence avec le plan de focalisation, il faut augmenter la différence de marche d'une quantité Δ :

$$\Delta = \frac{n'^2 - n^2}{n} e \quad (\text{V.15})$$

En pratique, le bras de référence est positionné sur un moteur pas à pas contrôlé informatiquement, qui permet à chaque profondeur d'imagerie au sein de l'échantillon d'appliquer le facteur correctif Δ pour optimiser l'image tomographique. Un traitement numérique fait a posteriori permet de tenir compte de la profondeur réelle d'imagerie d .

V.3.2 Images couplées

Nous présentons dans ce paragraphe les images obtenues sur les grains de pollen issus de fleurs de lys blanc (*Lilium Helvetia*) présentés précédemment avec le dispositif de microscopie de fluorescence sous EDP couplé au dispositif d'OCT plein champ.

Des images couplées d'OCT plein champ et de microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons à la longueur d'onde de 810 nm, extraite d'une pile de 50 μm de profondeur, sont présentées sur la Figure V.28.

Les images de microscopie de fluorescence sous EDP sont similaires à celles présentées dans la section V.2.4, et ne permettent pas d'imager l'intérieur du grain de pollen (qui ne semble présenter aucune structure fluorescente à cette longueur d'onde d'excitation) mais seulement la "coque supérieure" du grain. L'OCT plein champ permet quant à elle d'imager la structure en 3D du grain de pollen, puisqu'une information est également extraite de l'intérieur du grain. La résolution des alvéoles n'est cependant pas aussi sensible, sans doute du fait du faible contraste optique.

Les deux informations obtenues sont donc complémentaires et permettent de reconstruire une cartographie 3D du grain, similaire à celle obtenue en MEB (cf. Figure V.22 gauche).

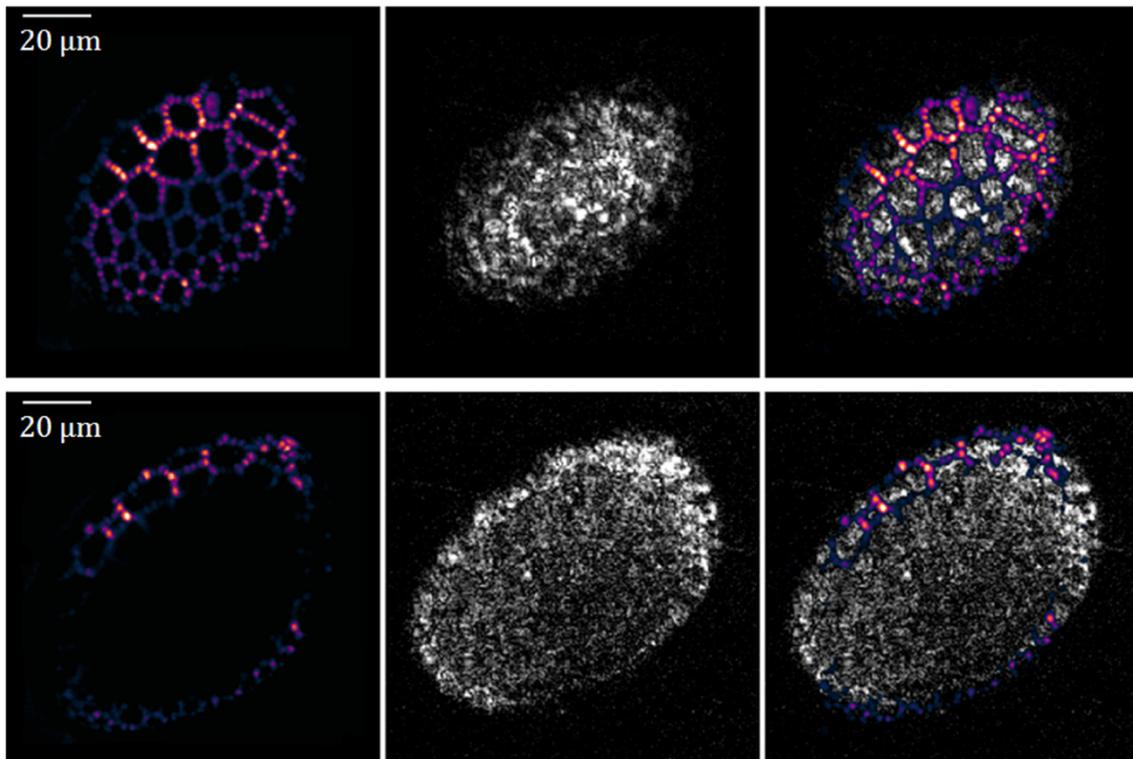


Figure V.28 : Images de microscopie de fluorescence (gauche), d'OCT plein champ (milieu) et combinées (droite) d'un grain de pollen de *Lilium Hevelia* obtenues à deux profondeurs de pénétration (0 μm et 20 μm).

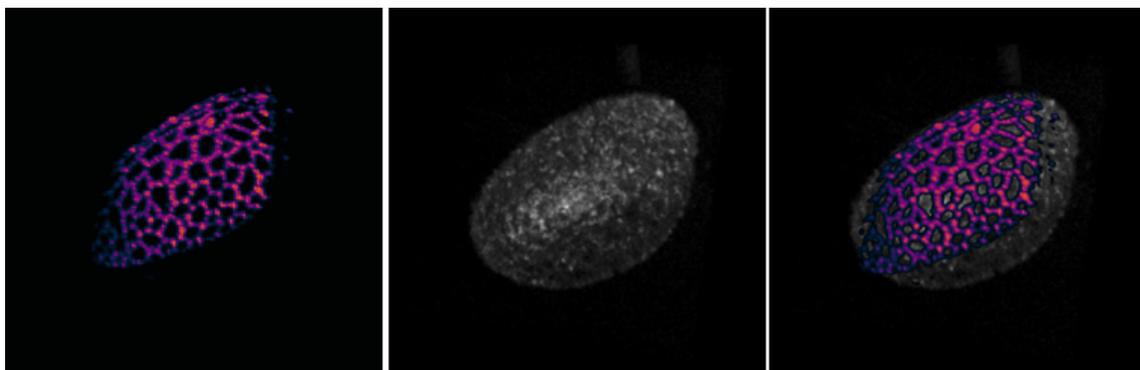


Figure V.29 : Images 3D de microscopie de fluorescence (gauche), d'OCT plein champ (milieu) et combinées (droite) d'un grain de pollen de Liliun Heveltia.

V.4 Conclusion

Les expériences effectuées sur différents types d'échantillons a permis de valider dans un premier temps le bon fonctionnement de notre dispositif de microscopie de fluorescence sous EDP, puis le potentiel de notre dispositif couplé d'OCT plein champ et de microscopie de fluorescence sous EDP. Des images de haute résolution spatiale (échelle micrométrique dans les trois directions pour les deux dispositifs) et de grande sensibilité ont pu ainsi être acquises sur un grain de pollen et comparées avec un très bon accord aux images obtenues avec un microscope électronique à balayage.

Les informations apportées par les deux techniques d'imagerie se sont avérées complémentaires, ce qui a permis de valider l'intérêt de la microscopie non linéaire pour l'ajout de nouveaux contrastes. Il serait désormais intéressant de confirmer ces observations sur des tissus biologiques, comme par exemple la cornée.

Rappelons que l'utilisation de miroirs galvanométriques pour le balayage 2D du faisceau d'excitation s'avère peu rapide dans notre cas (le balayage d'une image de 512×512 pixels requiert 1,28 s). De plus, cette excitation monopoint de l'échantillon n'est pas dans l'esprit de la technique d'OCT plein champ à laquelle nous nous couplons, puisque l'OCT plein champ ne requiert pas de balayage transverse du faisceau d'illumination. La mise en place d'un dispositif permettant d'exciter simultanément plusieurs points de l'échantillon serait donc une voie de développement pertinente dans le cadre d'une amélioration de la technique de combinaison.

Enfin, l'ajout de la microscopie de second harmonique au dispositif existant pourrait également être une voie de développement assez aisée, par simple ajout d'un filtre interférentiel sélectionnant la longueur d'onde moitié de la longueur d'onde d'excitation devant le tube photomultiplicateur. Cette technique complémentaire permettrait de détecter les propriétés d'organisation des tissus, en plus des informations délivrées par l'OCT plein champ et la microscopie de fluorescence sous EDP.

Conclusion générale

Le travail présenté dans ce manuscrit s'est inscrit dans la problématique de l'amélioration et de l'extension des capacités d'imagerie d'un dispositif de tomographie par cohérence optique plein champ. Dans cette perspective, plusieurs voies ont été explorées : amélioration de la profondeur d'imagerie et de la vitesse d'acquisition des images, développement de nouvelles sources lumineuses et ajout de nouveaux contrastes. Nous avons décrit les choix technologiques que nous avons faits, les développements réalisés ainsi que les résultats obtenus.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'amélioration de la profondeur d'imagerie au sein des tissus biologiques, qui dépend de l'absorption et de la diffusion de la lumière par les structures des tissus et donc de la longueur d'onde d'illumination. Nous avons développé un dispositif d'OCT plein champ permettant de réaliser simultanément des images tomographiques dans deux bandes spectrales distinctes, situées dans le très proche infrarouge (600 - 1000 nm) et le proche infrarouge (1000 - 1400 nm). Le dispositif d'imagerie devait répondre aux contraintes imposées par un spectre d'illumination large et pouvoir réaliser l'acquisition simultanée des deux voies. De nombreux tissus biologiques ont été testés et un gain notable en profondeur d'imagerie a été constaté dans les milieux diffusants pour la gamme spectrale proche infrarouge, ce qui est en accord avec les théories de la diffusion.

Par la suite, nous avons développé de nouvelles sources lumineuses spécifiques à l'OCT plein champ. Nous avons tout d'abord opté pour une solution basée sur des diodes électroluminescentes, émettant dans le proche infrarouge et combinées spectralement afin de réduire la cohérence temporelle de la source. Les choix technologiques réalisés, quant à la technique de combinaison et aux produits utilisés, ainsi que le développement d'un algorithme d'optimisation de la combinaison nous ont permis d'atteindre une résolution axiale et une sensibilité de détection proches de celle du dispositif utilisant une lampe à filament, mais avec une luminance trois fois plus importante. L'utilisation de cette source à des fins spectroscopiques a également été abordée, mais sans réel succès. Cependant, la technologie des diodes électroluminescentes étant en plein essor, ce type de source semble très prometteur pour l'OCT plein champ, et la microscopie en général. Dans un second temps, nous avons développé une source basée sur la fluorescence d'un cristal de Saphir dopé aux ions Titane. Ici aussi une amélioration très nette de la luminance a été obtenue, avec une résolution axiale et une sensibilité de détection quasiment équivalentes aux précédentes. Cette source a également été testée avec succès en fonctionnement impulsionnel dans le but de réaliser des applications *in vivo* : des impulsions d'une durée de 500 μ s à 2 ms, à un taux de répétition de quelques centaines d'Hertz et une énergie par impulsion d'environ 70 μ J, ont ainsi été obtenues.

En parallèle du développement de sources lumineuses, nous avons mené une étude théorique et expérimentale des deux principaux artefacts de mouvement que l'on peut rencontrer en OCT plein champ conventionnelle, leurs causes et les conséquences sur la

qualité d'imagerie. Dans le but de supprimer ces artefacts, un nouveau dispositif d'OCT plein champ a été développé, utilisant la source de fluorescence ainsi que deux caméras identiques permettant d'acquérir simultanément les deux sorties de l'interféromètre. L'étude théorique et expérimentale précédente a également été conduite sur ce dispositif, démontrant une réduction drastique des artefacts de mouvement. L'imagerie *in vivo* de tissus biologiques a enfin démontrée, conduisant à des résultats prometteurs pour ce dispositif, qui pourraient être largement améliorés par l'utilisation de caméras possédant un plus grand nombre de pixels.

Enfin, nos efforts se sont portés sur l'ajout de nouveaux contrastes en exploitant la réponse non-linéaire des tissus à une excitation lumineuse. Dans cette perspective, un dispositif de microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons a été développé et testé au laboratoire, avant d'être couplé au dispositif d'OCT plein champ existant. Ce couplage a nécessité l'utilisation d'objectifs de microscope d'ouverture numérique très élevée, ce qui est assez inhabituel en OCT plein champ et a conduit à de nombreuses modifications du dispositif existant. Un programme d'acquisition automatisée des données a également été développé. Les premières images couplées OCT plein champ / microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons ont été obtenues sur un échantillon simple (grain de pollen), validant la complémentarité des informations apportées par les deux techniques. Il reste désormais à éprouver le dispositif sur des tissus biologiques. Enfin, le couplage avec d'autres méthodes de microscopie non-linéaire, telles que la microscopie de second harmonique ou la microscopie CARS, pourrait être envisagé.

Au final, au cours de ces travaux, nous avons acquis une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans la limitation des performances de l'OCT plein champ. De nombreuses solutions technologiques ont été proposées pour minimiser voire s'affranchir de ces limitations. Nous disposons désormais d'un dispositif d'imagerie performant, conciliant l'imagerie structurelle apportée par l'OCT plein champ et les contrastes spécifiques apportés par la microscopie non-linéaire, dont il reste à éprouver les performances, pour parvenir à un outil de routine dont tous les aspects seront maîtrisés.

Annexe : Calcul de la résolution axiale d'un dispositif d'OCT plein champ

On considère un dispositif d'OCT plein champ et on cherche à calculer sa résolution axiale théorique, définie comme la largeur totale à mi-hauteur ou FWHM (*Full Width Half Maximum*) de l'interférogramme. On supposera au cours de ces calculs que l'interféromètre est parfaitement compensé en dispersion : les deux objectifs de microscope sont rigoureusement identiques, les deux milieux dans les bras de l'interféromètre sont d'indices identiques, uniforme.

On suppose de plus que la source utilisée pour éclairer l'interféromètre a une cohérence spatiale parfaite. On ne prend donc en compte que l'effet de la cohérence temporelle. Dans cette situation, et avec l'hypothèse que les objectifs de microscope sont rigoureusement identiques, ceux-ci n'interviennent pas dans le calcul de l'interférogramme. On peut alors travailler pour la suite de nos calculs avec le système simplifié suivant :

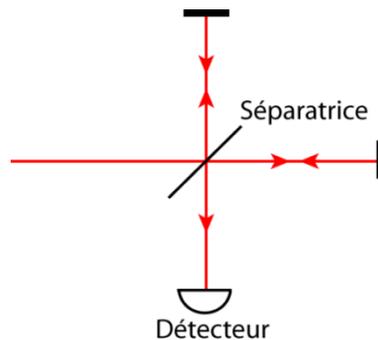


Figure A.1 : Dispositif simplifié pour calculer la résolution axiale du dispositif d'OCT plein champ dans le cas d'une cohérence spatiale parfaite

A.1 Raisonnement intuitif

• Source monochromatique

On considère tout d'abord une source monochromatique de pulsation ω . On considère le système simplifié représenté sur la Figure A.1.

La lumière issue de la source lumineuse est divisée par la séparatrice entre les bras de référence et échantillon. Ces deux faisceaux se recombinaient après réflexion et interfèrent.

On note :

- l_R la distance entre la séparatrice et le miroir du bras de référence
- β_R la constante de propagation dans le bras de référence

- E_R le champ électrique du faisceau issu du bras de référence après recombinaison¹
- l_S la distance entre la séparatrice et le miroir du bras échantillon
- β_S la constante de propagation dans le bras échantillon
- E_S le champ électrique du faisceau issu du bras échantillon après recombinaison

On peut alors écrire (en tenant compte de l'aller retour au sein de chaque bras) :

$$E_R = A_R \exp i(\omega t - 2\beta_R l_R) \text{ et } E_S = A_S \exp i(\omega t - 2\beta_S l_S) \quad (\text{A.1})$$

Dans l'espace libre, et en supposant toujours que les deux objectifs de microscope sont rigoureusement identiques, les constantes de propagation sont égales à :

$$\beta_R = \beta_S = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (\text{A.2})$$

L'intensité délivrée par le détecteur est alors la moyenne sur le temps d'intégration du détecteur (temps beaucoup plus long que la période d'oscillation des champs électriques), à savoir :

$$I = \langle |E_R + E_S|^2 \rangle = |A_R|^2 + |A_S|^2 + 2 \cos \left[\frac{4\pi}{\lambda} (l_R - l_S) \right] \quad (\text{A.3})$$

En notant $z = l_R - l_S$ la différence de longueur entre les deux bras de l'interféromètre, l'interférogramme d'une source monochromatique est une variation sinusoidale de période moitié de la longueur d'onde :

$$I(z) = I_R + I_S + 2 \cos \left[\frac{4\pi}{\lambda} z \right] \quad (\text{A.4})$$

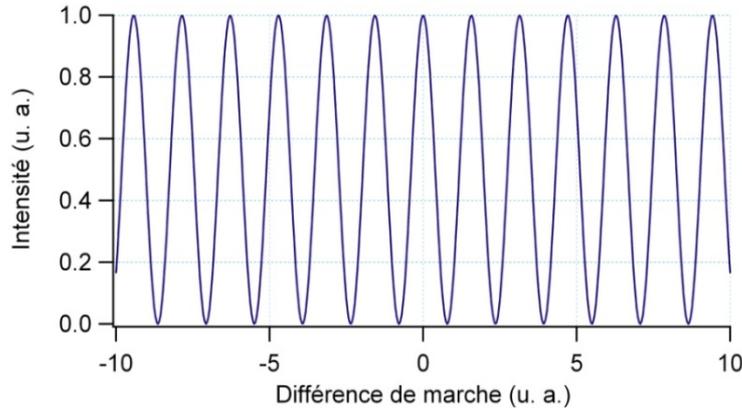


Figure A.2 : Interférogramme dans le cas d'une source monochromatique

• Source faiblement cohérente

On considère désormais le cas d'une source monochromatique faiblement cohérente. On peut modéliser cette source par une superposition de sources monochromatiques idéales. Ces sources sont incohérentes entre elles, on peut donc sommer directement leur intensité :

$$I \propto \text{Re} \left[\int_{-\infty}^{+\infty} E_S(\omega) E_R^*(\omega) \frac{d\omega}{2\pi} \right] \quad (\text{A.5})$$

$$\Rightarrow I(z) \propto \text{Re} \left[\int_{-\infty}^{+\infty} A_S(\omega) A_R^*(\omega) \exp(-2i\beta(\omega)z) \frac{d\omega}{2\pi} \right] \quad (\text{A.6})$$

¹ E_R et E_S représentent les champs électriques après division et recombinaison par la séparatrice. On s'affranchit ainsi du taux de la séparatrice et du déphasage qu'elle introduit

Où $S(\omega) = A_S(\omega)A_R^*(\omega)$ est la puissance spectrale de la source lumineuse

L'interférogramme, représenté sur la Figure A.3, est donc la somme de variation sinusoidale de fréquences différentes, qui entraîne un brouille des franges d'autant plus rapide que la source est large spectralement.

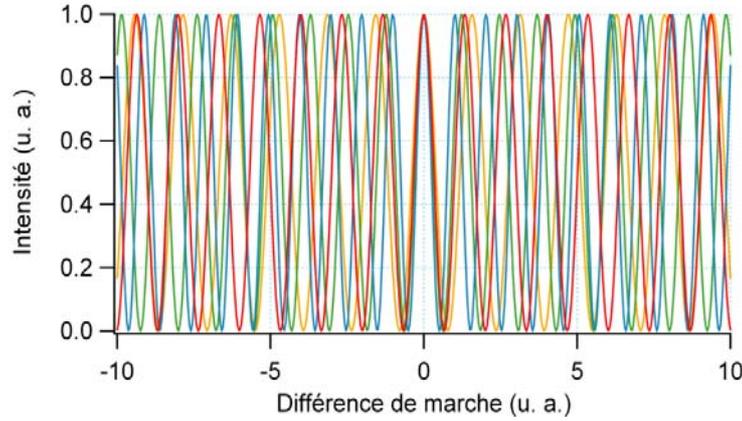


Figure A.3: Interférogramme dans le cas d'une faiblement cohérence

A.2 Calcul exact dans le cas d'un spectre gaussien

On suppose que la puissance spectrale de la source lumineuse est une gaussienne normalisée centrée autour de ν_0 et de largeur totale à mi-hauteur $\Delta\nu$.

$$S(\nu - \nu_0) = \frac{2}{\Delta\nu} \sqrt{\frac{\ln 2}{\pi}} \exp \left[-4 \ln 2 \frac{(\nu - \nu_0)^2}{\Delta\nu^2} \right] \quad (\text{A.7})$$

Dans l'équation (A.5), on développe la constante de propagation au premier ordre :

$$\beta(\omega) = \beta(\omega_0) + (\omega - \omega_0)\beta'(\omega_0)$$

On remplace alors dans l'expression de l'intensité détectée :

$$I(z) \propto \text{Re} \left[\exp(-2i\beta(\omega_0)z) \int_{-\infty}^{+\infty} S(\omega - \omega_0) \exp(-2i(\omega - \omega_0)\beta'(\omega_0)z) \frac{d(\omega - \omega_0)}{2\pi} \right] \quad (\text{A.8})$$

Cette équation est une application du théorème de Wiener-Khintchin la fonction d'auto-corrélation du champ électrique est la transformée de Fourier de la densité spectrale de puissance de la source.

On note $\gamma(\tau)$ le degré complexe de cohérence temporelle de la source, défini d'après le théorème de Wiener-Khintchin par :

$$\gamma(\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\nu) \exp(-i2\pi\nu\tau) d\nu = \exp \left[- \left(\frac{\pi\Delta\nu\tau}{2\sqrt{\ln 2}} \right)^2 \right] \exp(-i2\pi\nu_0\tau) \quad (\text{A.9})$$

L'intensité détectée est alors :

$$I(\tau) = I_R + I_S + 2\sqrt{I_R I_S} \text{Re}[\gamma(\tau)]$$

$$I(\tau) = I_R + I_S + 2\sqrt{I_R I_S} \cos(2\pi\nu_0\tau) \exp \left[- \frac{\pi^2\tau^2\Delta\nu^2}{4\ln 2} \right] \quad (\text{A.10})$$

← Enveloppe de l'interférogramme

Ainsi, lorsque la source possède une grande largeur spectrale, l'enveloppe des franges est très étroite. L'amplitude du terme d'interférences diminue très vite avec la différence de marche entre les deux bras de l'interféromètre : les interférences sont donc présentes autour de la différence de marche nulle ou inférieure à une valeur appelée **résolution axiale** Δz de l'interféromètre, définie comme la largeur totale à mi-hauteur de l'enveloppe de l'interférogramme :

$$\exp\left[-\frac{\pi^2 \Delta v^2 \Delta z^2}{4 \ln 2 c^2}\right] = \frac{1}{2} \Leftrightarrow \frac{\pi^2 \Delta v^2 \Delta z^2}{4 \ln 2 c^2} = \ln 2$$

$$\Delta z = \frac{2 \ln 2 c}{\pi \Delta v} = \frac{2 \ln 2 \lambda_0^2}{\pi \Delta \lambda}$$

Liste des publications et conférences de l'auteur relatives à ce manuscrit

Articles publiés dans des revues avec comités de lecture :

- P.1** D. SACCHET, J. MOREAU, P. GEORGES, A. DUBOIS
"Simultaneous dual-band ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography"
Optics Express, Volume 16, Issue 24, pp. 19434-19446 (Novembre 2008)
- P.2** D. SACCHET, M. BRZEZINSKI, J. MOREAU, P. GEORGES, A. DUBOIS
"Motion artifact suppression in full-field optical coherence tomography"
Applied Optics, Volume 49, Issue 9, pp. 1480-1488 (2010)

Communications à des congrès avec publication des actes :

- C.1** D. SACCHET, J. MOREAU, P. GEORGES, A. DUBOIS
"Multi-band ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography"
Conférence orale : European Conference on Biomedical Optics (ECBO), Munich (Juin 2009)
- C.2** D. SACCHET, J. MOREAU, P. GEORGES, A. DUBOIS
"Study and suppression of motion artifacts in full-field optical coherence tomography"
Conférence orale : SPIE Photonics Europe, Bruxelles (Avril 2010)
- C.3** D. SACCHET, J. MOREAU, P. GEORGES, A. DUBOIS
"Full-field optical coherence tomography at 800 nm and 1300 nm simultaneously"
Poster : SPIE Photonics Europe, Bruxelles (Avril 2010)

Communications à des congrès sans publication des actes :

- C'.1** D. SACCHET, J. MOREAU, P. GEORGES, A. DUBOIS
"Tomographie par cohérence optique plein champ à deux longueurs d'onde"
Conférence orale : Imagerie Optique Non Conventiionnelle (JIONC), Paris (Mars 2009)
- C'.2** D. SACCHET, J. MOREAU, P. GEORGES, A. DUBOIS
"Dual-band ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography"
Poster : Focus on Microscopy (FOM), Krakow (Avril 2009)

C'.3 D. SACCHET, J. MOREAU, P. GEORGES, A. DUBOIS

“Tomographie par cohérence optique plein champ sur deux gammes de longueurs d’onde”

Conférence orale : Diagnostique et Imagerie Optiques en Médecine (OptDiag), Paris (Mai 2009)

C'.4 D. SACCHET, J. MOREAU, P. GEORGES, A. DUBOIS

“Tomographie par cohérence optique plein champ à deux longueurs d’onde”

Conférence orale : Imagerie pour les Sciences du Vivant et la Médecine (Imvie), Mulhouse (Juin 2009)

C'.5 G MONERON, K. GRIEVE, E. GUIOT, J. MOREAU, C. BOCCARA, D. SACCHET, P. GEORGES, A. DUBOIS

“Multimodal full-field optical coherence tomography”

Conférence orale : Biomedical Optics (BioMed), Miami (Avril 2010)

Références bibliographiques

- [1] D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito, and J. G. Fujimoto, "*Optical Coherence Tomography*", *Science*, **254** (5035), pp. 1178-1181 (1991)
- [2] E. A. Swanson, J. A. Izatt, M. R. Hee, D. Huang, C. P. Lin, J. S. Schuman, C. A. Puliafito, and J. G. Fujimoto, "*In vivo retinal imaging by optical coherence tomography*", *Opt. Lett.*, **18** (21), pp. 1864-1866 (1993)
- [3] J. A. Izatt, M. R. Hee, E. A. Swanson, C. P. Lin, D. Huang, J. S. Schuman, C. A. Puliafito, and J. G. Fujimoto, "*Micrometer-scale resolution imaging of the anterior eye in-vivo with optical coherence tomography*", *Archives of Ophthalmology*, **112** (12), pp. 1584-1589 (1994)
- [4] J. S. Schuman, M. R. Hee, C. A. Puliafito, C. Wong, T. Pedutkloizman, C. P. Lin, E. Hertzmark, J. A. Izatt, E. A. Swanson, and J. G. Fujimoto, "*Quantification of nerve-fiber layer thickness in normal and glaucomatous eyes using optical coherence tomography*", *Archives of Ophthalmology*, **113** (5), pp. 586-596 (1995)
- [5] C. A. Puliafito, M. R. Hee, C. P. Lin, E. Reichel, J. S. Schuman, J. S. Duker, J. A. Izatt, E. A. Swanson, and J. G. Fujimoto, "*Imaging of macular diseases with optical coherence tomography*", *Ophthalmology*, **102** (2), pp. 217-229 (1995)
- [6] H. Liang, M. Cid, R. Cucu, G. Dobre, A. Podoleanu, J. Pedro, and D. Saunders, "*En-face optical coherence tomography : a novel application of non-invasive imaging to art conservation*", *Opt. Express*, **13** (16), pp. 6133-6144 (2005)
- [7] R. B. Rosen, M. Hathaway, J. Rogers, J. Pedro, P. Garcia, P. Laissue, G. M. Dobre, and A. G. Podoleanu, "*Multidimensional en-Face OCT imaging of the retina*", *Opt. Express*, **17** (5), pp. 4112-4133 (2009)
- [8] A. F. Fercher, W. Drexler, C. K. Hitzenberger, and T. Lasser, "*Optical coherence tomography - principles and applications*", *Rep. Prog. Phys.*, **66** (2), pp. 239-303 (2003)
- [9] M. Bashkansky, M. D. Duncan, L. Goldberg, J. P. Koplou, and J. Reintjes, "*Characteristics of a Yb-doped superfluorescent fiber source for use in optical coherence tomography*", *Opt. Express*, **3** (8), pp. 305-310 (1998)
- [10] B. E. Bouma, G. J. Tearney, I. P. Bilinsky, B. Golubovic, and J. G. Fujimoto, "*Self-phase-modulated Kerr-lens mode-locked Cr:forsterite laser source for optical coherence tomography*", *Opt. Lett.*, **21** (22), pp. 1839-1841 (1996)
- [11] T. H. Ko, D. C. Adler, J. G. Fujimoto, D. Mamedov, V. Prokhorov, V. Shidlovski, and S. Yakubovich, "*Ultra-high resolution optical coherence tomography imaging with a broadband superluminescent diode light source*", *Opt. Express*, **12** (10), pp. 2112-2119 (2004)
- [12] B. Bouma, G. J. Tearney, S. A. Boppart, M. R. Hee, M. E. Brezinski, and J. G. Fujimoto, "*High-resolution optical coherence tomographic imaging using a mode-locked Ti:Al₂O₃ laser source*", *Opt. Lett.*, **20** (13), pp. 1486-1488 (1995)
- [13] W. Drexler, U. Morgner, F. X. Kartner, C. Pitris, S. A. Boppart, X. D. Li, E. P. Ippen, and J. G. Fujimoto, "*In vivo ultrahigh-resolution optical coherence tomography*", *Optics Letters*, **24** (17), pp. 1221-1223 (1999)

- [14] B. Povazay, K. Bizheva, A. Unterhuber, B. Hermann, H. Sattmann, A. F. Fercher, W. Drexler, A. Apolonski, W. J. Wadsworth, J. C. Knight, P. S. J. Russell, M. Vetterlein, and E. Scherzer, "Submicrometer axial resolution optical coherence tomography", *Opt. Lett.*, **27** (20), pp. 1800-1802 (2002)
- [15] A. D. Aguirre, N. Nishizawa, J. G. Fujimoto, W. Seitz, M. Lederer, and D. Kopf, "Continuum generation in a novel photonic crystal fiber for ultrahigh resolution optical coherence tomography at 800 nm and 1300 nm", *Opt. Express*, **14** (3), pp. 1145-1160 (2006)
- [16] J. M. Schmitt, S. L. Lee, and K. M. Yung, "An optical coherence microscope with enhanced resolving power in thick tissue", *Opt. Comm.*, **142** (4-6), pp. 203-207 (1997)
- [17] L. Vabre, A. Dubois, and A. C. Boccara, "Thermal-light full-field optical coherence tomography", *Opt. Lett.*, **27** (7), pp. 530-532 (2002)
- [18] W. Drexler, U. Morgner, R. K. Ghanta, F. X. Kärtner, J. S. Schuman, and J. G. Fujimoto, "Ultrahigh-resolution ophthalmic optical coherence tomography", *Nat. Med.*, **7**, pp. 502-507 (2001)
- [19] B. C. Wilson, and S. L. Jacques, "Optical reflectance and transmittance of tissues - principles and applications", *IEEE J. Quantum Electron.*, **26** (12), pp. 2186-2199 (1990)
- [20] T. J. Farrell, M. S. Patterson, and B. Wilson, "A diffusion-theory model of spatially-resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical-properties in vivo", *Med. Phys.*, **19** (4), pp. 879-888 (1992)
- [21] G. Zonios, I. Bassukas, and A. Dimou, "Comparative evaluation of two simple diffuse reflectance models for biological tissue applications", *Appl. Optics*, **47** (27), pp. 4965-4973 (2008)
- [22] X. J. Wang, T. E. Milner, and J. S. Nelson, "Characterization of fluid-flow velocity by optical Doppler tomography", *Opt. Lett.*, **20** (11), pp. 1337-1339 (1995)
- [23] V. Gusmeroli, and M. Martinelli, "Distributed laser Doppler-velocimeter", *Opt. Lett.*, **16** (17), pp. 1358-1360 (1991)
- [24] Z. Chen, T. E. Milner, D. Dave, and J. S. Nelson, "Optical Doppler tomographic imaging of fluid flow velocity in highly scattering media", *Opt. Lett.*, **22** (1), pp. 64-66 (1997)
- [25] J. A. Izatt, M. D. Kulkarni, S. Yazdanfar, J. K. Barton, and A. J. Welch, "In vivo bidirectional color Doppler flow imaging of picoliter blood volumes using optical coherence tomography", *Opt. Lett.*, **22** (18), pp. 1439-1441 (1997)
- [26] V. Westphal, S. Yazdanfar, A. M. Rollins, and J. A. Izatt, "Real-time, high velocity-resolution color Doppler optical coherence tomography", *Opt. Lett.*, **27** (1), pp. 34-36 (2002)
- [27] S. G. Demos, A. J. Papadopoulos, H. Savage, A. S. Heerdt, S. Schantz, and R. R. Alfano, "Polarization filter for biomedical tissue optical imaging", *Photochem. Photobiol.*, **66** (6), pp. 821-825 (1997)
- [28] R. P. Hemenger, "Birefringence of a medium of tenous parallel cylinders", *Appl. Optics*, **28** (18), pp. 4030-4034 (1989)
- [29] J. F. de Boer, T. E. Milner, M. J. C. van Gemert, and J. S. Nelson, "Two-dimensional birefringence imaging in biological tissue by polarization-sensitive optical coherence tomography", *Opt. Lett.*, **22** (12), pp. 934-936 (1997)
- [30] S. L. Jiao, and L. H. V. Wang, "Two-dimensional depth-resolved Mueller matrix of biological tissue measured with double-beam polarization-sensitive optical coherence tomography", *Opt. Lett.*, **27** (2), pp. 101-103 (2002)
- [31] G. Moneron, A. L. Boccara, and A. Dubois, "Polarization-sensitive full-field optical coherence tomography", *Opt. Lett.*, **32** (14), pp. 2058-2060 (2007)

- [32] M. J. Everett, K. Schoenenberger, B. W. Colston, and L. B. Da Silva, "Birefringence characterization of biological tissue by use of optical coherence tomography", *Opt. Lett.*, **23** (3), pp. 228-230 (1998)
- [33] K. Schoenenberger, B. W. Colston, D. J. Maitland, L. B. Da Silva, and M. J. Everett, "Mapping of Birefringence and Thermal Damage in Tissue by use of Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography", *Appl. Optics*, **37** (25), pp. 6026-6036 (1998)
- [34] G. Yao, and L. V. Wang, "Two-dimensional depth-resolved Mueller matrix characterization of biological tissue by optical coherence tomography", *Opt. Lett.*, **24** (8), pp. 537-539 (1999)
- [35] C. E. Saxer, J. F. de Boer, B. H. Park, Y. H. Zhao, Z. P. Chen, and J. S. Nelson, "High-speed fiber-based polarization-sensitive optical coherence tomography of in vivo human skin", *Opt. Lett.*, **25** (18), pp. 1355-1357 (2000)
- [36] R. A. Leitgeb, W. Drexler, A. Unterhuber, B. Hermann, T. Bajraszewski, T. Le, A. Stingl, and A. F. Fercher, "Ultrahigh resolution Fourier domain optical coherence tomography", *Opt. Express*, **12** (10), pp. 2156-2165 (2004)
- [37] A. F. Fercher, C. K. Hitzenberger, G. Kamp, and S. Y. Elzaiat, "Measurement of Intraocular Distances by Backscattering Spectral Interferometry", *Opt. Comm.*, **117** (1-2), pp. 43-48 (1995)
- [38] M. Wojtkowski, V. J. Srinivasan, T. H. Ko, J. G. Fujimoto, A. Kowalczyk, and J. S. Duker, "Ultrahigh-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation", *Opt. Express*, **12** (11), pp. 2404-2422 (2004)
- [39] N. Nassif, B. Cense, B. Hyle Park, S. H. Yun, T. C. Chen, B. E. Bouma, G. J. Tearney, and J. F. de Boer, "In vivo human retinal imaging by ultrahigh-speed spectral domain optical coherence tomography", *Opt. Lett.*, **29** (5), pp. 480-482 (2004)
- [40] S. R. Chinn, E. A. Swanson, and J. G. Fujimoto, "Optical coherence tomography using a frequency-tunable optical source", *Opt. Lett.*, **22** (5), pp. 340-342 (1997)
- [41] S. H. Yun, G. J. Tearney, J. F. de Boer, N. Iftimia, and B. E. Bouma, "High-speed optical frequency-domain imaging", *Opt. Express*, **11** (22), pp. 2953-2963 (2003)
- [42] M. A. Choma, M. V. Sarunic, C. H. Yang, and J. A. Izatt, "Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography", *Opt. Express*, **11** (18), pp. 2183-2189 (2003)
- [43] R. Leitgeb, C. K. Hitzenberger, and A. F. Fercher, "Performance of fourier domain vs. time domain optical coherence tomography", *Opt. Express*, **11** (8), pp. 889-894 (2003)
- [44] J. F. de Boer, B. Cense, B. H. Park, M. C. Pierce, G. J. Tearney, and B. E. Bouma, "Improved signal-to-noise ratio in spectral-domain compared with time-domain optical coherence tomography", *Opt. Lett.*, **28** (21), pp. 2067-2069 (2003)
- [45] E. Beaurepaire, A. C. Boccara, M. Lebec, L. Blanchot, and H. Saint-Jalmes, "Full-field optical coherence microscopy", *Opt. Lett.*, **23** (4), pp. 244-246 (1998)
- [46] B. Laude, A. De Martino, B. Drevillon, L. Benattar, and L. Schwartz, "Full-field optical coherence tomography with thermal light", *Appl. Optics*, **41** (31), pp. 6637-6645 (2002)
- [47] A. Dubois, L. Vabre, A. C. Boccara, and E. Beaurepaire, "High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope", *Appl. Optics*, **41** (4), pp. 805-812 (2002)
- [48] A. Dubois, K. Grieve, G. Moneron, R. Lecaque, L. Vabre, and C. Boccara, "Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography", *Appl. Optics*, **43** (14), pp. 2874-2883 (2004)
- [49] J. Na, W. J. Choi, E. S. Choi, S. Y. Ryu, and B. H. Lee, "Image restoration method based on Hilbert transform for full-field optical coherence tomography", *Appl. Optics*, **47** (3), pp. 459-466 (2008)

- [50] J. A. Izatt, M. R. Hee, G. M. Owen, E. A. Swanson, and J. G. Fujimoto, "Optical coherence microscopy in scattering media", *Opt. Lett.*, **19** (8), pp. 590-592 (1994)
- [51] A. Dubois, A. C. Boccara, and M. Lebec, "Real-time reflectivity and topography imagery of depth-resolved microscopic surfaces", *Opt. Lett.*, **24** (5), pp. 309-311 (1999)
- [52] I. Zeylikovich, "Short coherence length produced by a spatial incoherent source applied for the linnik-type interferometer", *Appl. Optics*, **47** (12), pp. 2171-2177 (2008)
- [53] A. F. Fercher, C. K. Hitzenberger, W. Drexler, G. Kamp, and H. Sattmann, "In-vivo optical coherence tomography", *Am. J. Ophthalmol.*, **116** (1), pp. 113-115 (1993)
- [54] J. G. Fujimoto, M. E. Brezinski, G. J. Tearney, S. A. Boppart, B. Bouma, M. R. Hee, J. F. Southern, and E. A. Swanson, "Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography", *Nature Medicine*, **1** (9), pp. 970-972 (1995)
- [55] J. G. Fujimoto, S. A. Boppart, G. J. Tearney, B. E. Bouma, C. Pitris, and M. E. Brezinski, "High resolution in vivo intra-arterial imaging with optical coherence tomography", *Heart*, **82** (2), pp. 128-133 (1999)
- [56] S. K. Dubey, T. Anna, C. Shakher, and D. S. Mehta, "Fingerprint detection using full-field swept-source optical coherence tomography", *Applied Physics Letters*, **91** (18), pp. 3 (2007)
- [57] K. Grieve, A. Dubois, M. Simonutti, M. Paques, J. Sahel, J. F. Le Gargasson, and C. Boccara, "In vivo anterior segment imaging in the rat eye with high speed white light full-field optical coherence tomography", *Opt. Express*, **13** (16), pp. 6286-6295 (2005)
- [58] K. Grieve, M. Paques, A. Dubois, J. Sabel, C. Boccara, and J. F. L. Gargasson, "Ocular Tissue Imaging Using Ultrahigh-Resolution Full-Field Optical Coherence Tomography", *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **45** (11), pp. 4126-4131 (2004)
- [59] J. Welzel, E. Lankenau, R. Birngruber, and R. Engelhardt, "Optical coherence tomography of the human skin", *J. Am. Acad. Dermatol.*, **37** (6), pp. 958-963 (1997)
- [60] B. Colston, U. Sathyam, L. DaSilva, M. Everett, P. Stroeve, and L. Otis, "Dental OCT", *Opt. Express*, **3** (6), pp. 230-238 (1998)
- [61] J. A. Izatt, M. D. Kulkarni, H. W. Wang, K. Kobayashi, and M. V. Sivak, "Optical coherence tomography and microscopy in gastrointestinal tissues", *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, **2** (4), pp. 1017-1028 (1996)
- [62] G. J. Tearney, M. E. Brezinski, B. E. Bouma, S. A. Boppart, C. Pitris, J. F. Southern, and J. G. Fujimoto, "In vivo endoscopic optical biopsy with optical coherence tomography", *Science*, **276** (5321), pp. 2037-2039 (1997)
- [63] J. P. Dunkers, R. S. Parnas, C. G. Zimba, R. C. Peterson, K. M. Flynn, J. G. Fujimoto, and B. E. Bouma, "Optical coherence tomography of glass reinforced polymer composites," in *Symposium M on Advances in Polymer Matrix Composites - Microscopic to Macroscopic, at the Fall 1997 Materials-Research-Society Meeting*(Elsevier Sci Ltd, Boston, Massachusetts, 1999), pp. 139-145.
- [64] Y. M. Wang, Y. H. Zhao, J. S. Nelson, Z. P. Chen, and R. S. Windeler, "Ultrahigh-resolution optical coherence tomography by broadband continuum generation from a photonic crystal fiber", *Opt. Lett.*, **28** (3), pp. 182-184 (2003)
- [65] M. C. Stumpf, S. C. Zeller, A. Schlatter, T. Okuno, T. Südmeyer, and U. Keller, "Compact Er:Yb:glass-laser-based supercontinuum source for high-resolution optical coherence tomography", *Opt. Express*, **16** (14), pp. 10572-10579 (2008)
- [66] G. J. Tearney, B. E. Bouma, S. A. Boppart, B. Golubovic, E. A. Swanson, and J. G. Fujimoto, "Rapid acquisition of in vivo biological images by use of optical coherence tomography", *Opt. Lett.*, **21** (17), pp. 1408-1410 (1996)

- [67] M. Todorovic, S. Jiao, J. Ai, D. Pereda-Cubián, G. Stoica, and L. V. Wang, "*In vivo burn imaging using Mueller optical coherence tomography*", *Opt. Express*, **16** (14), pp. 10279-10284 (2008)
- [68] H. J. van Staveren, C. J. M. Moes, J. van Marie, S. A. Prahl, and M. J. C. van Gemert, "*Light scattering in Intralipid-10% in the wavelength range of 400-1100 nm*", *Appl. Optics*, **30** (31), pp. 4507-4514 (1991)
- [69] S. T. Flock, S. L. Jacques, B. C. Wilson, W. M. Star, and M. J. C. Vangemert, "*Optical-Properties of Intralipid - a Phantom Medium for Light-Propagation Studies*", *Lasers in Surgery and Medicine*, **12** (5), pp. 510-519 (1992)
- [70] J. M. Schmitt, A. Knüttel, M. Yadlowsky, and M. A. Eckhaus, "*Optical-Coherence Tomography of a Dense Tissue - Statistics of Attenuation and Backscattering*", *Physics in Medicine and Biology*, **39** (10), pp. 1705-1720 (1994)
- [71] F. Spoler, S. Kray, P. Grychtol, B. Hermes, J. Bornemann, M. Forst, and H. Kurz, "*Simultaneous dual-band ultra-high resolution optical coherence tomography*", *Opt. Express*, **15** (17), pp. 10832-10841 (2007)
- [72] U. Morgner, W. Drexler, F. X. Kartner, X. D. Li, C. Pitris, E. P. Ippen, and J. G. Fujimoto, "*Spectroscopic optical coherence tomography*", *Opt. Lett.*, **25** (2), pp. 111-113 (2000)
- [73] D. C. Adler, T. H. Ko, P. R. Herz, and J. G. Fujimoto, "*Optical coherence tomography contrast enhancement using spectroscopic analysis with spectral autocorrelation*", *Opt. Express*, **12** (22), pp. 5487-5501 (2004)
- [74] D. J. Faber, E. G. Mik, M. C. G. Aalders, and T. G. van Leeuwen, "*Toward assessment of blood oxygen saturation by spectroscopic optical coherence tomography*", *Opt. Lett.*, **30** (9), pp. 1015-1017 (2005)
- [75] A. Dubois, J. Moreau, and C. Boccara, "*Spectroscopic ultrahigh-resolution full-field optical coherence microscopy*", *Opt. Express*, **16** (21), pp. 17082-17091 (2008)
- [76] W. Y. Oh, B. E. Bouma, N. Iftimia, S. H. Yun, R. Yelin, and G. J. Tearney, "*Ultrahigh-resolution full-field optical coherence microscopy using InGaAs camera*", *Opt. Express*, **14** (2), pp. 726-735 (2006)
- [77] A. Dubois, G. Moneron, and C. Boccara, "*Thermal-light full-field optical coherence tomography in the 1.2 μ m wavelength region*", *Opt. Comm.*, **266** (2), pp. 738-743 (2006)
- [78] J. C. Lai, Z. H. Li, C. Y. Wang, and A. Z. He, "*Experimental measurement of the refractive index of biological tissue's by total internal reflection*", *Appl. Optics*, **44** (10), pp. 1845-1849 (2005)
- [79] S. Labiau, G. David, S. Gigan, and A. C. Boccara, "*Defocus test and defocus correction in full-field optical coherence tomography*", *Opt. Lett.*, **34** (10), pp. 1576-1578 (2009)
- [80] K. G. Larkin, "*Efficient nonlinear algorithm for envelope detection in white light interferometry*", *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, **13** (4), pp. 832-843 (1996)
- [81] G. M. Hale, and M. R. Querry, "*Optical Constants of Water in the 200-nm to 200- μ m Wavelength Region*", *Appl. Optics*, **12** (3), pp. 555-563 (1973)
- [82] Y. Coello, B. Xu, T. L. Miller, V. V. Lozovoy, and M. Dantus, "*Group-velocity dispersion measurements of water, seawater, and ocular components using multiphoton intrapulse interference phase scan*", *Appl. Optics*, **46** (35), pp. 8394-8401 (2007)
- [83] M. Blavier, "Développement et application de la tomographie par cohérence optique plein champ pour l'étude du matériau papier," (Thèse de doctorat de l'Université Paris 6 - Pierre et Marie Curie, Soutenue le 8 Janvier 2008).

- [84] N. Congdon, B. O'Colmain, C. C. W. Klaver, R. Klein, B. Munoz, D. S. Friedman, J. Kempen, H. R. Taylor, P. Mitchell, L. Hyman, and G. Eye Dis Prevalence Res, "*Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States*", *Archives of Ophthalmology*, **122** (4), pp. 477-485 (2004)
- [85] H. A. Quigley, and A. T. Broman, "*The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020*", *Br. J. Ophthalmol.*, **90** (3), pp. 262-267 (2006)
- [86] M. C. Leske, A. Heijl, M. Hussein, B. Bengtsson, L. Hyman, E. Komaroff, and G. Early Manifest Glaucoma Trial, "*Factors for glaucoma progression and the effect of treatment - The Early Manifest Glaucoma Trial*", *Archives of Ophthalmology*, **121** (1), pp. 48-56 (2003)
- [87] A. Dubois, "*Effects of phase change on reflection in phase-measuring interference microscopy*", *Appl. Optics*, **43** (7), pp. 1503-1507 (2004)
- [88] R. Leitgeb, M. Wojtkowski, A. Kowalczyk, C. K. Hitzenberger, M. Sticker, and A. F. Fercher, "*Spectral measurement of absorption by spectroscopic frequency-domain optical coherence tomography*", *Opt. Lett.*, **25** (11), pp. 820-822 (2000)
- [89] B. Hermann, K. Bizheva, A. Unterhuber, B. Považay, H. Sattmann, L. Schmetterer, A. Fercher, and W. Drexler, "*Precision of extracting absorption profiles from weakly scattering media with spectroscopic time-domain optical coherence tomography*", *Opt. Express*, **12** (8), pp. 1677-1688 (2004)
- [90] C. Xu, D. Marks, M. Do, and S. Boppart, "*Separation of absorption and scattering profiles in spectroscopic optical coherence tomography using a least-squares algorithm*", *Opt. Express*, **12** (20), pp. 4790-4803 (2004)
- [91] A. M. Kowalewicz, T. Ko, I. Hartl, J. G. Fujimoto, M. Pollnau, and R. P. Salathe, "*Ultra-high resolution optical coherence tomography using a superluminescent light source*", *Opt. Express*, **10** (7), pp. 349-353 (2002)
- [92] C.-C. Tsai, T.-H. Chen, Y.-S. Lin, Y.-T. Wang, W. Chang, K.-Y. Hsu, Y.-H. Chang, P.-K. Hsu, D.-Y. Jheng, K.-Y. Huang, E. Sun, and S.-L. Huang, "*Ce³⁺:YAG double-clad crystal-fiber-based optical coherence tomography on fish cornea*", *Opt. Lett.*, **35** (6), pp. 811-813 (2010)
- [93] P. F. Moulton, "*Spectroscopic and Laser Characteristics of Ti-Al₂O₃*", *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics*, **3** (1), pp. 125-133 (1986)
- [94] P. Albers, E. Stark, and G. Huber, "*Continuous-Wave Laser Operation and Quantum Efficiency of Titanium-Doped Sapphire*", *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics*, **3** (1), pp. 134-139 (1986)
- [95] A. M. Rollins, M. D. Kulkarni, S. Yazdanfar, R. Ung-arunyawee, and J. A. Izatt, "*In vivo video rate optical coherence tomography*", *Opt. Express*, **3** (6), pp. 219-229 (1998)
- [96] E. A. Swanson, D. Huang, M. R. Hee, J. G. Fujimoto, C. P. Lin, and C. A. Puliafito, "*High-Speed Optical Coherence Domain Reflectometry*", *Opt. Lett.*, **17** (2), pp. 151-153 (1992)
- [97] Y. Watanabe, and M. Sato, "*Three-dimensional wide-field optical coherence tomography using an ultrahigh-speed CMOS camera*", *Opt. Comm.*, **281** (7), pp. 1889-1895 (2008)
- [98] G. Moneron, A. C. Boccara, and A. Dubois, "*Stroboscopic ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography*", *Opt. Lett.*, **30** (11), pp. 1351-1353 (2005)
- [99] M. S. Hrebesh, R. Dabu, and M. Sato, "*In vivo imaging of dynamic biological specimen by real-time single-shot full-field optical coherence tomography*", *Opt. Comm.*, **282** (4), pp. 674-683 (2009)
- [100] R. J. Aldifi, W. J. MacIntyre, and R. Haaga, "*The effects of biological motion in CT resolution*", *Am. J. Radiol.*, **127** (1), pp. 11-15 (1976)
- [101] M. L. Wood, and R. M. Henkelman, "*NMR image artifact from periodic motion*", *Med. Phys.*, **12** (1), pp. 143-151 (1985)

- [102] S. H. Yun, G. J. Tearney, J. F. de Boer, and B. E. Bouma, "Motion artifacts in optical coherence tomography with frequency-domain ranging", *Opt. Express*, **12** (13), pp. 2977-2998 (2004)
- [103] M. Akiba, K. P. Chan, and N. Tanno, "Full-field optical coherence tomography by two-dimensional heterodyne detection with a pair of CCD cameras", *Opt. Lett.*, **28** (10), pp. 816-818 (2003)
- [104] K. D. Rao, M. A. Choma, S. Yazdanfar, A. M. Rollins, and J. A. Izatt, "Molecular contrast in optical coherence tomography by use of a pump probe technique", *Opt. Lett.*, **28** (5), pp. 340-342 (2003)
- [105] T. M. Lee, A. L. Oldenburg, S. Sitafalwalla, D. L. Marks, W. Luo, F. J.-J. Toublan, K. S. Suslick, and S. A. Boppart, "Engineered microsphere contrast agents for optical coherence tomography", *Opt. Lett.*, **28** (17), pp. 1546-1548 (2003)
- [106] M. Muller, J. Squier, K. R. Wilson, and G. J. Brakenhoff, "3D microscopy of transparent objects using third-harmonic generation", *Journal of Microscopy*, **191** (4), pp. 266-274 (1998)
- [107] F. W. D. Rost, "Fluorescence: physics and chemistry", *Fluorescence microscopy*, **1** (1), pp. 11-35 (1992)
- [108] M. Göpper-Mayer, "Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen", *Ann. Phys.*, **9**, pp. 273-295 (1931)
- [109] A. Fischer, C. Cremer, and E. H. K. Stelzer, "Fluorescence of coumarins and xanthenes after 2-photon absorption with a pulsed Titanium-Sapphire laser", *Appl. Optics*, **34** (12), pp. 1989-2003 (1995)
- [110] C. Xu, and W. W. Webb, "Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm", *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics*, **13** (3), pp. 481-491 (1996)
- [111] W. Kaiser, and C. G. B. Garrett, "Two-photon excitation in $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ ", *Physical Review Letters*, **7**, pp. 229-231 (1961)
- [112] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy", *Science*, **248** (4951), pp. 73-76 (1990)
- [113] A. H. Buist, M. Müller, J. Squier, and G. J. Brakenhoff, "Real time two-photon absorption microscopy using multipoint excitation", *Journal of Microscopy*, **192** (2), pp. 217-226 (1998)
- [114] V. E. Centonze, and J. G. White, "Multiphoton excitation provides optical sections from deeper scattering specimens than confocal imaging", *Biophysical Journal*, **75**, pp. 2015-2024 (1998)
- [115] J. M. Vroom, K. J. D. Grauw, H. C. Gerritsen, D. J. Bradshaw, P. D. Marsch, G. K. Watson, J. J. Birmingham, and C. Allisson, "Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy", *Appl. and Environn. Microbiol.*, **65**, pp. 3502-3511 (1999)
- [116] G. C. Cianci, J. R. Wu, and K. M. Berland, "Saturation modified point spread functions in two-photon microscopy", *Microscopy Research and Technique*, **64** (2), pp. 135-141 (2004)
- [117] A. Schonle, and S. W. Hell, "Heating by absorption in the focus of an objective lens", *Opt. Lett.*, **23** (5), pp. 325-327 (1998)
- [118] G. H. Patterson, and D. W. Piston, "Photobleaching in two-photon excitation microscopy", *Biophysical Journal*, **78** (4), pp. 2159-2162 (2000)

- [119] D. L. Wokosin, V. Centonze, J. G. White, D. Armstrong, G. Robertson, and A. I. Ferguson, "All-solid-state ultrafast lasers facilitate multiphoton excitation fluorescence imaging", *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, **2** (4), pp. 1051-1065 (1996)
- [120] W. G. Fischer, E. A. Wachter, M. Armas, and C. Seaton, "Titanium:Sapphire laser as an excitation source in two-photon spectroscopy", *Appl. Spectrosc.*, **51** (2), pp. 218-226 (1997)
- [121] D. E. Spence, P. N. Kean, and W. Sibbett, "60-Fsec Pulse Generation from a Self-Mode-Locked Ti-Sapphire Laser", *Opt. Lett.*, **16** (1), pp. 42-44 (1991)
- [122] J. C. M. Diels, J. J. Fontaine, I. C. Mcmichael, and F. Simoni, "Control and Measurement of Ultrashort Pulse Shapes (in Amplitude and Phase) with Femtosecond Accuracy", *Appl. Optics*, **24** (9), pp. 1270-1282 (1985)
- [123] K. L. Sala, G. A. Kenney-Wallace, and G. E. Hall, "CW autocorrelation measurements of picosecond laser pulses", *IEEE J. Quantum Electron.*, **16** (9), pp. 990-996 (1980)
- [124] J. E. Jureller, H. Y. Kim, and N. F. Scherer, "Stochastic scanning multiphoton multifocal microscopy", *Opt. Express*, **14** (8), pp. 3406-3414 (2006)
- [125] G. D. Reddy, and P. Saggau, "Fast three-dimensional laser scanning scheme using acousto-optic deflectors", *Journal of Biomed. Opt.*, **10** (6), pp. 064038-064042 (2005)
- [126] K. H. Kim, C. Buehler, and P. T. C. So, "High-Speed, Two-Photon Scanning Microscope", *Appl. Optics*, **38** (28), pp. 6004-6009 (1999)
- [127] J. Bewersdorf, R. Pick, and S. W. Hell, "Multifocal multiphoton microscopy", *Opt. Lett.*, **23** (9), pp. 655-657 (1998)
- [128] L. Sacconi, E. Froner, R. Antolini, M. R. Taghizadeh, A. Choudhury, and F. S. Pavone, "Multiphoton multifocal microscopy exploiting a diffractive optical element", *Opt. Lett.*, **28** (20), pp. 1918-1920 (2003)
- [129] D. N. Fittinghoff, and J. A. Squier, "Time-decorrelated multifocal array for multiphoton microscopy and micromachining", *Opt. Lett.*, **25** (16), pp. 1213-1215 (2000)
- [130] T. Nielsen, M. Fricke, D. Hellweg, and P. Andresen, "High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy", *Journal of Microscopy*, **201** (3), pp. 368-376 (2001)
- [131] S. Lévêque-Fort, M. P. Fontaine-Aupart, G. Roger, and P. Georges, "Fluorescence-lifetime imaging with a multifocal two-photon microscope", *Opt. Lett.*, **29** (24), pp. 2884-2886 (2004)
- [132] E. Beaurepaire, L. Moreaux, F. Amblard, and J. Mertz, "Combined scanning optical coherence and two-photon-excited fluorescence microscopy", *Opt. Lett.*, **24** (14), pp. 969-971 (1999)
- [133] S. Tang, C.-H. Sun, T. B. Krasieva, Z. Chen, and B. J. Tromberg, "Imaging subcellular scattering contrast by using combined optical coherence and multiphoton microscopy", *Opt. Lett.*, **32** (5), pp. 503-505 (2007)